

**ANTİNEOPLASTİK BİR AJAN OLAN  
ATRA'NIN OVCAR-3 HÜCRELERİ ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Deniz Z. ALTINŞEKER  
Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı  
Eylül-2011

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

**Deniz Zahide Altınşeker**'in “**Antineoplastik Bir Ajan Olan ATRA'nın OVCAR-3 Hücreleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**” başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 28.07.2011 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	<b>Adı-Soyadı</b>	<b>İmza</b>
Üye (Tez Danışmanı) :	<b>Doç. Dr. A. TANSU KOPARAL</b>	.....
Üye	<b>: Doç. Dr. MEDİHA CANBEK</b>	.....
Üye	<b>: Yar. Doç. Dr. EMEL ERGENE</b>	.....

**Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .....**  
**tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.**

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

## ANTİNEOPLASTİK BİR AJAN OLAN ATRA'NIN OVCA-3 HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Deniz Z. ALTINŞEKER

Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. A. Tansu KOPARAL  
2011, 115 sayfa

Jinekolojik kanser türleri arasında en sık rastlanan ovaryum kanseri, kadınlarda kanser nedeniyle ölüm oranında yüksek yüzdeye sahiptir. Konulan teşhis sayısı ve meydana gelen ölüm oranlarına bakıldığında gelecekte de ovaryum kanserinin jinekolojik kanserler içerisinde en öldürücü tümör çeşidi olarak yerini koruyacağı düşünülmektedir.

Retinoidler vitamin A'nın doğal ve sentetik türevleri olan hidrofobik bileşenlerdir. Hücre farklılaşması, hücre çoğalması, homeostaz ve gelişim üzerinde etkin olarak rol almaktadırlar. Kanserli hücrelerde kontrolsüz hücre çoğalmasını inhibe etmekte, hücre farklılaşmasına neden olmakta ve hücrelerde apoptozu indüklemektedirler. ATRA (All-Trans Retinoik Asit) fizyolojik bir metabolittir. Nükleer reseptörlerine bağlanarak hedef genlerin ifadelerinde aktif olarak rol almaktadırlar. Retinoik asit türevleri hem *in vivo* da hem de yapılan hücre kültürü çalışmalarında ovaryum kanser hücrelerinde büyümeyi inhibe etmektedir.

Bu tez çalışmasında retinol metaboliti olan ATRA'nın tek başına ve klasik kemoterapötikler olan karboplatin ve paklitaksel ile kombine kullanımının OVCA-3 (insan ovaryum adenokarsinoma epitel hücre hattı) hücre hattı üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla sitotoksik etki belirlenmesinde MTT (3-(4,5 dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) yöntemi, apoptozun değerlendirilmesinde kaspaz-3 enzim aktivitesi ve DAPI (4-6 diamidino-phenylindole) boyama uygulanmıştır. VEGF, COX-2, IRS-1 ve Ki-67 genlerinin gen anlatım düzeylerindeki değişiklikler gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) tekniği uygulanarak belirlenmiştir.

ATRA'nın tek başına doza ve zamana bağlı olarak OVCA-3 hücre hattında sitotoksik etki gösterdiği, apoptozu indüklediği, IRS-1 ve COX-2 genlerinin gen anlatım seviyelerinde azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Karboplatin ve paklitaksel ile ikili ve üçlü kombinasyonlar halinde OVCA-3 hücre hattına uygulanan ATRA'nın tek başına uygulamaya göre kombinasyon olarak daha kısa sürede hücreler üzerinde etki gösterdiği saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Antineoplastik, ATRA, MTT, DAPI, Kaspaz-3, RT-PCR.

## ABSTRACT

Master of Science Thesis

### INVESTIGATION EFFECTS OF ATRA AS AN ANTINEOPLASTIC AGENT IN OVCAR-3 CELLS

Deniz Z. ALTINŞEKER

Anadolu University  
Graduate School of Sciences  
Biology Program

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. A. Tansu KOPARAL

2011, 115 pages

Ovarian cancer which is the most common types of gynecological cancer has a high percentage at the rate of death due to cancer in women. Depending on the number of diagnosis and rates of death, it is thought that ovarian cancer continues to be the most lethal gynecological malignancy.

Retinoids, which are natural and synthetic vitamin A derivatives, are the hydrophobic components. They play an active role in cell differentiation, cell proliferation, homeostasis, and development. They inhibit the uncontrolled cellular proliferation in cancer cells, lead to cell differentiation and induce apoptosis in cells. ATRA (All-Trans Retinoic Acid) is a physiological metabolite. They play an active role in expression of target genes by binding to nuclear receptors. Retinoic acid derivatives inhibit the growth of ovarian cancer cells both *in vivo* and cell culture studies.

In this thesis, it is studied the effects of the metabolite of retinol ATRA alone and in combination with conventional chemotherapeutics which are carboplatin and paclitaxel on OVCAR-3 (human ovarian epithelial adenocarcinoma cell line) cell line. For this purpose, MTT (3-(4,5 dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) method for determination of cytotoxic effects, caspase-3 enzyme activity and DAPI (4-6 diamidino-phenylindole) dying for the assessment of apoptosis were applied. Changes in gene expression levels of VEGF, COX-2, IRS-1 and Ki-67 genes has determined with applying real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) technique.

Depending on the dose and time, applying ATRA alone causes cytotoxic effects, inducing apoptosis, decreased gene expression levels of IRS-1 and COX-2 genes in OVCAR-3 cell line. Applying carboplatin and paclitaxel in double and triple combination with ATRA in OVCAR-3 cell line effects on the cells in a shorter time with respect to the application ATRA alone.

**Keywords:** Antineoplastic, ATRA, MTT, DAPI, Caspase-3, RT-PCR.

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim ve çalışmalarım süresince benden hiçbir konuda yardım ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Doç. Dr. A. Tansu KOPARAL'a,

Bu tezin yapılmasında büyük desteğini gördüğümüz hocamız Sayın Prof. Dr. S. Sinan ÖZALP'e,

Deneysel çalışmalarımı sürdürebilmem için Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünün tüm imkanlarından yararlanmamı sağlayan tüm hocalarıma ve 2008-2011 eğitim-öğretim yılları arasında Anadolu Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında birlikte çalıştığım, beni hiç yalnız bırakmayan bütün çalışma arkadaşlarıma,

Çalışmalarım sırasında deneyimlerini benden hiç esirgemeyen arkadaşlarım R. Beklem BOSTANCIOĞLU ve Murat KAYA'ya,

Hayatım boyunca bütün öğrenim dönemlerinde olduğu gibi bu süreçte de her anlamda yanımda olan annem Güner ALTINŞEKER, kardeşim Feray ALTINŞEKER ve babama en içten teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>1.GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Kanser.....	2
1.2. Ovaryum Kanseri ..	4
1.2.1. Ovaryum kanser tedavisinde kullanılan klasik kemoterapötikler.....	5
1.2.1.1. Karboplatin .....	5
1.2.1.2. Paklitaksel.....	6
1.3. Apoptoz .....	8
1.3.1. Apoptozun aşamaları.....	9
1.3.2. Apoptoz genetiği.....	10
1.3.3. Apoptoz belirleme yöntemleri.....	12
1.4. Retinodler.....	13
1.4.1.Retinoik asit reseptörleri ve fonksiyonları.....	15
1.4.2. ATRA.....	18
1.5.Sitotoksisite .....	21
1.5.1. Sitotoksisite çalışmalarında hücre kültürlerinin kullanılması.....	21
1.5.2. Kanser tedavisinde hedeflenen yeni ilaç kombinasyonları.....	22
1.6. Çalışmada Kullanılan OVCAR-3 Hücrelerinin Özellikleri.....	23
1.7. Çalışmada Kullanılan Yöntemler.....	23
1.7.1. Mitokondriyal aktiviteye bağlı MTT testi.....	23
1.7.2.DAPI boyama (Fluoresan boyama ile morfolojik inceleme).....	24
1.7.3. Kaspaz-3 elisa kolorimetrik testi.....	24

1.7.4. PCR ve RT-PCR yöntemi .....	25
1.7.5. RT-PCR.....	27
1.7.5.1. Kantitatif Real-Time PCR yöntemi.....	29
1.7.5.2. Real-Time PCR için kullanılan problemler.....	29
1.7.5.3. Dizi spesifik olmayan floresan boyalar.....	31
1.7.5.4. Dizi spesifik floresan problemler.....	31
1.8. Çalışmada Anlatım Seviyeleri İncelenen Genler; 18S r RNA, COX-2, VEGF, IRS-1 ve Ki-67.....	32
1.8.1. 18S rRNA.....	32
1.8.2. COX-2.....	33
1.8.3. VEGF.....	35
1.8.4. IRS-1.....	37
1.8.5. Ki-67 geni.....	38
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM</b>	<b>40</b>
2.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	40
2.2. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	40
2.3. Kullanılan Aletler.....	40
2.4. OVCAR-3 Hücre Kültürü.....	41
2.5. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması.....	41
2.5.1 Karboplatin dozlarının hazırlanması.....	41
2.5.2. ATRA dozlarının hazırlanması.....	41
2.5.3. Paklitaksel dozlarının hazırlanması.....	42
2.6. Kullanılan Araç ve Gerecin Hazırlanması.....	42
2.7. Yöntem.....	42
2.7.1. Hücre kültürü.....	42
2.7.2. Hücrelerin testler için hazırlanması.....	42
2.7.2.1. <i>In Vitro</i> sitotoksikite testi (MTT Testi).....	42
2.7.2.2. MTT ölçümü.....	44
2.7.3. Apoptoz tespiti.....	44
2.7.3.1. Floresan boyama ile morfolojik inceleme (DAPI boyama).....	44

2.7.3.2. Kaspaz-3 deneyi.....	45
2.7.4. Real-Time PCR.....	45
2.7.4.1. RNA izolasyonu.....	45
2.7.4.2. cDNA sentezi .....	46
2.7.5. Mikroskopi .....	49
2.7.6. Fotografi.....	49
<b>3. BULGULAR</b>	<b>50</b>
3.1. MTT Testi.....	51
3.1.1. ATRA'nın OVCAR-3 hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri.....	51
3.1.2. Karboplatin'in OVCAR-3 hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri.....	52
3.1.3. Paklitaksel'in OVCAR-3 hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri.....	53
3.1.4. ATRA & Paklitaksel kombinasyonunun OVCAR-3 hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri.....	55
3.1.5. ATRA & Karboplatin kombinasyonunun OVCAR-3 hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri.....	57
3.1.6. Karboplatin & Paklitaksel kombinasyonunun OVCAR-3 hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri.....	58
3.1.7. ATRA & Karboplatin & Paklitaksel kombinasyonunun OVCAR-3 hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri.....	60
3.2. DAPI Boyama Sonuçları.....	66
3.3. Kaspaz 3 Elisa Kolorimetrik Testi.....	72
3.4. RT-PCR Bulguları.....	76
<b>4.TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>85</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>95</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Retinoidlerin C ve H atomlarından oluşan kimyasal yapılarının iskelet formülü.....	14
1.2. Retinoid metabolizması .....	15
1.3. Retinoik asidin gen aktivasyonu üzerine etkisi .....	16
1.4. RAR $\alpha$ 'nın yapısı ve 6 modüler bölgesi .....	17
1.5. PCR reaksiyonunun şematik olarak gösterilmesi .....	26
1.6. DNA'ya bağlanmamış ve bağlanmış proplar .....	30
1.7. Dizi-spesifik olmayan boyalar .....	30
1.8. Moleküler beacon, Taqman prob, hibridizasyon probu .....	30
2.1. cDNA sentezi aşaması .....	47
2.2. RT-PCR, 1 döngü .....	48
3.1.1. ATRA'nın OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi .....	51
3.1.2. Karboplatin'in OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi .....	52
3.1.3. Paklitaksel'in OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi .....	53
3.1.4. ATRA & Paklitaksel kombinasyonunun OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	55
3.1.5. ATRA & Karboplatin kombinasyonunun OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi .....	57
3.1.6. Karboplatin & Paklitaksel kombinasyonunun OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi .....	58
3.1.7.a. ATRA, Karboplatin ve Paklitakselin tek başlarına ve kombinasyonlarının OVCAR-3 hücreleri üzerindeki 12 saatlik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi .....	60
3.1.7.b. ATRA, Karboplatin, Paklitaksel kombinasyonunun OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	62

3.1.7.c. ATRA, Karboplatin, Paklitaksel kombinasyonunun OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	64
3.2.1. OVCAR-3 hücrelerinin DAPI boyamaları .....	66
3.2.2. OVCAR-3 hücrelerinin DAPI boyamaları .....	67
3.2.3. OVCAR-3 hücrelerinin DAPI boyamaları .....	68
3.2.4. OVCAR-3 hücrelerinin DAPI boyamaları .....	69
3.3.1. OVCAR-3 hücrelerinin ATRA, Paklitaksel ve Karboplatin ile tek başlarına ve kombine olarak 12 saatlik muamelesi sonucunda elde edilen Kaspaz-3 sonuçları .....	72
3.3.2. OVCAR-3 hücrelerinin ATRA, Paklitaksel ve Karboplatin ile tek başlarına ve kombine olarak 24 saatlik muamelesi sonucunda elde edilen Kaspaz-3 sonuçları .....	74
3.4.1. Test maddelerinin uygulandığı örneklerde 18S rRNA genine ait amplifikasyon eğrileri.....	77
3.4.2. Test maddelerinin uygulandığı örneklerde IRS-1 genine ait amplifikasyon eğrileri.....	78
3.4.3. Test maddelerinin uygulandığı örneklerde VEGF genine ait amplifikasyon eğrileri.....	79
3.4.4. Test maddelerinin uygulandığı örneklerde Ki-67 genine ait amplifikasyon eğrileri.....	80
3.4.5. Test maddelerinin uygulandığı örneklerde COX-2 genine ait amplifikasyon eğrileri.....	81

## TABLULAR DİZİNİ

1.1. ATRA'nın özellikleri.....	18
1.2. PCR çeşitleri.....	28
2.1. cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği.....	47
2.2. RT-PCR için miks içeriği.....	48
2.3. RT-PCR tekniği ile genlerin ifade seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan primerler.....	48
3.1. ATRA, karboplatin ve paklitakselin tek başlarına ve kombine olarak uygulamalarının Ki-67, VEGF, COX-2, IRS-1 ve 18S rRNA gen ifadelerinde meydana getirdiği değişiklikler.....	84

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>RPMI</b>	: Roswell Park Memorial Institute Medium
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>EDTA</b>	: Etilen-diamin tetra asetik asit
<b>FBS/FCS</b>	: Fetal Bovine Serum/Fetal Calf Serum
<b>DAPI</b>	: 4-6 diamidino- phenylindole
<b>MTT</b>	: 3-(4,5dimetiliazol-2yl)-2,5-difenil tetrozolyum bromid
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	: Sodyum bikarbonat
<b>PBS</b>	: Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate buffer saline)
<b>ATRA</b>	: All-trans Retinoik Asit
<b>PCR (PZR)</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RT-PCR</b>	: Real Time (eş zamanlı) Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>COX</b>	: Siklooksijenaz Enzimi
<b>VEGF</b>	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
<b>IRS</b>	: İnsülin Alıcı Protein Reseptör

## 1.GİRİŞ

Uygulanan cerrahi ve kemoterapi yöntemlerine rağmen ovaryum kanseri jinekolojik kanser türleri arasında en yüksek ölüm oranına sahiptir (Pliarchopoulou ve Pectasides 2011). Ovaryum kanserinin tedavisinde 10 yıldan fazla bir süredir paklitaksel ve karboplatin ile birlikte yeni nesil kemoterapötiklerin birlikte kullanımı, ilk tercih edilen tedavi yöntemi olmuştur. Fakat bu uygulama ilerlemiş ovaryum kanserinde sağkalım süresini uzatmakta başarısız olmaktadır (Ledermann ve Raja 2010).

Kanser tedavileri sırasında sıklıkla karşılaşılan kemorezistans, kullanılan antikanser ilaçların sınırlandırılmasına neden olmaktadır. Bu nedenden dolayı kanser tedavisinde kullanılmak üzere sürekli yeni kemoterapötik ajanların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Zhang ve ark. 2008). Organizmada ortaya çıkan tepkiler, kullanılan ajanın etkisini sınırlandırmaktadır. Bu durumda olması gereken tedavi daha az toksik ajanların tek başlarına ya da kombine uygulamalarını içermektedir (Li ve ark. 2009).

Karsinogenezis; birçok genin ve yolağın rol aldığı çok aşamalı bir süreçtir. Bu durumda kombine ilaç kullanımı kanser hücreleri üzerinde daha etkili olmaktadır. Bugün sitotoksik tedavide göz önünde bulundurulan kriterler arasında;

- Hedefe yönelik, toksik olmayan ajan seçimi,
- İlaçların daha az dozlarda kombine olarak kullanımı,
- Çalışılacak tümöre uygun sitotoksik ajan belirlenmesi sayılabilmektedir

(Bono ve ark. 2003).

Sitotoksisite çalışmalarında hücre hatlarının kullanımı, oluşan etkilerin biyolojik mekanizmalarının anlaşılması açısından daha avantajlıdır. Protein izolasyonu ile yapılan çalışmalarda hedef molekül hakkında etki açısından çok sınırlı bilgiler edinilirken, hücre hatlarının kullanımı, etkiye neden olan hücre bileşenlerini ya da yolaklarını da sorgulama fırsatını vermektedir (Halis ve ark. 2007).

ATRA (All-Trans Retinoik Asit) bir vitamin A türevidir. Anti-fibrotik etkiye sahip olan ATRA aynı zamanda enfeksiyon giderici olarak da bilinmektedir (Segel ve ark. 2001). Yapılan önlinik çalışmalarca hücre büyümesi ve farklılaşması üzerinde rol oynadığı kabul edilen ATRA, bugün klinikte kanserden korunma tedavilerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Retinoidler, vitamin A'nın doğal ve sentetik türevleri olarak bilinmektedir. Tümör büyümesini, transforme olmuş malign hücrelerdeki spesifik genleri aktive ederek ya da baskılayarak engellemektedir (Zanardi ve ark. 2006).

Klinikte ilaçların neden olduğu toksisite, tedavilerin büyük oranda başarısız olması ve tümör hücrelerinin ajanlara karşı duyarsızlaşması ile sonuçlanmaktadır. Bu sonuçlardan kaçınmak için önerilen daha düşük dozlarda ve daha kısa süreli muamele ile ilaçların kombine olarak uygulanmasıdır.

Çalışmamızda retinol metaboliti olan ATRA'nın tek başına ve klasik kemoterapötikler olan karboplatin ve paklitaksel ile kombine kullanımının OVCAR-3 (insan ovaryum adenokarsinoma epitel hücre hattı) hücre hattı üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla sitotoksik etki belirlenmesinde MTT (3-(4,5 dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) yöntemi, apoptozun değerlendirilmesinde kaspaz-3 enzim aktivitesi ve DAPI (4-6 diamidino-phenylindole) boyama uygulanmıştır. VEGF, COX-2, IRS-1 ve Ki-67 genlerinin gen anlatım düzeylerindeki değişiklikler gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) tekniği uygulanarak belirlenmiştir.

## **1.1. Kanser**

Kanser oluşumu, kendiliğinden olabildiği gibi çevresel etmenler nedeniyle de olabilen çeşitli genetik değişimleri içeren, kompleks, çok adımlı bir süreçtir (Li ve ark. 2009).

Kanser, her yıl gittikçe büyüyen global bir sorun haline gelmiştir. Dünya sağlık örgütüne (WHO=World Health Organization) göre her yıl 11 milyon kanser teşhisi konulmakta ve bu sayının 2020 yılında 16 milyona çıkabileceği düşünülmektedir. Ölüm vakalarının 8 milyondan daha fazlası ya da % 13'ü direkt

kanser ilişkili olarak gerçekleşmektedir. Gelişmiş ülkelerde kanser kaynaklı ölüm oranı % 20'lere çıkmaktadır (Zhang ve ark. 2008).

Türkiye'de TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) 2006 verilerine göre 264.103 hastaya kanser tanısı konulmuştur. 2006 yılı içerisinde bulunan ölüm vakalarının 10.774'ü kanser nedeni ölümlerdir (Gürsoy 2011).

Karsinogenez hakkında, onkogen ve supresör genler, epigenetik, immün sistemdeki başarısızlıkları kapsayan çeşitli hipotezler öne sürülmektedir. Kanser kök hücre hipotezi; kanserin heterojenite ve klonal orjin gibi bazı karakteristik özelliklerini baz alarak tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini içeren hipotezlerden bir tanesidir. Kanser kök hücreleri miyeloid, göğüs, beyin ve akciğer kanserlerinde bazı karakteristikler belirlenerek tanımlanmıştır. Bu hipotez bugün kabul edilen kanser teşhisi, oluşum mekanizması, tedavi seçenekleri gibi mevcut anlayışlarda büyük değişiklikleri ortaya koyabilmektedir (Li ve ark. 2009). Bugün uygulanan kanser terapileri, hızlı bölünen hücreleri hedef alarak tümör çapında küçülmeyi esas almaktadır. Bu tedavi sıklıkla tümörün metastazı ile sonlanmaktadır. Bu başarısızlığın en büyük nedeni mevcut tedavi yönteminin pasif olan kanser kök hücresinin öldürülmesinde gösterdiği yetersizliktir. Çünkü kullanılan ilaçlar yüksek oranda toksik ajanlar olduğundan, çoğunlukla bütün organizmada toksik etkiye neden olmaktadır (Leszczynieckaa ve ark. 2001).

Jinekolojik kanserler dünyada oldukça önemli bir hastalık ve ölüm oranına sahiptirler. Görülme sıklığı, çeşitleri ve sonuçları toplumlara bağlı olarak farklılık göstermektedir. Jinekolojik kanserler; vulva, vajina, serviks (rahim boynuna ait), endometriyum (uterus mukozasına ait), ovaryum tümörlerini kapsamaktadır. Kadınlarda görülen kanser çeşitleri arasında % 10'luk orana sahiptirler (Ghezzi ve ark. 2010). Daha çok menopoz sonrası dönemde kadınlarda görülmelerine rağmen jinekolojik tümörler daha genç kadınlarda fertilité ile ilişkili etkiler göstermektedir. Uygulanan tedaviler; cerrahi yöntemler, kemoterapi yöntemleri, radyoterapi yöntemleri ve sıklıkla da bu yöntemlerin birleşimidir. Seçilecek tedavi yöntemi yapılan klinik testlere ve belirlenen tümörün seyrine bağlı olarak uygulanmaktadır (Kehoe 2006).

## 1.2. Ovaryum Kanseri

Ovaryum kanseri, görülme sıklığı açısından jinekolojik kanserler arasında 2. sırada yer almaktadır. Fakat jinekolojik kanser türleri arasında en fazla ölüme neden olan ovaryum kanseridir. Bu oran tüm kanser nedenli ölüm oranının beşte biridir. Geliştirilen tedavi stratejileri ile sağkalım oranında yükselme olmasına rağmen ölüm oranının halen yüksek olduğu belirtilmektedir (Ghezzi ve ark. 2010).

Epitelyal ovaryum kanseri birçok tümör alt tipi içermektedir. Gelişim kökeni hakkındaki veriler halen yetersizdir. Ovaryum kanser tipleri arasında en istilacı ve tehlikeli olarak görülen tümör tipi ovaryum epiteli yüzeyinde görülmektedir (Rossing ve ark. 2008).

Epitelyal ovaryum tümörleri, farklı belirgin özellikleri ile sınıflandırılmaktadırlar. Seröz, müsinöz, endometrioid, belirgin hücre, geçişgen, pullu, karışık ya da farklılaşmamış görünümlere sahip olabilmektedirler. Tümörlerin ovaryum epitel yüzeyinde meydana getirdikleri hasarlar *in situ* olarak yüzey epitelyumundan ya da yüzey epitelyumunda meydana getirdikleri beze yapılarından saptanabilmektedir (Bell 2005).

Ovaryum kanserli hastaların % 10'unun kanser oluşumundan sorumlu BRCA 1 ve BRCA 2 genlerinde mutasyon taşıdığı saptanmıştır. BRCA1/2 mutasyonuna bağlı olarak oluşan ovaryum kanseri diğer ovaryum kanserlerinden daha geç teşhis edilebildiği için tedavi edilebilme şansı da daha azdır. Mutasyon taşıyan bireylerde ovaryum kanserine yakalanma riski 10 kat daha fazladır (Modugno 2003).

Ovaryum kanserine ilk müdahale uygun cerrahi yöntemin uygulanması ile başlamaktadır. Özellikle yayılımının alt karın ile sınırlı olduğu düşünülen durumlarda, hastalık ilk serözde yayılmaya başladığından tüm peritoneal yüzeyler dikkatlice taranmalıdır. Hastalık sıklıkla lenfatik yol ile karın zarının arkasında yayılım göstermektedir (DiaSaia ve Bloss 2003). Ovaryum kanseri birçok kemoterapötik ajana yanıt vermektedir. Bu nedenle en uygun anti-kanser terapilerin belirlenmesinde çalışılabilecek ideal kanser türüdür (Ledermann ve Raja 2010). İleri düzey epitelyal ovaryum kanserinde hastaların % 70'i ilk



başlangıçta platin ve taksan temelli tedaviye yanıt vermelerine rağmen, ilerleyen dönemde büyük oranda direnç oluşumu göstermektedirler. Yeni geliştirilecek tedavi yöntemleri bu nedenden dolayı büyük önem taşımaktadır (Teoh ve ark 2011).

### **1.2.1. Ovaryum kanser tedavisinde kullanılan klasik kemoterapötikler**

#### **1.2.1.1. Karboplatin**

Sisplatin ve karboplatin geniş antitümör aktivitesine sahiptir. Karboplatin alkilleyici bir ajandır ve diğer alkilleyici ajanlar gibi hücrede DNA, RNA ve proteinlere kovalent bağ ile bağlanarak yapılarının bozulmasına yol açmaktadır. Etki mekanizması sisplatin ile aynıdır. Hücrede ölüm reseptörünü uyararak mitokondri aracılı yolların aktivasyonunu sağlamakta ve apoptotik sürecin başlamasına neden olmaktadır. Ovaryum, germ, boyun, akciğer kanser tedavilerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Paklitaksel ile kombine uygulaması, ileri düzey epitelyal ovaryum kanserinde tedavinin etkisini arttırarak, hastalarda sağkalım oranını yükseltmektedir (Stewart 2007; Demir 2007; Lee ve ark. 2010).

Organizmada sağlıklı hücreler, içinde buldukları mikro çevredeki zararlı bileşiklerden korunmak için birtakım mekanizmalar geliştirmektedirler. Bu mekanizmaların, kanser kemoterapilerine karşı direncin ortaya çıkmasının temeli olabileceği düşünülmektedir (Stewart 2007).

Ras proteinleri, hücrede sinyal iletiminde regülatör olarak görev almaktadırlar. Hücre canlılığı ve hücre fonksiyonları üzerindeki bu etkisi nedeniyle kanser terapilerinde hedef molekül olarak kullanılmaktadırlar. Aktive olmuş Ras yolağının tümör büyümesi üzerine ciddi etkileri vardır. Bu proteinin membran reseptörü olan PI-3 (fosfatidilinositol 3 kinaz) kinaza bağlanması ile Akt (protein kinaz B) aktive edilmiş olmaktadır. Aktive edilmiş Akt proteini hücre canlılığı, hücre çoğalması ve tümör hücrelerinin migrasyonunu sağlayan moleküllerin artmasına neden olmaktadır. İnsan ovaryum kanserinde ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde Akt proteininin sentezi çok fazladır. Karboplatin ve Akt inhibitörü birlikte kullanıldığında, ovaryum kanserli hücre

hattında, sitozoldeki Bid ve Bcl-2 seviyeleri azalmakta, kaspaz-3'ün aktive olması ile hücre apoptoza girmektedir (Lee ve ark. 2010).

Karboplatin böbrekler üzerinde çok daha az toksik etkiye sahip bir platin birleşimidir. Sisplatinin fonksiyonel grubu olan iki klorit ligandı yerine siklobütan-dikarboksilat içermektedir. Karboplatine duyarlı ovaryum kanserli hücre hatlarında apoptoz, hücre-hücre haberleşmesi, hücre adhezyonu, DNA onarımı ve hücre çoğalmasını sağlayan gen ifadeleri, direnç gösteren hücrelerden farklıdır (Kouno ve ark. 2007; Stewart 2007).

### 1.2.1.2. Paklitaksel

Paklitaksel, bir Pasifik porsuğu olan *taxus brevifolia*'nın kabuğundan elde edilen bitkisel bir üründür. Paklitakselin ovaryum kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve göğüs kanseri tedavilerinde geniş kullanım alanları vardır (Yao ve ark. 2011).

Paklitaksel mikrotübüllere bağlanarak, mikrotübül hareketinin engellenmesine neden olmaktadır. Böylece kromozomların bağlandığı mikrotübüllerin yapısında bozulmalar meydana gelmekte ve mitoz G2/M fazında durmaktadır (Tanaka ve ark. 2009).

Paklitakselin en büyük avantajı lipofilik molekül olması nedeniyle atardamardan hızlıca absorbe edilebilmesidir. "Lee ve arkadaşları (2009)" *in vitro* olarak yaptıkları çalışmada, paklitakselin trombosit kümelenmesi ve trombosit aktivasyonu ile alakalı sinyal yolları üzerindeki etkisini belirlemeye çalışmışlardır. Paklitakselin TXA<sub>2</sub> (tromboksan A<sub>2</sub>) sentezini ve sitozolik Ca mobilizasyonunu engelleyerek trombositlerin kümelenmesini inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Paklitakselin bu etkisi ile kardiyovasküler sistem için de kullanılabileceği düşünülmektedir.

Paklitaksel *in vitro* da epitelyal hücreler üzerine anjiyogenik olarak etki etmektedir. Böylece hücrelerin hareket yetenekleri engellenmiş olmaktadır. Paklitakselin düşük konsantrasyonları ile muamele edilen hücrelerin çoğalmalarının inhibisyonu üzerine çok etki görülmezken, hareket yeteneklerinin daha yüksek oranda inhibe edildiği rapor edilmiştir. Bu bulgular paklitakselin *in*

*vivo* da da endotelial hücreleri üzerindeki etkisini anjiyogenezi inhibe ederek gösterebileceğini düşündürmektedir (Belotti ve ark. 1996).

Paklitakselin farklı doz aralıkları ile yapılan çalışmalar sonucu gösterdiği etkiler;

- 1 nM ve 100 µM doz aralığında, IC<sub>50</sub> değeri altı dozların hücrelerle 3-4 gün muamelesi sonucu göz ardı edilebilecek oranlarda hücre büyümesinin inhibe edildiği fakat mitozun hiç bir evrede tutuklanmadığı,
- 5-200 nM doz aralığında, hücrelerde mitotik evrede tutuklanmaya ve hücre ölümüne yol açtığı,
- 3-100 µM doz aralığındaki yüksek konsantrasyonlu uygulamalarda, maddenin tirozin kinaz sinyal yollarına bağlı olarak hücreler üzerinde ölümcül etki gösterdiği fakat hücreler üzerinde mitozu bloklayıcı herhangi bir etki göstermediği, rapor edilmiştir (Blagosklonny ve Fojo 1999).

Paklitaksel birçok kanser çeşidinde olduğu gibi, epitelyal ovaryum kanser hücrelerinde de mikrotübüller üzerinden etki ederek DNA sentezini inhibe ettiği için apoptoza neden olmaktadır. Bu nedenden dolayı paklitaksel, epitelyal ovaryum kanser tedavisinde kullanılan önemli kemoterapötik ajanlardandır. Tedavinin başlangıç aşamalarında paklitaksel tedavisine olumlu yanıtlar veren ovaryum kanseri, hastalığın ilerleyen aşamalarında direnç oluşumu göstermektedir. Yapılan çalışmalarda PI3k/AKT yolağında meydana gelen değişimlerin direnç oluşumuna sebep olduğu rapor edilmiştir (Hu ve ark. 2002).

Bir membran reseptörü olan TLR-4 (Toll benzeri reseptör) epitelyal ovaryum kanserinde oldukça yüksek oranda bulunmaktadır. Paklitakselin TLR-4 reseptörü ile ligand oluşturduğu bilinmektedir. TLR-4 çoğunlukla MyD88 (İnsan myeloid değişim faktörü 88) üzerinden sinyalizasyona neden olmaktadır. Hücre hatlarında spesifik olarak sentezlendiği bilinen MyD88'in, epitelyal ovaryum kanser hücrelerinde paklitaksele karşı verilen tepkide rol aldığı düşünülmektedir. MyD88 bakımından negatif olan epitelyal ovaryum kanser hücreleri 2µmol/L paklitaksel ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Kaspaz 3 ve kaspaz-7 aktivitesine bakılan çalışmada, hücrelerde kaspaz-3/-7 aktivitesinde anlamlı derecede artış olduğu rapor edilmiştir. Elde edilen veriler epitelyal ovaryum

kanser hücre hattında bulunan MyD88 seviyesinin paklitakselin indüklediği apoptozla bağlantılı olduğunu düşündürmektedir (Kelly ve ark. 2006).

### **1.3. Apoptoz**

Canlılık birbirini takip eden doğma, büyüme, üreme, yaşlanma evrelerini içerip ölümle sonlanan bir yaşam döngüsüdür. Canlılığın sürdürülmesi sırasında organizmanın yapı ve fonksiyonunun fizyolojik gereksinimleri yerine getirilmektedir. Bu süreçte hücrelerin çoğalma ve ölüm oranlarının denge içerisinde bulunması önemli yer tutmaktadır (Öniz 2004).

Hücrede tanımlanan başlıca iki ölüm şekli vardır. Bunlardan biri olan nekroz, ani çevresel değişiklikler gibi bir etmen sonucu patolojik olarak gerçekleşmektedir. Nekrozun karakteristiği hücrede görülen şişme ve parçalanmadır (Kane 1995). Toksik ajan ile muamele ya da fiziksel hasarlar sonucu, hücrenin ATP düzeyinin canlılık için yeterli kalmadığı durumlarda başlamaktadır. Morfolojik olarak nekroz sitoplazmada boşluk oluşumunun başlaması ile karakterize edilmektedir. Plazma membranında başlayan yıkımın ardından hücre içeriği dışarı çıkmakta ve inflamasyon başlamaktadır. Nekrozda morfolojik olarak değişim olmakta fakat apoptozda görülen 200 baz çiftlik DNA fragmantasyonu görülmemektedir (Edinger ve Thompson 2004).

Programlanmış hücre ölümü genetik olarak belirlenmiş bir süreçte meydana gelmektedir. Gelişmiş çok hücreli organizmalarda programlanmış hücre ölümü spesifik dokularda ve zamanda, kontrollü bir yol izleyerek belirli bir grup hücrede görülmektedir (Hockenbery 1995). Benzer şekilde metamorfoz süreci geçiren canlılarda da birçok organın yok olması bu yolla gerçekleşmektedir (Majno ve ark. 1995).

Hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, DNA fragmantasyonu, apoptotik cisim oluşumu, apoptotik hücre ölümünde gözlemlenen spesifik belirtilerdendir. Hücre kalıntıları makrofajlar tarafından ya da komşu hücreler tarafından hızlıca fagosite edilmektedir (Hockenbery 1995).

### 1.3.1. Apoptozun aşamaları

Embriyonik evreden itibaren başlayıp yaşam boyu devam eden genetik kontrol, iyonize radyasyon, kullanılan ilaç ve çevresel etmenler, iskemi sonrası oluşan reperfüzyon, mekanik travmalar, bakteriyemi sonrası oluşan sepsis ve septik şoklar, apoptozisin uyarıcıları arasında sayılan etmenlerdir. Apoptoz, hormonlar, sağkalım sinyalizasyonunda (büyüme faktörü gibi) meydana gelen eksiklikler, bitişik hücre ile temas gibi hücre dışı uyarılar ve iyonize radyasyon, viral enfeksiyon, serbest radikaller kaynaklı oksidatif hasar gibi hücre içi etmenlerce uyarılmaktadır. Apoptoz dış (eksternal) ve iç (internal) olmak üzere başlıca 2 yol üzerinden gerçekleşmektedir (Gültekin ve ark. 2008).

Eksternal yol ile apoptozun başlaması TNF (tümör-nekrozis faktör reseptör) reseptörlerinin ligantlarca aktive edilmesiyle olmaktadır. (Porter 1999). Lenfosit ve lökosit aktivasyonu ve migrasyonu, hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz gibi çok önemli hücresel etkinlikte rol almaktadır. Reseptörlerin sitoplazmik uçlarındaki DD (ölüm bölgeleri) bölgeleri korunmuş olarak bulunmaktadır. Bu bölgelere uygun sitoplazmik sinyal proteinleri bağlanmaktadır. TNF reseptör ailesine mensup birçok sitokin reseptörleri bu bölgeye sahiptir. TRADD adaptör molekülü, reseptörleri olan TNFR1'e, FADD adaptör molekülü ise CD95, DR3 ve TRAIL reseptörlerine bağlanarak apoptoza ve NF- $\kappa$ B sinyalizasyonuna neden olmaktadır (Baud ve Karin 2001).

Diğer önemli reseptör olan Fas (CD95) bir hücre yüzey proteinidir. Hücrede JNK (Jun-N-terminal kinaz) yolağının aktivasyonundan sorumludur. Yolağın aktive olması bir sinyal proteini olan Daxx (ölüm alanı ile ilişkili protein) tarafından olmaktadır. Daxx Fas'ın DD bölgesine spesifik olarak bağlanmaktadır. (Yang ve ark. 1997).

Uyarılmamış reseptörün sitoplazmik ucu DD bölgesince sessizleştirilmiş halde bulunmaktadır. Reseptör uyarıldığında ise SODD (ölüm bölgesi susturucusu), reseptörden ayrılmakta ve reseptöre DED (ölüm etkili domain) adaptörü bağlanmaktadır. Bu bağlanma sonucu prokaspaz-8 aktiveleştirilmekte ve DISC (ölümü başlatan sinyalleme kompleksi) sinyalinizasyonu oluşmaktadır (Porter 1999).

Mitokondri, iç yolla gerçekleşen apoptoz için temel organeldir. (Öniz 2004). İnternal yol ile indüklenen apoptozda sitoplazma yoğunlaşmaktadır. Mitokondri apoptozu uyaran bütün faktörleri ve sitokrom-c yi serbestleştirerek bütünlüğünü kaybetmektedir. Kaspaz aktivasyonunun ardından kromozomal DNA'nın 180-200 baz çiftlik internükleozomal fragmentasyonu gerçekleşmektedir. Hücrenin canlılığını sürdürmesinde ve metabolik faaliyetlerinde yer alan proteinlerde parçalanmalar meydana gelmektedir (Gültekin ve ark. 2008). Reseptör aracılığı ile aktive edilmeyen bu yolak, DNA hasarı, metabolik stres, radyasyon, UV ya da büyüme faktörü yetersizliği gibi nedenlerle başlamaktadır. İç yolla aktive olan apoptozda en önemli olay, mitokondri membranından sitokrom c'nin serbest bırakılmasıdır. Sitozole salınan sitokrom c'ye Apaf-1( proteaz aktive edici faktör-1) bağlanmaktadır. Bağlanmanın ardından aktive olan kaspaz-9, kaspaz-3 ve kaspaz-7'nin aktivasyonunu başlatmaktadır (Repnik ve Turk 2010).

### **1.3.2. Apoptoz genetiği**

Uygulanan birçok anti-tümör ajanların hedefi hücre DNA'sıdır. Hedefe ulaşan ajanlar p53 seviyesinde artışa neden olarak etkilerini göstermektedirler. Böylece hücrede ya DNA tamiri yapılmakta ya da apoptotik süreç başlatılmaktadır. p53 genomu koruyarak görev yaptığından, bu gen bölgesindeki mutasyonlar çok önem kazanmaktadır. p53 gen bölgesinde mutasyona sahip hücreler genom içeriğini garanti altına alamamakta ve hücre döngüsünde oluşan durma sinyallerine karşı tepkisiz kalmaktadırlar. (Altunkaynak ve Özbek 2008).

Bcl-2 protein ailesi apoptozda rol olan en önemli regülatörlerdendir. Bu proteinlerin ekspresyonu birçok tümörde görülmektedir. Hücrede artan Bcl-2 miktarı kemoterapötik ilaç ve radyasyon tedavilerine karşı direnç oluşumuna yol açmaktadır. Bcl-2 seviyesi azaldığında antikanser ilaç tedavilerinin apoptotik etkileri artmaktadır. Aynı zamanda hücreleri, hücre siklusunun G<sub>0</sub> fazında bekleterek kemorezistans oluşumuna neden olmaktadır. Bcl-2 ailesine mensup proteinlerden;

- Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim ve Hrk apoptoz indükleyici proteinler, promotor olarak etkilidirler,
- Bcl-2, Bcl-X<sub>1</sub>, Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1 ise apoptoz baskılayıcı proteinlerdir, sitokrom-c'nin serbest bırakılmasını bloke ederek apoptotik sürecin başlamaması için represör olarak rol oynamaktadır (Ghobrial ve ark. 2005).

Sistein proteazlar olan kaspazlar hedef molekülde, aspartik asitten sonra gelen peptit bağımlı olarak etki etmektedirler. Normalde hücrede inaktif olarak bulunan kaspazlar aktive edildiklerinde birbirlerini aktifleştirerek kaskad meydana getirmektedirler. Kaspazlar ilk ekspresyona edildiklerinde zimojen yapıdadırlar. 10 kd ve 20 kd'lik farklı uzunlukta 2 alt birime ayrıldıklarında dimerize olmakta yani aktifleşmektedirler (Soini ve ark. 1998).

*Kaspazların sınıflandırılması;*

Kaspaz-1 (ICE),

Kaspaz-2 (ICH-1, Nedd-2),

Kaspaz-3 (CPP32, Apopain, Yama), nükleer inhibitör olan deoksiribonükleaz/DNA fragmentasyon faktör 45 (ICAD/DFP-45) ve nükleus içi parçalanmayı sağlayan endonükleaz CAD/DFP-40'ın aktive edilmesini sağlamaktadır,

Kaspaz-4 (ICH-2, TX, ICErel1),

Kaspaz-5 (ICErel11, TY),

Kaspaz-6 (Mch2), apoptotik süreçte nükleusa ait laminlerin ayrıştırılmasında görev almaktadır,

Kaspaz-7 (ICE-LAP3, Mch3, CMH-1),

Kaspaz-8 (FLICE, Mch5, MACH),

Kaspaz-9 (Mch6, ICE-LAP6), dolaylı yoldan kaspaz-2,-6,-8 ve -10'un direkt olarak da kaspaz-3,-7'nin aktivasyonundan sorumludur,

Kaspaz-10 (Mch4),

Kaspaz-11 (ICH-3),

Kaspaz-12 ,

Kaspaz-13 (ERICE),

Kaspaz-14 (MICE),

Kaspaz-3, -6 ve -7 hücrel proteinleri parçaladığından cellat kaspaz/ sonuçlandırıcı kaspaz olarak da adlandırılmaktadır. Kaspaz-2, -8 (FLICE/MACH), -9 ve -10 sinyal iletiminde ve sonuçlandırıcı kaspazların aktivasyonundan sorumlu olduklarından başlatıcı kaspazlar sınıfına girmektedirler (Ulukaya 2003; Öviz 2004).

### 1.3.3. Apoptoz belirleme yöntemleri

Hücre tarafından birçok noktada çok sıkı olarak denetlenen apoptoz sürecinin incelenmesinde, ilişkili birçok protein bulunmaktadır. Bu kaskatta aktivatör, efektör yada regülatör olarak görev alan proteinlerin işlevlerinin tanımlanmış olması, apoptozun belirlenmesindeki yöntem sayısını arttırmıştır. Bu durumun dezavantajı, seçilecek yöntemde bakılan kriter apoptoz karakteristiği gösterirken diğer bir kriterin apoptoz ile nekrozun örtüşen belirtilerinden birini gösterebilmesidir. Seçilecek olan yöntem, uygulanacak örneğe ve tekniğin avantaj- dezavantajlarına dikkat edilerek seçilmelidir (Elmore 2007).

*Morfolojik değişimlerin gözlenmesi;* ışık mikroskobu, floresan mikroskobu, elektron mikroskobu aracılığı ile apoptozun *in vitro* olarak morfolojik değişimlerinin saptanması mümkündür (Huerta ve ark. 2006).

*İmmunohistokimyal yöntemler;* İmmunohistokimyasal apoptoz markerlarının kullanımı çalışmaları kolaylaştırmaktadır. C-CK18 (kırılmış sitokeratin), c-cas-3 (kırılmış kaspaz-3), c-lam A (kırılmış lamin A), gamma H2AX (fosforile edilmiş H2AX histonu), c-PARP (kırılmış poli polimeraz), AIF (apoptoz indükleyici faktör) yaygın olarak kullanılan apoptoz markerlarıdır (Holubec ve ark., 2005). Anneksin V, TUNEL yöntemi, ISEL tekniği, kaspaz-3 yöntemi, MP30, PARP, immunohistokimyasal olarak apoptozun belirlenmesinde kullanılabilir yöntemlerdendir (Huerta ve ark. 2006; Alexandre ve ark. 2000).

*Biyokimyasal yöntemler;* agaroz jel elektroforezi, western blot, flow sitometri yöntemleri kullanılarak apoptoz biyokimyasal olarak saptanabilmektedir (Güleş ve Eren 2008, Üstüner 2010; Overbeeke ve ark. 1998).

*İmmunolojik yöntemler;* ELISA ve fluometrik yöntem apoptozun immunolojik olarak belirlenmesinde kullanılan yöntemlerdir. Elisa yöntemi ile



hem kültüre hücrelerde hemde insan plazmasında meydana gelen DNA fragmantasyonunun ölçümü mümkündür. Kültüre edilen hücrelerde kaspaz aktivitesinin belirlenmesine yönelik yöntemdir (Gle ve ark. 2008; Ulukaya 2003).

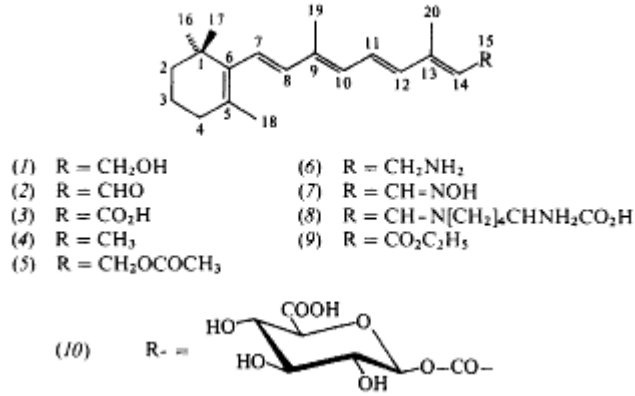
*Moleküler biyoloji yöntemleri;* DNA microarray tekniği, hücre ve dokularda spesifik genleri, gen polimorfizmini, gen ekspresyonlarını, oluşan global değişimleri, inceleyen bir tekniktir. Tekniğin dezavantajı, birden çok veri analizi yapılabildiğinden tüm sonuçların analizlerinin zaman alması, ortaya çıkabilen kompleks sonuçların yorumlanmasında karşılaşılan zorluklar, sonuçların gerektiği kadar kantitatif olmaması ve pahalı bir yöntem olmasıdır (Yolta ve Karaboz 2010).

#### **1.4. Retinoidler**

Vitamin A ve türevleri canlılığın devamı için gerekli olan temel bir vitamindir. Embriyonik gelişim döneminde, spermatogenezde, görme ve hücre farklılaşmasında önemli rolleri vardır (Niles 2000).

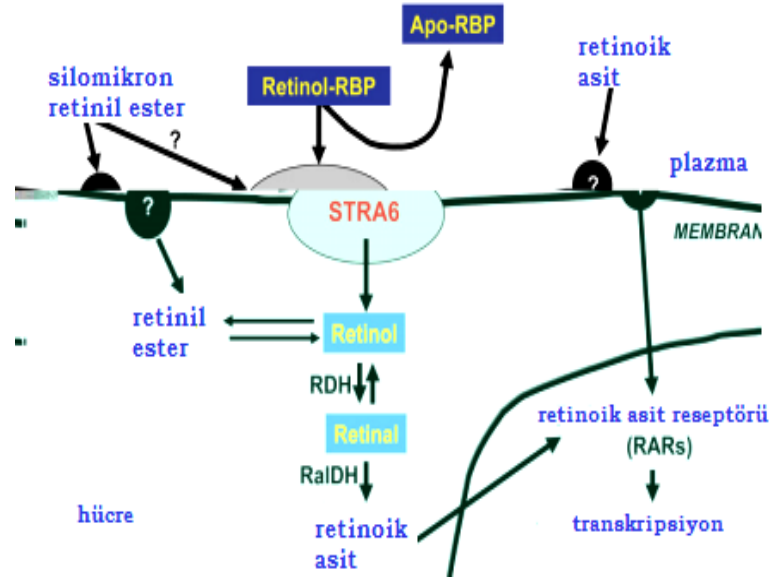
Provitamin A aktivitesine sahip karotenoidler, süt, yumurta gibi hayvansal gıdalarda, yeşil yapraklı sebzelerde yüksek miktarda absorbe edilmiş olarak bulunmaktadır. İnsanda sentezi yapılmayan bu vitamin günlük diyetle retinol, retinil ester ya da  $\beta$ -karoten olarak alınmaktadır. 500 karotenoidin kimyasal analizleri yapılmış ve bunlardan sadece 50 tanesinin vitamin A aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır. Sayılan besin gruplarının % 75-85'ini kapsayan karoten ve  $\beta$ -karoten grupları vitamin A aktivitesi göstermektedir (Carroll ve Kritchevsky 1994; Bushue ve Wan 2010).

IUPAC (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği) tarafından vitaminlerin nomenklatrde yer alması teklifi ilk olarak 1960 yılında getirilmiştir. Teklif kapsamındaki isimler arasında retinol, retinal, retinoik asit ve 3-dehidro analoglarında bulunmaktadır (Dixon 1983).



**Şekil 1.1.** Retinoidlerin C ve H atomlarından oluşan kimyasal yapılarının iskelet formülü (Dixon 1983)

Vitamin A ve kanser gelişimi arasındaki ilişki, vitamin A'nın kimyasal yapısının belirlenmesi ile ortaya konulmuştur. Wolbach ve Howe (1925) yaptıkları çalışmada epitel hücrelerinde vitamin A'nın, hücre çoğalması ve farklılaşması üzerinde etkili olduğunu rapor etmişlerdir. 1950'li yılların sonunda ve 1960'lı yıllarda hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde, vitamin A eksikliğinin tümör oluşumuna yol açtığı, günlük diyetlerine vitamin A eklenen deney hayvanlarında tümör oluşumunda azalma olduğu saptanmıştır. Retinoik asit ve sentetik retinoid türevleri, insanda birçok kanser hücre hattında büyümeyi inhibe etmekte ve apoptoza neden olmaktadır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar insanda, düşük vitamin A/  $\beta$ -karoten seviyesinin akciğer, göğüs, boyun gibi birkaç kanser türünün oluşumuna neden olduğunu göstermiştir (Niles 2004).



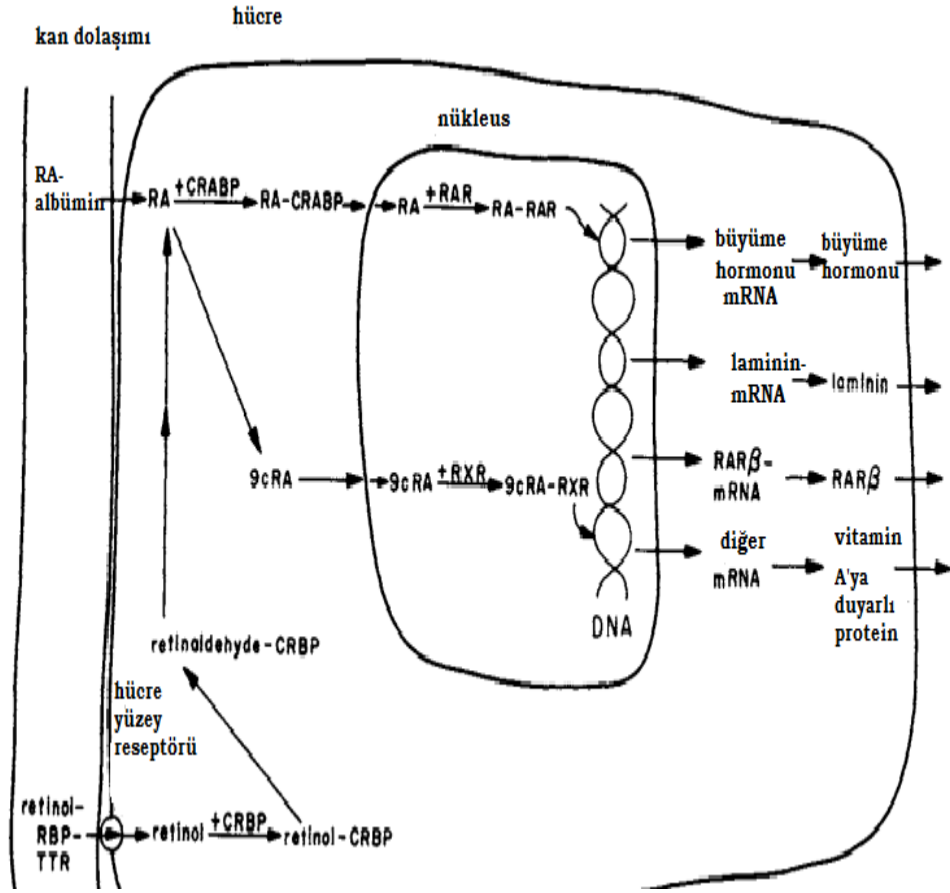
Şekil 1.2. Retinoid metabolizması (Blaner 2007)

Retinoidler vitamin A'nın doğal ya da sentetik türevleridirler. Hayvansal organizmalarda sentezlenemeyen retinoidler, günlük diyetle alınmaktadır. Dolaşımda retinoidler, RBP (retinoid bağlayıcı protein); retinoik asit ise albümine ya da lipoprotein parçacıklarının retinil esterlerine bağlanarak taşınmaktadır. Gıdalardan alınan retinoidlerin % 95'i retinol-RBP olarak dolaşımda taşınmaktadır. STRA6 (retinol bağlayıcı protein reseptör 6), bir hücre yüzey reseptörüdür, dolaşımda RBP'ye bağlı olarak bulunan retinolün, plazma membranından geçmesini sağlamaktadır (Şekil 1.2). Böylece retinol metabolize olacağı bölgeye ulaştırılmış olmaktadır (Blaner 2007).

#### 1.4.1. Retinoik asit reseptörleri ve fonksiyonları

Retinoidler etkilerini nükleer retinoid reseptörlerine bağlanarak göstermektedirler. Retinoik asit RAR reseptörlerine, retinoidler ise RXR reseptörlerine bağlanmaktadır. Retinoid reseptörleri; RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) ve RXR ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) reseptörleri olmak üzere iki çeşittir. Retinolün all trans, 11-cis, 13-cis, 9,13 di-cis, 9 cis ve 11,13 di-cis olmak üzere 6 biyolojik aktif izoformu vardır. Retinoidler özellikle R×R reseptörüne bağlanırlar ki bu reseptör kanser tedavilerinde çok etkilidir. Retinoidler 3 ana bölgeden oluşur; hidrofobik bölge,

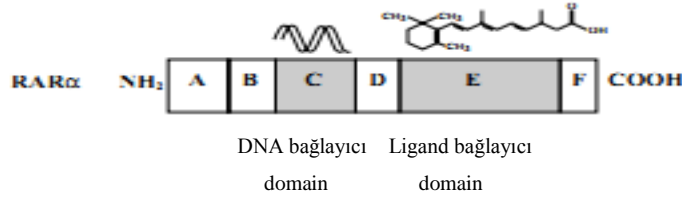
bağlayıcı ünite ve çoğunlukla karboksilik asit ile sonlanan polar bir terminal (Arce F ve ark. 2005; Lopez-Hernandez ve ark. 2003; Bushue ve ark. 2010).



**Şekil 1.3.** Retinoik asidin gen aktivasyonu üzerine etkisi, RA, all-*trans*-retinoik asit; 9 cRA, 9-*cis* retinoik asit; RAR, all-*trans* retinoik asit reseptör proteini; RXR, 9-*cis*-retinoik asit reseptör proteini, mRNA; haberci RNA, RBP; retinol bağlayıcı protein, TTR; transtiretin (Wolf 1997)

Nükleer RAR reseptörlerinin görevi, embriyonik gelişim, farklılaşma gibi farklı süreçlerde ve farklı zamanlarda genlerin aktive edilmesini sağlamaktır. Metabolizmik faaliyetlerin sürdürülmesi için gerekli genlerin aktivasyonu ise RXR reseptörlerince yapılmaktadır (Şekil 1.3). Reseptörlerin sentezi her dokuda, dokunun tipi ve bulunduğu evreye göre farklı olarak sentezlenmektedir. Örneğin RAR $\alpha$  sentezi gelişimin her döneminde, RAR $\beta$  sentezi böbrek, akciğer, kalp gelişimi sırasında; RAR $\gamma$  sentezi ise cilt, kemik ve kıkırdak oluşumu sırasında olmaktadır (Wolf 1997).

Retinoidlerin bağlandıkları reseptörler; steroid, tiroid ve retinoid hormon reseptör ailesine mensuptur. Retinoik asitler promotör bölgedeki retinoide duyarlı moleküllere bağlanarak transkripsiyon faktörü gibi görev alıp, gen transkripsiyonunu arttırmaktadırlar. Retinoid reseptörleri üzerinde A, B, C, D, E ve F ile bölünmüş 6 farklı bölge bulunmaktadır (Şekil 1.4). C domaini sistence zengin DNA'ya bağlanma bölgesidir. E domaini ligand bağlayıcı bölgedir ayrıca bu bölge gerektiğinde diğer farklı bir reseptör ile de dimer oluşturabilmektedir (Adamson 1996).



**Şekil 1.4.** RARα' nın yapısı ve 6 modüler bölgesi (Adamson 1996)

Retinoik asitler nükleer reseptörler ve CRABP (hücrel retinoik asit bağlayıcı proteinler)'ler aracılığı ile hücre faaliyetlerinde etkin rol almaktadırlar. CRABP I ve CRBAP II küçük moleküllü proteinlerdir. % 75 benzer amino asit dizilimine sahip, eşit boyutta proteinlerdir. Yapılan çalışmalarda CRABP'lerin RA'ları endoplazmik retikuluma taşımada görev aldığı ve RA'ların burada ilgili enzimlerce metabolize edildiği saptanmıştır. CRABP II proteinine bütün dokularda rastlanmaktadır ve kontrolü RARE (retinoik asite duyarlı elementler) tarafından yapılmaktadır. *All-trans* RA, *9-cis* RA'ya göre CRABP II'ye çok daha yüksek afinite ile bağlanmaktadır. CRABP'ler sitozolik proteinlerdir ve nükleus üzerinde herhangi bir etkinliğe sahip değildirler. Dokularda CRABP'nın varlığı RA etkisini ve gen ifadesini etkilemektedir (Delva ve ark 1993; Delva ve ark. 1999).

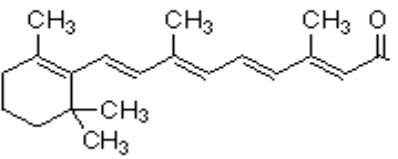
Retinoidlerin uzun dönemli olarak tedavilerde kullanılması, toksik etkinin yanında direnç oluşumuna da neden olmaktadır. Retinoid bağlayıcı reseptörlerin ya da nükleer retinoid reseptörlerindeki fonksiyon ve ifade anomalilikleri, retinoid metabolizmasında meydana gelen hatalar, gibi direnç oluşumuyla sonlanan birçok mekanizmanın nedeni henüz anlaşılammıştır..

Sentetik olarakda üretilen retinoidlerde antikanser aktivite ön plana çıkartılırken, toksik etkiler yok edilmeye çalışılmaktadır (Ortiz 2002).

İnsanda görülen kanser çeşitlerinin çoğunda retinolün retinil esterlerine dönüşümünden ve retinolün alınımından sorumlu olan LRAT (lesitin: retinol açıl transferaz) enziminde azalma mevcuttur. Enzim yeterli seviyede bulunmadığı için tümör hücrelerinde retinol az seviyede bulunmaktadır. Göğüs kanserli hücrelerde retinolün retinoik aside metabolize edilmesini sağlayan RALDH 2 (retin aldehit dehidrogenaz 2) enziminde hasar vardır. Ayrıca tümör hücrelerinde düşük seviyede bulunan retinoik asit artan Cox-2 ekspresyonuyla da ilişkilendirilmektedir. Cox-2 transkripsiyonunda rol alan retinoik asidin hücre içerisinde düşük seviyede bulunması, kolorektal tümörlerde Cox-2 sentezinde artışa neden olmaktadır (Lotan 1996).

#### 1.4.2. ATRA

**Tablo 1.1.** ATRA'nın özellikleri (sigma-aldrich 2011)

<p><b>ATRA</b></p>  <p><b>Sinonimleri</b> ATRA Vitamin A Asit all-trans-Retinoik asit Tretinoin</p> <p><b>Formülü</b> C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub></p> <p><b>Moleküler ağırlık</b> 300,44 g/mol</p>
---

ATRA vitamin A'nın karboksilik asit formudur. ATRA ve 9 *cis*-RA (9*cis*-retinoikasit)nükleer retinoid reseptörlerine bağlanarak gen ifadelerini düzenleyen aktif metabolitlerdir. Günlük diyetle direkt olarak alınamayan ATRA, özellikle embriyonik dönemde hücre büyümesi ve gelişimi üzerine etkilidir. Vitamin A'nın 25 yaşındaki erkek birey için alınması gereken miktarı günlük 900 µg olarak belirlenmiştir. Tolere edilebilir maksimum doz günlük 3000 µg'dır. Miktarın aşılması

organizmaya zarar vermekte hatta ölümcül olabilmektedir. Vitamin A nedeniyle gerçekleşen ilk ölüm 1913 yılında bildirilmiştir. Laboratuvarlarda sentetik olarak da sentezlenen ATRA, akne gibi cilt hastalıklarının tedavisinde ve bazı kanser tiplerinde hem tedavi hemde kanserden korunma amaçlı kullanılmaktadır.

Retinoid ailesine mensup olan ATRA bu nedenle aynı zamanda anti-kanser ilaçları arasında yer almaktadır. Yapılan çalışmalar sonucu ATRA'nın premiyelosit lösemi (APL) tedavisinde başarılı sonuç verdiği rapor edilmiştir. *In vitro* ve *in vivo* olarak yapılan çalışmalarda retinoidlerin, kemoterapötik ajanlarla kombinasyon uygulamalarında sinerjik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. ATRA ve 13-*cis*-RA'nın *in vitro* da boyun, göğüs, ovaryum ve kronik miyelojen lösemide, IFN $\alpha$  (interferon  $\alpha$ ) ile birlikte uygulanması olumlu sonuçlar vermiştir. Retinoidlerin, sisplatin, taksol/paklitaksel, etoposid, vinoblastin, gempitabin gibi kemoterapötiklerle kombinasyonu, tedavilerde sıklıkla kullanılmaktadır (Ortiz ve ark. 2002; Siddikuzzaman ve Grace 2011; Alique ve ark. 2007).

Mikroarray çalışmaları ATRA'nın hücrelerde; farklılaşma, oksidaz aktivasyonu ve adezyon moleküllerinden sorumlu gen bölgelerinin ifadelerinde artışa neden olduğunu göstermektedir. ATRA çeşitli birçok kanser hücre hattında büyümeyi durdurmakta ve farklılaşmaya neden olmaktadır. Literatürde ATRA'nın kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanıldığında, sitotoksik etkiyi arttırdığından sıklıkla bahsedilmektedir. ATRA, zelodronik asit ile kombine edildiğinde ovaryum kanser hücreleri üzerinde sinerjik sitotoksik etki göstermektedir. Ayrıca bu kombinasyonun apoptozu da sinerjik olarak indüklediği rapor edilmiştir (Jian ve ark. 2011; Karabulut ve ark. 2010).

RAR $\alpha$  reseptörlerini kodlayan gen bölgesinin yeri 1987 yılında gen haritasında 17q21 olarak belirlenmiştir (Siddikuzzaman ve Grace 2011).

Memelilerde gelişim için önemli olan ATRA, embriyo gelişiminin erken evrelerinde pankreas üzerinde de çok önemli etkilere sahiptir. Retinoik asitlerin sentezlenmesinden sorumlu Radlhl enzimi, insanda fetal dönem boyunca pankreasda pankreatik  $\beta$ -hücrelerinin bulunduğu bölgede bulunmaktadır. Radlhl enzimi retinoik asit sentezinin olduğu spesifik dokularda bulunmaktadır. Bu bulgular retinoik asitin, pankreatik  $\beta$ -hücrelerinin olgunlaşmasında rol aldığını düşündürmektedir (Ng ve ark. 2011).

Bir retinoid olan ATRA, yapılan *in vitro* çalışmalarda birçok tümör hücre hattında hücre çoğalmasını inhibe etmekte ve hücrelerde farklılaşmaya neden olmaktadır. ATRA, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisinde standart kemoterapötikler ile kombine edilerek kullanıldığında olumlu sonuçlar

vermektedir. Bu nedenle ATRA'nın Paklitaksel ile birlikte uygulanması ile kemoterapide daha etkin sonuçlar alınacağı düşünülmektedir (Hou ve ark. 2011).

ATRA ve retinoik asit izoformları nöronal farklılaşmayı indüklediklerinden, *in vitro* da nöroblastom farklılaşma modellerinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Fizyolojik konsantrasyonlarda ATRA ile muamele edilen hücrelerde nöritik sürece giren hücre sayısında artma meydana geldiği ve hücrelerde genel olarak büyümenin durduğu belirgin bir biçimde görülmektedir. ATRA, c-Jun N-terminal kinaz ve fosfatidilinositol 3-kinaz gibi protein kinazları hızlıca aktive etmektedir. Protein kinaz aktivasyonu sinir hücrelerinde hızlıca değişime neden olmaktadır. Ayrıca retinoik asit, fosfotaz-1, protein fosfotaz 2A ve protein fosfotaz 2B gibi mitozu aktive edici protein fosfotazları da aktive etmektedir (Mandili ve ark. 2011).

Birçok tümör çeşidinde hücrelerin farklılaşmasını sağlayan ATRA, insanda beyin tümör hücrelerinde de farklılaşmaya neden olmaktadır. Yapılan çalışmada, beyin tümör hücrelerinde farklılaşma süreci boyunca RXR  $\alpha$  ve p21'e ait mRNA seviyesinde artış olduğu rapor edilmiştir (Qing-xi Liu ve ark. 2011).

Akut promiyelositik lösemi (APL) tedavisinde sıklıkla kullanılan ATRA aynı zamanda hücreler üzerinde az toksisite gösteren bir moleküldür. Bir retinoid türevidir olan 13-cis-RA'nın, eşit dozlarda APL tedavisinde ATRA kadar etkili olmadığı rapor edilmiştir. ATRA kullanıldığı tedavilerde hızlıca etkisini göstermekte ve tedaviden birkaç gün sonra yarı ömründe önemli miktarlarda azalma meydana gelmektedir (Reynold ve ark. 2003).

Vitamin A ve retinoidler servikal hücre büyümesinde de etkindirler. Yapılan klinik çalışmalar, çeşitli retinoidlerin serviks kanser hücrelerinde büyümeyi engellediğini göstermektedir. HPV virüsünün neden olduğu serviks kanserinde serumda bulunan ATRA seviyesinde azalma olduğu rapor edilmiştir (Siddikuzzaman ve Grace 2011).



## 1.5. Sitotoksisite

Satışa sürülen ilaçların % 90'ının pazardan geri çekilmesinin ve geliştirilen ilaçların 3'te birinin klinik faz denemelerde başarısızlığa uğramasının altında yatan neden toksisitedir. Önerilen çözümlerden birisi klinik denemelere geçmeden önce ilaçların toksik olmadığına kesinleştirilmesidir. Hücre hattı kullanılarak yapılan *in vitro* sitotoksisite çalışmaları, test maddelerinin sitotoksik etkilerinin en iyi tanımlanmasına paralel olacak şekilde yapılmaktadır (Langdon ve ark. 2010).

Kanser tedavisinde yeni ajanların geliştirilmesinde kullanılan yöntemler bazen zaman ve malzeme sarfından daha ileriye gitmemiştir. Literatür taramasıyla hücre hatlarında daha önce denenmemiş ajanların *in vitro* olarak denenmeye başlanması klinik denemelere geçildiğinde başarısız sonuçlar alınmasına neden olmuştur. Tümör biyolojisi ve moleküler mekanizmaların anlaşılmasıyla birlikte bazı kriterler göz önüne alınmaya başlanmıştır (Bono ve ark. 2003).

### 1.5.1. Sitotoksisite çalışmalarında hücre kültürlerinin kullanılması

Hücre hatları kullanılarak yapılan sitotoksisite çalışmalarında ilaç bileşenlerinin hücre içerisine ne kadarının hangi şartlarda alınacağı ve de hücresel çevrede nasıl hareket edeceklerinin taraması yapılabilmektedir. Böylece bileşenin hedef proteine bağlanmasını tetikleyen ya da engelleyen mekanizmalar gözlemlenebilmekte ve buna alternatif seçeneklerle çalışmaya yön verilebilmektedir. Yüksek duyarlılık gösterilen sitotoksik bir ajanın neden olabileceği maksimum ve minimum zararlar bu çalışmalar sayesinde tanımlanabilmektedir (Halis ve ark. 2007).

Sitotoksisite taramaları farklı türlere ait hücreler üzerinde ya da aynı türe ait farklı hücre hatları kullanılarak uygulanabilmektedir. Böylece temel hedefe kadar birçok sonuç *in vitro* olarak toksisite bakımından karşılaştırılarak incelenmiş olmaktadır (Langdon ve ark. 2010).

Hücre canlılığı ve proliferasyonunun saptanmasında kullanılmak üzere geliştirilmiş birkaç yöntem vardır. Bu yöntemlerin uygulanması esnasında

kullanılmak üzere tasarlanmış 96 kuyucuklu plakalar birçok örneğin aynı anda ve hızlıca analizleri açısından çok kullanışlıdır. ELISA plate okuyucu ya da mikrotiterplate kullanılarak örneklerin kolorimetrik ya da ışımaya tayinleri yapılabilmektedir. Sitotoksitenin belirlenmesi, hücre ölümü ya da proliferasyonu gibi farklı parametrelerde ölçüm yapılarak saptanabilmektedir. Sitotoksitenin belirlenmesinde, LDH aktivitesinin ölçümü, MTT testi, nötral red ve ATP ölçümüne bağlı teknik, en çok kullanılan yöntemler arasında sayılabilmektedir (Weyermann ve ark. 2005).

### **1.5.2. Kanser tedavisinde hedeflenen mekanizmalar ve yeni ilaç kombinasyonları**

Tümör hücre çoğalması, motilite, invazyon ve metastazdaki moleküler mekanizmaların anlaşılması, tedavideki hedeflerin tanımlanabilmesine olanak sağlamaktadır. Bu anlamda kanser tedavisinde farklı hedeflerin belirlenmesi, yeni selektif ilaç buluşunda ve geliştirilmesinde anahtar rolü oynamaktadır. Spesifik mutasyon, belirlenmiş proteinler ya da sinyal yolları gibi etki etmesi düşünülen durumları içeren hasta grubunun belirlenmesi yeni ilaçların uygulanmasında atılan ilk adımdır ( Broxterman ve Georgopapadaku 2005).

Tümör damar sistemi hedeflendiğinde, Bevacizumab gibi anti-VEGF monoklonal antibodylerin ya da VEGF R2' yi bloke eden ajanların sitotoksik tedavilerde kombinasyon olarak kullanılması ile kan akışının normalizasyonunun sağlanmakta, sitotoksik ajanların hedefe daha iyi ulaşabildiği düşünülmektedir (Willett ve ark. 2004).

Tümör-stroma etkileşimi sonucu hücrelerinin sinyalizasyonu CAM (hücre adezyon molekülleri) kaynaklı ilaç direncinin ortaya çıkmasında büyük rol oynamaktadır. Ovaryum kanser hücrelerinde meydana gelen cisplatin direnci bu duruma örnek olarak verilebilmektedir. Aktifleşen Akt ve  $\beta$ -katenin yolları vasıtasıyla adipositlerde salınan sinyal sonucu kollajen tip VI oluşumunun, cisplatin direncinde rolü vardır (Damiano ve ark. 1999; Broxterman ve Georgopapadaku 2005; Iyengar ve ark. 2005).

## 1.6.Çalışmada Kullanılan OVCAR-3 Hücrelerinin Özellikleri

OVCAR-3 yüksek metaztas yeteneğine sahip, ilaç rezistansını gösteren insan ovaryum kanser hücre hattıdır. Bu yüzden birçok antikanser ajanın etki ve mekanizmalarının çalışılmasında uygun bulunmaktadır (Karabulut ve ark. 2010). Hücreler anormal karyotipe sahiptirler. Adriamisin, melfalan ve sisplatin karşı direnç göstermektedirler. Hem kültüre edilen hücrelerde hemde ksenogreflerde östrojen ve androjen reseptörleri belirlenmiş olup ksenogref modeller, insan ovaryum karsinomasının 17-beta-estradiol ile muamelesi sonucu progesteron reseptörlerinin indüklendiğini göstermektedir. Ayrıca hormon reseptörlerinin varlığı hormonal tedavi çalışmaları içinde kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır (Hamilton ve ark.1983).

## 1.7.Çalışmada Kullanılan Yöntemler

### 1.7.1. Mitokondriyal aktiviteye bağlı MTT testi

MTT tekniği Mossman tarafından 1983 yılında geliştirilmiş, *in vitro* hücre kültür araştırmalarında en sık kullanılan biyolojik tayin yöntemlerinden birisidir. Sarı renkli çözünebilir tetrazolium tuzu, yaşayan hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzimi tarafından, mor renkli çözünemeyen formazan kristallerine dönüştürülmektedir. MTT testi, hücre canlılığını ve metabolik aktiviteyi ölçen, hızlı, kantitatif, tekrarlanabilir, kolorimetrik bir testtir (Çetin ve Bullerman 2005).

İlaç duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan MTT testi yeni antikanser ilaç taramalarında kullanılmaktadır (Campling ve ark. 1991).

Hücreler ilaçlı ya da ilaçsız medyum içerikleri ile inkübasyona bırakılmaktadır. Hücre replikasyonun ya da ilaç indüklü hücre ölümünün gerçekleşebilmesi için hücreler yeterli sürede inkübasyona maruz kalmalıdır. MTT (3-(4,5dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solüsyonu ilave edilen hücrelerde oluşan formazan kristallerinin çözülebilmesi için DMSO (dimetilsülfoksit) ilave edilmektedir. Ardından 540 nm'deki absorbanları ölçülmektedir (Carmicheal ve ark. 1985).

### **1.7.2. DAPI boyama (Fluoresan boyama ile morfolojik inceleme)**

DAPI (4-6 diamidino- phenylindole), ilk olarak Dann ve arkadaşları tarafından sentezlenmiştir (Bonnet ve ark. 1984).

DAPI bileşikleri polifosfatlara ve DNA gibi linear polimerlere yüksek spesifite göstererek bağlanabilmekte ve floresan ışımaya yapmaktadır. DAPI çift zincirli DNA'da A-T içeren eşleşme bölgelerine öncelikli olarak bağlanmaktadır. DAPI sitoflorometrik DNA probu olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Mycoplasma DNA'larına bağlanarak hücre kültürlerinde kontaminasyonun belirlenmesinde sitokimyasal prob olarak kullanılabilir (Bonnet ve ark. 1984; Coleman ve ark. 1979).

DAPI ayrıca dimerik ve polimerik tübinlere farklı afiniteler göstererek bağlanabilmektedir. Böylece DAPI, görüntülenmesinde de kullanılabilir (Bonnet ve ark. 1984).

### **1.7.3. Kaspaz-3 elisa kolorimetrik testi**

İnternal ve eksternal yolla başlayan apoptozda ortak olan, kaspaz-3'ün aktive edilmesidir. Apoptoz varlığının saptanılması çalışılan hücre ya da dokuda, kaspaz-3 aktivasyonu ya da apoptozise neden olan ajanın kaspaz-3'ü aktive edip etmediği bu yöntem ile belirlenebilmektedir. Monoklonal antibadi kullanımı hem aktive olmuş kaspaz-3 hemde diğer bütün kaspazlar için immunositokimyasal, immunohistokimyasal, ELİSA ve flow sitometrik analizlere olanak sağlamaktadır (Ghobrial ve ark. 2005; Ulukaya 2003; Huerta ve ark. 2006).

Yöntemin esası aktif kaspaz-3'ün görüntülenebileceği bir substrat ile bağlanmasıdır. Kullanılan sentetik substratlar flurojenik veya kromojenik gruplar bağlanmış uygun peptitlerdir. Hazırlanan lizatların veya hücre fraksiyonlarının protein içerikleri kontrol edilmektedir. Uygun flurojenik veya kromojenik grupların bağlı olduğu substratlar en son olarak ortama eklenmektedir (Kaufmann ve ark. 2008).

#### 1.7.4. PCR ve RT-PCR yöntemi

PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) tekniği ile istenilen DNA bölgesinin çok sayıda kopyası elde edilebilmektedir. 1970'lerde DNA'ların küçük parçalara kesilmesini sağlayan endonükleazların keşfi ile istenilen DNA bölgesine uygun işaretli oligonükleotid kullanılarak, kopya oluşturmak olanaklı hale gelmiştir. Bu yöntem moleküler biyologlara oldukça kolaylık sağlamaktadır. 10 kb (kilobaz)'a kadar uzunlukta olan bölgelerin çoğaltılabildiği PCR yöntemi ile 40 kb'a kadar olan bölgelerin de çoğaltılabilmesi mümkündür (Mullis 1990; Birben 2006).

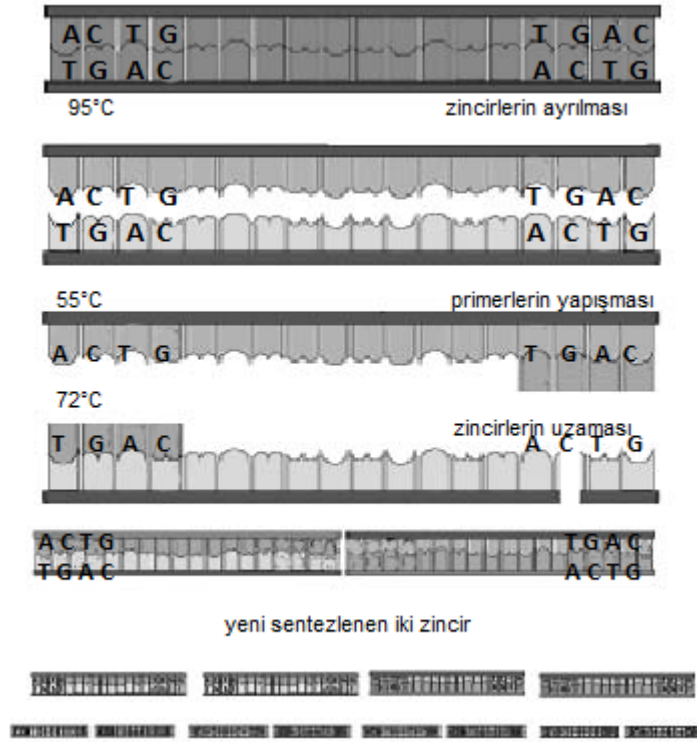
Kopyası yapılacak DNA bölgesi, kopyalanılacak bölgenin başlangıcı ve sonunu belirten primerler, DNA polimeraz enzimi, yeni zincir sentezinde kullanılacak nükleotid trifosfatlar, DNA-pol için gerekli ortamı sağlayan tampon çözelti, PCR'ın temel bileşenlerini oluşturmaktadır (Birben 2006).

PCR tekniğinin temel olarak 3 aşaması vardır;

*Denatürasyon;* çoğaltılmak istenilen gen bölgesinin bulunduğu DNA, 94-95<sup>0</sup>C'de tutularak, çift sarmal yapısının açılması sağlanmaktadır (Masny ve Plucienniczak 2003).

*Primerlerin bağlanması;* reaksiyon sıcaklığı 55-60<sup>0</sup>C'ye düşürülür, primerler açılan DNA bölgelerinde karşılık gelen yerlere bağlanmaktadır. Bu aşamanın süresi kopyalanmak istenilen bölgenin baz uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir (Innis ve Gelfand 1990).

*Primer uzaması;* Taq DNA polimeraz enzimi vasıtası ile zincir üzerine bağlanan primerler uzatılmaktadır. Taq DNA polimeraz enziminin optimal çalışma sıcaklığı 70-75<sup>0</sup>C olduğundan kopyalanacak bölgenin çoğaltılması bu sıcaklık aralığında yapılabilmektedir (Barnes 1994).



Şekil 1.5. PCR reaksiyonunun şematik olarak gösterilmesi (Birben 2006)

Denatürasyon, primer bağlanması ve primerlerin uzamasından oluşan işlemler dizisi bir PCR döngüsünü ifade etmektedir (Şekil 1.5). Kalıp DNA kopyasının elde edilebilmesi için PCR döngüsü 25-40 kez tekrarlanmaktadır. 40 döngünün üstüne çıkıldığında spesifik olmayan bağlanmalar olabileceğinden PCR sonuçlarının hatalı olma riski çok fazladır (Innis ve Gelfand 1990).

PCR sonucunda elde edilen kopya DNA'lar poliakrilamid jelde veya agaroz jelde yürütülmektedir. Ayrıca ürünlerin miktarı yapılan kapiler elektroforez ile de belirlenebilmektedir. (Heid ve ark. 1996).

PCR tekniği, DNA dizi analizi ve DNA haritalamasında, insan genom projesi araştırmalarında, adli tıp örneklerinin genetik olarak değerlendirilmesinde, DNA parmak analizinde, doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesinde, gen ifadelerinin karşılaştırılmasında ve tohum saflığının belirlenmesi gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Birben 2006).

Yöntemin dezavantajları arasında ürünün beklenenden az alınması ya da hiç alınmaması, primerlerin yanlış bağlanması gibi teknik hataların yanı sıra, tekniğin pahalı olması, çok iyi eğitim almış personel gerekliliği ve

kontaminasyondan dolayı yanlış sonuçlar alınabilmesi sayılabilmektedir (Yılmaz ve Devran 2003).

Birçok alanda kullanılan PCR tekniğinde ciddi anlamda sınırlamalar bulunmaktadır. DNA dizisinin çoğaltılması ardından meydana gelen ürün miktarının ölçümü oldukça zordur. Bu sınırlama 1992 yılında Higuchi ve arkadaşlarının gerçek zamanlı PCR'ı geliştirmeleri ile ortadan kalkmıştır (Kubista ve ark. 2006).

### 1.7.5. RT-PCR

RT-PCR yönteminde temel olan iki bileşen vardır; bunlardan ilki, 5' → 3' ekzonükleaz aktivitesine sahip Taq polimeraz enzimidir. Isıya dayanıklı olan Taq polimeraz enzimi *Thermus aquaticus*'dan elde edilmiştir. 3' → 5' ekzonükleaz aktivitesi olmayan enzim, sentezi başlatabilmek için primerlere (hedef diziye bağlanma özelliğine sahip kısa DNA parçası) ihtiyaç duymaktadır. Hedef bölgenin sentezi primerin serbest olan 3' hidroksil grubuna bağlanan dNTP'ler ile 5' → 3' yönünde gerçekleştirilmektedir. İkinci bileşen ise işaretli oligonükleotit problemlerdir. Kullanılan bu problemlerin özelliği kırılma esnasında floresan sinyal yaymalarıdır (Devrim ve Kaya 2004; Giulietti ve ark. 2001).

RT-PCR (Real-Time polimeraz zincir reaksiyonu) tekniği tümör markerlarının saptanmasında kullanılmaktadır. Bu teknik ile ilgilenilen gen bölgesi kopyalarının sayısal değerlere dönüştürülerek ölçülmesi mümkün hale gelmiştir (ChangXin ve ark. 2008; Livak ve Schmittgen 2001).

Gen anlatım seviyelerinin ölçülmesi, gen fonksiyonu hakkında çok önemli bilgiler sağlamaktadır. Hata oranı sıfır olan bir ölçüm ile hücre ya da doku tipi saptanabilmekte ya da genin ifade edildiği yer, bireye özgün gen ifade seviyeleri gibi biyolojik özellikler belirlenebilmektedir. Northern blot gibi analizlerle ulaşılmaya çalışılan gen ifadelerinin seviyeleri hem güvenilirlikleri açısından hem de çok zaman almaları açısından dezavantajlara sahiptirler.

Bu teknikle, az miktar örnekle çalışılabilmektedir. Tekrar edilebilme ve aynı anda birden fazla gen çeşidi için sonuç alınabilme açısından diğer yöntemlerden çok daha avantajlıdır (Fraga ve ark. 2008).

**Tablo 1.2.** PCR çeşitleri (Yılmaz ve Devran 2011; Fraga 2008; Chang Xing 2008; Birben 2006)

PCR TİPİ	HEDEF	UYGULAMA	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
Klasik	DNA	DNA dizilerinin çoğaltılması	Az miktarda DNA'dan çok miktarda ürün alınabilmesi	Başlangıçta pahalı ekipman gereksinimi
Real Time	DNA	Gen anlatım seviyelerinin ölçülmesi, tümör markerlarının saptanması	Tekrar edilebilir ve birden fazla gen çeşidi için sonuç alınabilme	Pahalı bir tekniktir, çok iyi eğitilmiş personel gerektirir
Multiplex	DNA	Virüs ve viroidlerin genlerinin çoğaltılmasında kullanılmaktadır	Çok sayıda hedef gen aynı anda çoğaltılabilmektedir	Hassasiyeti ve özgünlüğü düşüktür
Nested	DNA	İlk çoğaltma işleminde bir set dış primer kullanılarak hedef molekülden daha uzun daha sonra kullanılan bir iç primerle ikinci bir tüp içerisinde hedeflenen bölge çoğaltılmaktadır	PCR tekniğinden daha hassastır	İlk çoğaltma sonrası ürünün diğer tüpe taşınması nedeniyle yanlış pozitif sonuç alma ihtimali var
Reverse Transkripsiyon	mRNA, tRNA, viral RNA veya viroid RNA	Hedef RNA'dan önce c DNA elde edilmekte ardından, klasik PCR yöntemi ile bu bölge çoğaltılmaktadır	Tüm RNA'lerden başlanarak hedef bölgeye ulaşılabilmektedir	Kontaminasyon riski, hatalı sonuç

### ***Kantifikasyon metotları***

#### ***Rölatif Kantifikasyon***

Ekspresyondaki rölatif farklılıkların belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden birisi PCR ürünlerindeki ilk önemli artış noktası olarak kabul edilen rölatif  $C_T$  (threshold cycle) yaklaşımıdır. Bu metotta farklı deney gruplarından elde edilen  $C_T$  verilerindeki farklar baz alınmaktadır (Walker 2001).



### *Rastgele Seçimli Kantifikasyon*

Karşılaştırılmak istenilen örnekler için uygulanan PCR tekniği boyunca, ortaya çıkan herhangi bir eğrinin yada sonucun baz alınarak, örnekler arası farklılıkların belirlenmesidir. Bu yöntemde genellikle kullanılan metot, PCR reaksiyonu boyunca oluşan ürünün kopya sayısı ile aynı PCR reaksiyonu boyunca oluşan standart bir kopya sayısının karşılaştırılmasıdır (Walker 2001).

### *Mutlak Kantifikasyon*

Bu metotta kullanılan standardı bilinen bir kopya sayısıdır. Bu DNA kantifikasyonu ise bir plasmid ya da gen fragmentine ait amplikonunun UV spektroskopi ya da diğer yöntemler kullanılarak ölçülmesi ile belirlenmektedir. Eğer RNA ise eksternal total RNA'nın ters transkripsiyon PCR gibi uygun bir yöntem uygulanarak standart miktar ölçümünün yapılmasıdır (Walker 2001).

#### **1.7.5.1. Kantitatif Real-Time PCR yöntemi**

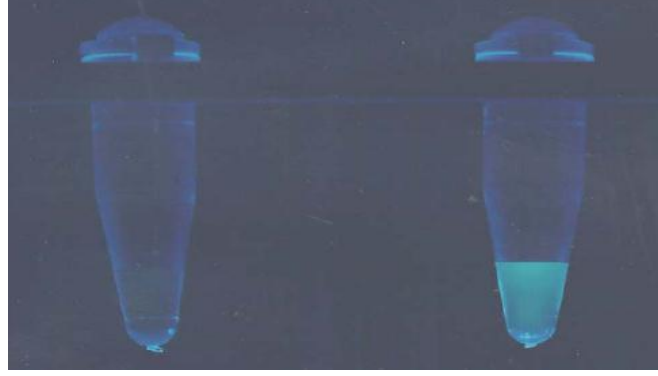
Bilim ve tıp alanında kullanılan en önemli tekniklerden biri olan Real Time PCR ile nükleik asitlerin analizleri yapılabilmektedir. Bu teknik 80'li yılların ortasında Kary Mullis ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Tekniğin bilinen PCR yönteminden farkı, istenilen DNA dizilerinin eş zamanlı olarak çoğaltılarak miktarının belirlenebilmesidir. Amplifikasyon basamakları floresans boya ve probalar yardımı ile görüntülenebilmekte, ürün miktar analizi de yapılabilmektedir. Klasik PCR yöntemi bu anlamda istenilen DNA dizisinin çoğaltılması, ürün analizinin yapılması gibi birçok sınırlamalara sahiptir (Kubista ve ark. 2006).

Yöntem hız, verimli ürün alınabilme açısından, diğer kantifikasyon yöntemleri olan northern-blot, ribonükleaz koruma testi (ribonuclease protection assay) gibi tekniklerden daha avantajlıdır (Vandesompele ve ark. 2002).

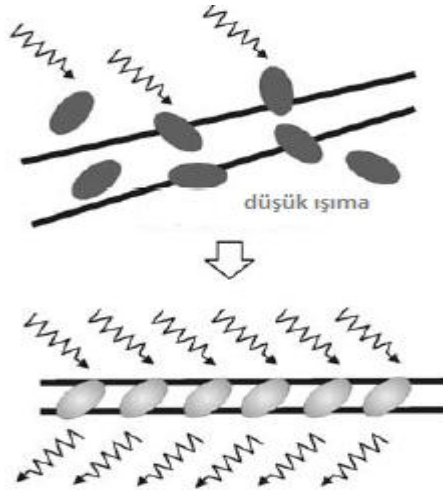
#### **1.7.5.2. Real-Time PCR için kullanılan probalar**

Real-Time PCR sistemleri, reaksiyondaki PCR ürün miktarı ile sistem içerisinde kullanılan belirleyici bir floresan boyadan alınan boya miktarı

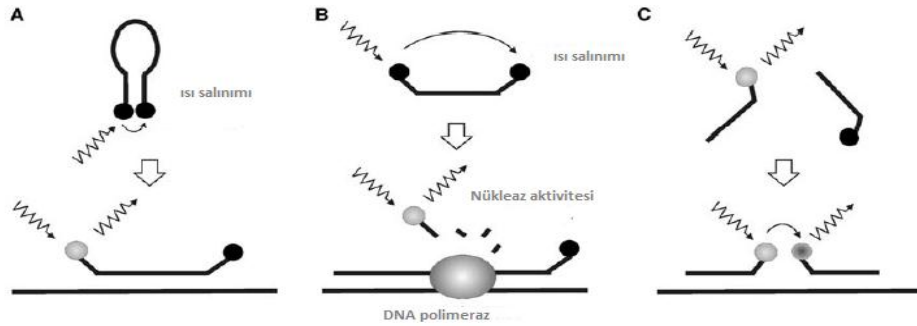
arasındaki orantı esasına dayalı olarak çalışmaktadır. DNA ile tüplere eklenen problr, bağlanmanın ardından floresan ışımaya yaymaktadır (Şekil 1.6) (Kubista ve ark. 2006).



Şekil 1.6. DNA'ya bağlanmamış ve bağlanmış problr (Kubista ve ark. 2006)



Şekil 1.7. Dizi-spesifik olmayan boyalar (Kubista ve ark. 2006)



Şekil 1.8. A) Moleküler beacon, B) Taqman prob, C) hibridizasyon probu (Kubista ve ark.2006)

Floresan ışımının saptanması, RT-PCR tekniğinde ürünlerin belirlenmesinde kullanılan önemli bir metottur (Şekil 1.7 ve Şekil 1.8) Bu amaçla dizi spesifik problar yada dizi spesifik olmayan etiketlemeler kullanılabilir (Kubista ve ark. 2006).

### **1.7.5.3. Dizi spesifik olmayan floresan boyalar**

Sentezlenen PCR ürünlerinin saptanmasında kullanılan floresansa dayalı yöntemlerden biri DNA bağlayıcı bir boya olan SYBR Green I kullanımıdır. SYBR Green I, çift zincirli DNA'ya bağlanabilme özelliğindedir. SYBR Green istenmeyen dizilere de bağlanma gösterebildiğinden, ürün miktarının belirlenmesinde hatalı sonuçlar alınmasına neden olabilmektedir. SYBR Green I kullanımı, fluorogenik prob kullanımına göre çok daha basit ve ucuzdur. Fakat fluorogenik problar çok daha duyarlı ve spesifik olarak bağlanmayı gerçekleştirmektedir (Yin ve ark. 2001; Walker 2001; Pfaffl 2000).

### **1.7.5.4. Dizi spesifik floresan problar**

#### *FRET (floresan rezonans enerji transferi) PROBLARI*

FRET problarında, verici florofordan alıcı florofora enerji iletilmektedir. Verici floroforun mavi ışıkla uyarılması sonucunda enerji transferi gerçekleşmektedir. Beklenen sonucun alınabilmesi için verici ve alıcı molekül arası uzaklık uygun olmalı, alıcı ve vericinin absorpsiyon ve yayılım spektrumları benzer olmalı ve de verici ile alıcının dipol geçişleri mümkün olduğunca birbirine paralel olmalıdır (Weighardt 2011).

#### *Degredasyon Probları (TaqMan Prensibi)*

PCR ürünlerini belirlemek için floresansa dayalı yöntemlerden birisi 5' ve 3' uçları florokrom maddelerle işaretlenmiş prob kullanılmasıdır. Tasarlanmış bu probların 5' ucunda haberci florokrom (6-carboxyfluorescein=6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine=TAMRA) bulunmaktadır. Prob, hedef molekülde primerlerin bağlandığı bölgenin ortasına

bağlanmakta ve kalıp zincir ile prob arasındaki hibridizasyon sona erinceye kadar haberci florokromun sinyalizasyonu baskılayıcı florokrom tarafından baskılanmaktadır (Şekil 1.8.B). *Taq* DNA polimeraz enziminin probu 5' uçtan yıkmaya başlaması ile serbest kalan haberci florokrom ışımaya başlamaktadır (Grove 1999).

#### *Moleküler Beacon (ikaz)*

Bu DNA problemleri halka ve gövde yapısı içermektedir. Halka yapısı ile spesifik hedefine bağlanan probun 5' ve 3' uçları, haberci ve söndürücü boyalara kovalent olarak bağlanacak şekilde tasarlanmıştır. Hedefe uygun komplementer varlığında probun halka yapısı açılarak hedef ile hibridize olmaktadır (Şekil 1.8.A). Halka yapısı kapandığında haberci ve söndürücü uçlar yaklaşmakta ve haberci tarafından yayılan tüm fotonlar söndürücü tarafından emilmektedir (Weighardt 2011).

Bu yöntemler dışında spesifik prob sekanslarını içeren scorpion prob aileleri de yapılacak çalışmaya uygun olarak kullanılabilir (Weighardt 2011).

### **1.8. Çalışmada Anlatım Seviyeleri İncelenen Genler; 18S r RNA, COX-2, VEGF, IRS-1 ve Ki-67**

#### **1.8.1. 18S rRNA**

Ribozom yapılarının % 60'ını oluşturan r RNA'lar, ökaryotik hücrenin % 80-85'ini meydana getirmektedirler. rRNA'lar nükleolusdaki 13, 14, 15, 21 ve 22. kromozomların satellit saplarındaki DNA bölgelerinden kopyalanmaktadır. Bu gen bölgelerinin transkribe ettiği 45 S'lik RNA öncül RNA'dır ve bu RNA'dan 5.8, 18S ve 28 S'lik rRNA'lar oluşturulmaktadır. 1.9 kb uzunluğa sahip olan 18S rRNA, ribozomun küçük alt biriminin oluşturulmasından sorumludur (Güneş 2003).

Gen ifadelerinin belirlenmesinde kontrol grubu olarak sekeeping genler kullanılmaktadır. Seçilen bu genlerin transkripsiyon düzeylerinin deneysel koşullardan etkilenmediği düşünülmektedir. 18S rRNA, gen anlatım seviyelerinin

incelenmesinde sıklıkla kullanılan housekeeping genlerden birisidir. Kantitatif RT-PCR yönteminde 18S rRNA, karşılaştırılan diğer housekeeping genlere göre, deney koşullarından en az etkilenmekte ve daha az bozulmaya uğramaktadır (Al-Bader ve Al-Sarraf 2005; Lossos ve ark. 2003).

### 1.8.2. COX-2

COX (siklooksijenaz) enzimi araşidonik asidin prostoglandinlere dönüşümünü sağlamaktadır. COX enziminin bugün tanımlanmış iki izoformu bulunmaktadır (Fu ve ark. 2004). COX-1 ve COX-2 enzimleri benzer protein yapılarına sahiptirler fakat ayrı genler tarafından sentezlenmektedirler. Her ikisi de farklı biyolojik fonksiyonlarda görev almaktadırlar (Pires ve ark. 2010). COX-1 enzimi temel olarak sentezlenen bir enzimdir. Fakat COX-2 enzim sentezi, büyüme faktörleri, sitokinler ve tümör promotörler aracılığı ile indüklenmektedir. İnsanda birçok tümör tipinde COX-2 ifadesinin oldukça arttığı rapor edilmiştir (Fu ve ark. 2004).

Prostoglandinler araşidonat metabolizması sonucu oluşmaktadır. Sentezledikleri memeli dokularında birçok metabolik aktivitelere katılmaktadırlar. Vazokonstriksiyon, trombosit aktivasyonu ya da inhibisyonu, immünolojik değişimler özellikle immünoşüpresyon rol aldıkları biyolojik aktiviteler arasındadır. Tümör gelişimi ve büyümesi üzerine etkileri vardır. Hem normal dokularda hem de tümörlü dokularda sitotoksik ajanlara, iyonize radyasyona karşı verilen tepkilerde görev almaktadırlar. COX enzimi hücre zarında bulunan fosfolipidlerden araşidonik asit oluşumu buradan da prostaglandin yapımında görev almaktadır. COX-2 enzimi prostaglandinlerin prekürsörü olan PGH<sub>2</sub> (prostoglandin H<sub>2</sub>) oluşumunda hız kısıtlayıcı bir enzimdir. PGH<sub>2</sub> tromboksan gibi diğer birçok endojen moleküllerin öncüsüdür (Dempke ve ark. 2001).

Hücre kültürlerinde ve fareler üzerinde yapılan kanser çalışmaları COX-2 ekspresyonundaki artışın;

- malignant fenotipinde birçok değişime neden olduğunu,
- düzensiz hücre büyümesi ve proliferasyonuna yol açtığını,

- oluşturdıkları kan damarları sayesinde apoptozisten kaçabilme ve metastaz yeteneği kazandıklarını,
- konağın, immün sisteminin gözetiminden kaçabilme yeteneği kazandırdığı belirtilmektedir (Rizzo 2010).

Kolorektal adenomada COX-2 ekspresyonu % 40 artış gösterirken, adenokarsinom vakalarında bu oran % 80'dir. Bu nedenle kolorektal kanser vakalarında non steroid antiinflamatuvar ilaçlar (NSAID)'ın kullanımı çok yaygındır (Strillacci ve ark. 2009).

COX-2'nin tümörlerdeki fazla ekspresyonu VEGF miktarında artışa neden olduğundan anjiyogeneze neden olmaktadır. Ayrıca COX-2 ekspresyonu görülen bazı tümör tiplerinde agresif bir fenotip oluşumu gözlemlenmektedir. Göğüs, kolon ve diğer tümörlerde COX-2 ekspresyonu olumsuz prognoza neden olmaktadır. Epitelyal ovaryum kanserinde %31'den %89'a varan sentezinin olduğu yapılan immünohistokimyasal çalışmalarca belirlenmiştir. Artan COX-2 ifadesi ile VEGF, kılcal damar oluşumu, tümör büyümesi ve anjiyogenez arasında istatistiksel bir bağlantı bulunmaktadır. Bu nedenden dolayı epitelyal ovaryum tümörlerinde görülen VEGF ifadesindeki artışın neden olduğu anjiyogenezin COX-2 ile bağlantılı olduğu düşünülürken; COX-2 artışı ile epitelyal büyüme faktörü ya da p53 seviyeleri arasında bir bağlantı olmadığı rapor edilmiştir (Meric ve ark. 2006; Menczer 2009).

Paklitaksel gibi mikrotübüllere etki eden ajanların, COX-2 ve prostoglandin biyosentezi üzerinde artışa neden olduğu düşünülmektedir. Bu durum paklitakselin kanser tedavisindeki etkinliğinin azalmasına neden olabilmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalar artan COX-2 ifadesinin kemorezistans ve çoklu ilaç direnci oluşumu arasında bağlantı olduğunu göstermektedir (Menczer 2009).

İleri seviyedeki ovaryum kanser hastalarında görülen sisplatin direncinin nedenleri tam olarak anlaşılamamıştır. Birçok farklı mekanizmanın bu direnci üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. COX enzim miktarının ovaryum tümör hücrelerinde yüksek seviyelerde bulunması, platin temelli ilaçlara gösterilen direncin en önemli sebebi olarak gösterilmektedir (Barnes ve ark. 2007).

Yapılan araştırma sonuçları endometriyal kanser türlerinde COX-2 seviyesinin tümörün histolojik sınıfı ile bağlantılı olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalarda COX-2 seviyesinin; müsinöz dokularda, seröz ve endometroid dokulara oranla daha az olduğu rapor edilmektedir. Son zamanlarda yapılan farklı birkaç çalışmada artan COX-2 seviyesinin radyasyon ve kemoterapi tedavisine cevap vermeyen, agresif yayılım gösteren ovaryum kanserlerinin belirlenmesinde marker olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (Athanassiadou ve ark. 2008).

### 1.8.3. VEGF

VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) homodimerik yapıda, heparin bağlayıcı bir glikoproteindir (Steoltzing ve ark. 2003). VEGF dokularda mitojenik aktivite göstererek anjiyogenezisi uyarır ve vasküler permeabiliteyi artırır. Anjiyogenez çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullarda gelişen bir oluşumdur. Fizyolojik olarak anjiyogenez embriyonik gelişim sırasında, yara iyileşmesinde, menstrüel siklusda meydana gelmektedir (Ria ve ark. 2003).

VEGF ailesi VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plesenta büyüme faktöründen oluşmaktadır. Karakteristik özellikleri en iyi bilinen VEGF-A'dır. VEGF-A'nın en az 4 izoformu bulunmaktadır. VEGF 165 ve VEGF 121 hücreler tarafından sentezlenirken, VEGF -189 ve VEGF- 205 hücrelere bağlı olarak ifade edilmektedir. VEGF- 165 birçok tümör hücresinde sentez edilmektedir. VEGF-121, VEGF-165 ve VEGF-189 kötü prognoz ve venöz yayılması gösteren kolorektal kanser türlerinde görülmektedir (Steoltzing ve ark. 2003).

Molekülün biyolojik aktivitesi temel olarak 3 reseptör aracılığıyla gerçekleştirilmektedir; VEGF-R<sub>1</sub> (flt-1), VEGF-R<sub>2</sub> (flk-1 / KDR), VEGF-R<sub>3</sub> (flt-4). Bu reseptörler tirozin kinaz yapısında olup VEGF-R<sub>1</sub> ve R<sub>2</sub> endotelial hücrelerinin üzerindeyken, VEGF-R<sub>3</sub> lenf damarları üzerinde bulunmaktadır (Steoltzing ve ark. 2003).

Tümör hücrelerinde p53 gen mutasyonu, IL-13,IL-6,IL-1 $\beta$ , IL -10, FGF4( fibroblast büyüme faktörü-4), PDGF(trombosit türevi büyüme faktörü),

TGF-  $\beta$ (büyüme faktörü-  $\beta$ ), IGF-1(insülin benzeri büyüme faktörü-1), TNF- $\alpha$  (tümör nekrozis faktör-  $\alpha$ ) gibi birçok faktör tarafından VEGF ifadesi düzenlenmektedir (Ria ve ark. 2003).

Tümörlerde ve kollajen doku hastalıklarında görülen anjiyogenez patolojiktir. Onkolojide günümüzde anti-anjiyojenik tedavi yaklaşımları geliştirilmektedir ki burada amaç tümörlü dokunun etrafında damar yapımının engellenerek etkili ve spesifik bir tedavi yaklaşımıdır (Güllü 2004). Tümörlerde damar sistemi normal damar sisteminden farklıdır. Düzensizdirler ve özellikle oluştukları alandaki dağılımları heterojendir. Dağılımlarındaki bu heterojenite ilacın hedefe düzensiz bir şekilde ulaşmasına neden olmaktadır. Ayrıca tümör damar sisteminde arteriyor, kapiller ya da venüller gibi düzenli bir oluşum da bulunmamaktadır. Tümör dokusunda birbirleriyle iletişimi olmayan hücreler arasında boşluklar genişir ve damar sistemleri normal dokulardakine oranla çok daha fazla sızma göstermektedir. Yapılan son çalışmalar tümör endotelial hücrelerin sitogenetik yapılarında anöploidi, multiple kromozomal düzensizlik gibi anomalilikler olduğunu göstermektedir. Bütün bunlar antianjiyogenik terapilere karşı direnç oluşumuna neden olabilecek etmenler içerisinde sayılabilmektedir (Ferrara 2010).

Kanser tedavisinde kabul edilmiş yöntemlerden birisi VEGF yolağına ait inhibitör kullanımınıdır (Yu ve ark. 2011). Hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda VEGF/VEGFR döngüsünün farklı yollar üzerinden uzun süreli bloke edilmesi, tümör anjiyogenezini durdurmaktadır (Larsen ve ark. 2011).

Antianjiyogenik VEGF hedefli ajanlara örnek olarak bevacizumab, anti-VEGF immünoglobülin G (IgG), Fc-sitokin reseptör molekülleri (VEGF-Trap, KH902/903) verilebilmektedir. Bu ajanlar hedef moleküllere bağlanarak VEGF etkisini ortadan kaldırmaktadır (Teng ve ark. 2010).

COX-2'nin VEGF seviyesi üzerine olan kritik önemi literatürde belirtilmektedir. COX-2 ve VEGF ifadelerinin eş zamanlı olduğu durumlarda, VEGF ekspresyonu COX-2 tarafından indüklenmektedir (Lin ve ark. 2010).

TNF ailesine mensup TWEAK (apoptoz indükleyici tümör nekroz faktör) hücre çoğalması, anjiyogenez ve apoptozisde görev almaktadır. TWEAK, Fn14 (indüklenbilir fibroblast büyüme faktörü-14)'üne bağlanarak birçok tümör



çeşidinde tümör yayılımına ve anjiyogenez neden olmaktadır. Aynı zamanda TWEAK, NF-KB (nükleer faktör kapa B) yolağının da aktivasyonuna neden olmaktadır. Yapılan çalışmada VEGF-A'nın Fn14 gen ifadesini arttırdığını ve endotelial hücrelerde büyüme üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. NF-KB ile indüklenen VEGF'in ovaryum kanserinde fazla sentezlenmesinin metastaza ve anjiyogenez neden olduğu rapor edilmiştir (Dai ve ark. 2009).

Epitelial ovaryum kanseri ile yapılan birçok çalışmada serum ve peritoneal sıvıdaki VEGF miktarının tümör belirteci olarak kullanılabilceği rapor edilmiştir. VEGF konsantrasyonları hastalığın evresi hakkında fikir verebilmektedir. Epitelial ovaryum kanserinin erken evrelerinde ölçülen VEGF miktarı azdır. Hefler ve ark. yaptıkları çalışma sonucu serumda bulunan VEGF konsantrasyonu ile hastalığın aşaması arasında bir ilişki olmadığını rapor etmişlerdir (Bizzo ve ark. 2010).

#### **1.8.4. IRS-1**

İnsülin ve insülin büyüme faktörleri (IGF) birçok biyolojik aktivitelere katılmaktadırlar. İnsülin reseptör proteinler (IRS proteinleri)'inin 4 farklı substratı vardır; IRS-1, IRS-2, IRS-3 ve IRS-4. IRS proteinleri birçok sinyal yolağının koordinasyonunda görev almaktadır. PI-3 kinaz → Pkb/Akt ve Grb-2/Sos → Ras kaskadının oluşumundan sorumludur (Rui ve ark. 2002).

İnsülin ve IGF- 1 reseptörleri diğer büyüme reseptörleri ve sitonkinler gibi hücre dışındaki ligand bağlantıları vasıtası ile hücre içindeki tirozin kinaz aktivitesini kontrol etmektedirler (White 2002).

IRS proteinleri hücre içi katalitik reaksiyonlara katılmazlar ancak birçok domain etkileşimi ve fosforilasyon tepkimelerinde rol oynamaktadırlar. IRS- 1 ve IRS-2 yaygın olarak eksprese edilmekte, IRS-4 ekspresyonu ise timüs, beyin, böbrek ve  $\beta$ -hücreleri ile sınırlıdır. Her IRS proteininin COOH bölgeleri tirozin fosforilasyon bölgesi içerir ve terminaldeki bu bölge ile çeşitli sinyal yollarını aktive edilmektedir (White 2002).

IGF-1R tümör hücrelerinde, hücre proliferasyonu, hücre canlılığı, anjiogenezis ve metastaz üzerinde etkilere sahiptir. IGF-1R'nin liganları IGF- 1 ve IGF-2'dir. IGF-1R ekstraselüler domainine bağlanan ligand, reseptör

otofosforilizasyona neden olarak aktifleşmektedir. Adaptör moleküller olan IRS-1 ve IRS-2 tirozin fosforilizasyonun ardından sinyal yolağının başlamasına neden olmaktadır. Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3 K)/Akt ve Ras-Raf-MEK-ERK1/2 sinyal yollarının başlamasına neden olmaktadır (Mukohara ve ark. 2009).

Göğüs kanserinde IGF-1R'in hedeflenmesi tedavi yöntemi olarak sayılabilmektedir. IGF-1R'nin inhibe edilmesi hücre büyümesini durdurmamakta fakat kemoterapik ajanların etkinliğini arttırmaktadır. Ayrıca hücrelerin migrasyon yeteneğini de azaltmaktadır. Bununla beraber *in vitro* olarak göğüs kanserli hücre hattında yapılan çalışmada, IGF-1R reseptörünün inhibisyonu yüksek seviyelerde ifade edilen IGF-1R ve IRS-1 seviyelerinde sınırlanmaya neden olmaktadır (Mukohara ve ark. 2009).

IGF ailesi üyeleri olan IGF ligandları, spesifik IGF bağlayıcı proteinler ve IGF reseptörleri epitelyal ovaryum kanser türlerinde fazlasıyla sentezlenmektedir. Tavşan ovaryum mezoteryal hücre kültürü ile yapılan çalışmada, IGF reseptörlerinin aşırı sentezlenmesinin malignan hücre transformasyonuna yol açtığı rapor edilmiştir (Lu ve ark. 2006).

IGF-I birçok epitelyal orjinli tümör hücre de sentezlenmemektedir. Fakat nöroektodermal ve ovaryum kanser türlerinde sentezinin olduğu belirlenmiştir. IGF'lerin ovaryum kanserli hücre büyümesinde etkin rol aldığı düşünülmektedir. Ovaryum kanser türlerinde salınan insülin benzeri büyüme faktör reseptörü I (IGF-IR)'e yönelik hedef tedavi belirlenmesinin umut verici olduğu düşünülmektedir. Çünkü bu reseptör apoptozu baskılayan yolları aktive etmekte, hücre çoğalmasını arttırmakta, hücre sağkalımını sağlayacak yeni yolların oluşumuna neden olmaktadır. IGF-IR'nin fosforillenmesinin ve aktivasyonunun engellenmesinin, ovaryum kanserinde hücre büyümesini engellediği rapor edilmiştir (Yee ve ark. 1991; Gotlieb ve ark. 2006).

### **1.8.5. Ki-67 geni**

Proliferasyonun ölçülmesine yönelik ilk yöntem tümürlü dokuda mitojenik figürlerin varlığının tespitidir. Fakat bu teknik hem uygulanabilirliği hem de tekrarlanabilirliği açısından zordur ve çok fazla sayıda hücreye ihtiyaç

duyulmaktadır. 1983 yılında, insan nükleer antijeni Ki-67'ye duyarlı bir monoklonal antibadi tanımlanmıştır. Nonhiston nükleer bir protein olan Ki-67, 345 ve 395 kilodalton ağırlığında 2 birimden oluşan kompleks bir moleküldür. Ki-67 proteini bir proliferasyon belirleyicisidir. G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> ve M gibi hücre siklusunun aktif evrelerinde oluşumu gözlenmektedir. Yani geç G<sub>1</sub> safhasından itibaren bütün fazlarda eksprese edilmektedir. G<sub>0</sub> fazında hücrede bulunmadığından büyüyen ve büyümeyen hücreler arası farkın saptanmasında yardımcı bir proteindir. Tümör proliferasyon analizlerinde Ki-67 kullanımı oldukça yaygındır (Potemski ve ark. 2006; Moles ve ark. 2010).

Ki-67 genellikle tümör hücrelerinde %1-6 oranında, yayılma hızı yüksek olan kanser türlerinde ise %44 oranında sentezlenmektedir. Yükselmiş Ki-67 sentezi genellikle lenf nodlarına yayılma gösteren tümör tiplerinde görülmektedir (Bast ve ark. 2004).

Ovaryum tümörlerinde Ki-67, p53 ve p16 sentez oranları oldukça fazladır. Yaptıkları çalışmalarda, Ki-67 sentezinin hücrelerin G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> ve M fazlarından her birinde etkin olarak rol aldığı rapor edilmiştir. Ovaryum kanseri üzerine yapılan çalışmalarda Ki-67 miktarı ile hücre çoğalma belirleyicisi olan diğer markerların arasında bağlantı olduğunu rapor edilmiştir. Ki-67 miktarı hastalığın aşaması ise ters orantıya sahiptir. Elde edilen bu sonuçlar ovaryum kanserinde artmış Ki-67 sentezinin metastaz aşamasında olan tümör tiplerinde yüksek olduğu sonucunu ortaya çıkartmıştır (Buchynska ve ark. 2007; Sakai ve ark. 1999).

## **2. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **2.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler**

RPMI 1640 with L-glutamine (Sigma), MEM Non-essential amino acid solution (Sigma), Sodium Pyruvate solution (Sigma), Insulin (Sigma), Tripsin-EDTA solution (Biological Industries), Sodyum bikarbonat (Sigma), % 3,7 Formaldehit (Merck), Dimethyl Sulfoxide (Riedel de Haen), MTT (Sigma), DAPI (Sigma), Caspase-3 kiti (Chemicon APT165), Paklitaksel (TAXOL)(Sigma), Carboplatin (Sigma), ATRA (VESONEİT)(Sigma), RNeasy protect cell mini kit(Qiagen), Quantitect Reverse Transcriptase Kit (Qiagen), Custom human real-time PCR assays Ki-67 hedef gen PP-HU-600 (Qiagen), Custom human real-time PCR assays COX-2 hedef gen PP-HU-600 (Qiagen), Custom human real-time PCR assays VEGF hedef gen PP-HU-600 (Qiagen), Custom human real-time PCR assays IRS-1 hedef gen PP-HU-600 (Qiagen), Human probe gene detection kit 18S rRNA Referans Gen HK-PP-Hu600 (Qiagen), Sıvı azot.

### **2.2. Kullanılan Sarf Malzemeler**

25 cm<sup>2</sup>'lik ve 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklar, 96 ve 6 kuyucuklu plakalar, cam mezürler, cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 ml hacimlerinde), 250, 500 ve 1000 ml'lik Durham şişeleri, 10 ml'lik tek kullanımlık pipetler, Steril polipropilen santrifüj tüpleri (15 ve 50 ml hacimlerinde), steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Thoma lamı, eppendorf tüp, filtreli tipler.

### **2.3. Kullanılan Aletler**

Soğutmalı ve yüksek devirli santrifüj (Heraus), kuru hava sterilizatörü (Nüve), Otoklav, Derin dondurucu (-20, -86), buzdolabı, manyetik karıştırıcı, CO2 inkübatörü (Heraus), Steril kabin (Heraus), sıvı azot kapları, otomatik pipetler, kar-buz makinesi (Scotsman), su banyosu (Clifton), Eliza Cihazı (ELx808-IU, Bio-Tek), fluoresan mikroskopu (Olympus BX50), inverted Mikroskop (Olympus IX71), 12 Kanallı mikropipet (eppendorf), dağıtıcı pipet (eppendorf). Rotor-Gene Q Series Software Version 2.0.2 (Corbett Research), CG

palm-cycler (CG1-96), Nano Drop-1000 spectrophotometeor, Vorteks (velp scientifica).

#### **2.4. OVCAR-3 Hücre Kültürü**

OVCAR-3 hücreleri ATCC (Amerikan Type Culture Collection)'dan satın alınmıştır. OVCAR-3 hücreleri, inaktifleştirilmiş % 20'lik Fetal Bovine Serum (Sigma), RMPI-1640 (Sigma), MEM Non-essential amino acid solution (Sigma), Sodium Pyruvate solution (Sigma), Penicilin-Streptomycin (Sigma), İnsülin (Sigma) ve % 7,5 NaHCO<sub>3</sub> içeren besiyerinin bulunduğu 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda % 95'lik hava ve % 5'lik CO<sub>2</sub>'lik gaz ortamında, 37<sup>0</sup>C'deki Heraus CO<sub>2</sub> inkübatöründe kültüre edilmiştir.

#### **2.5. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması**

##### **2.5.1 Karboplatin dozlarının hazırlanması**

Karboplatin (Sigma) DMSO (dimetil sülfoksit) içerisinde çözülerek 50 µM, 100 µM, 150 µM'lık dozlar halinde hazırlanmıştır.

Madde için belirtilen dilüsyonlar, her çalışma için yeniden hazırlanmıştır. Karboplatin DMSO içerisinde çözüldüğünden, negatif kontrol grubu için çözücü madde DMSO kullanılmıştır.

##### **2.5.2. ATRA dozlarının hazırlanması**

ATRA (Sigma) DMSO içerisinde çözülerek 10 µM, 30 µM, 50 µM, 70 µM, 90 µM, 150 µM, 180 µM, 210 µM, 250 µM, 270 µM'lık halinde hazırlanmıştır.

Madde için belirtilen dilüsyonlar, her çalışma için yeniden hazırlanmıştır. ATRA, DMSO içerisinde çözüldüğünden, negatif kontrol grubu için çözücü madde DMSO kullanılmıştır.

### **2.5.3. Paklitaksel dozlarının hazırlanması**

Paklitaksel (Sigma) DMSO içerisinde çözülerek 0,312 nM, 0,625 nM, 1,25 nM, 2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM ve 100 nM'lık dozlar halinde hazırlanmıştır.

Madde için belirtilen dilüsyonlar, her çalışma için yeniden hazırlanmıştır. Paklitaksel, DMSO içerisinde çözüldüğünden, negatif kontrol grubu için çözücü madde DMSO kullanılmıştır.

### **2.6. Kullanılan Araç ve Gerecin Hazırlanması**

Çalışmalarda kullanılan bazı cam ve plastik malzemeler ile sıvı solüsyonlar alüminyum folyolara sarılı olarak otoklavda 121 °C, 1,5 atm/Hg basınçta 20 dakika, bazı cam ve metal malzemeler de alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180°C'de 2 saat, süre ile steril edilerek kullanılmıştır. Kullanılan bazı sıvı kimyasallar 0,2 mm aralıklı selüloz nitrat filtreden geçirmek suretiyle steril edilerek kullanılmıştır.

### **2.7. Yöntem**

#### **2.7.1. Hücre kültürü**

OVCAR-3 hücreleri 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda, yetiştirilmiş ve % 95 hava ve % 5 CO<sub>2</sub>'li gaz ortamında ve 37<sup>0</sup> C'deki CO<sub>2</sub> inkübatöründe kültüre edilmiştir.

#### **2.7.2. Hücrelerin testler için hazırlanması**

##### **2.7.2.1. *In Vitro* sitotoksosite testi (MTT Testi)**

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini % 70 oranında kapladıkları zaman Trypsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Trypan blue boyası ile boyanan hücreler, Thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak 96 kuyucuklu hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğunda 5000 hücre olacak şekilde % 20 FBS içeren besiyerinde süspansiyon haline getirildikten

sonra hücre kültürü plakalarına 0,2 ml hücre süspansiyonu aktarılmıştır. Hücrelerin yapışması ve yeni ortama alışması için 37°C'de 48 saat inkübe edilmişlerdir. 48 saat inkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki besiyerleri plakaların ters çevrilmesi suretiyle uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine test maddelerinin sitotoksik etkilerini belirlemek üzere maddelerin istenen konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri ilave edilip 12, 24, 48 ve 72 saat 37°C'de CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edilmiştir.

Karboplatinin belirlenen dozları hazırlanmıştır. Karboplatin için çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. DMSO oranı % 1'i geçmeyecek şekilde ve final konsantrasyonları; 50 µM, 100 µM, 150 µM, olması sağlanarak hazırlanmıştır.

ATRA için çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. ATRA'nın belirlenen dozları hazırlanmıştır. DMSO oranı % 1'i geçmeyecek şekilde final konsantrasyonlarının; 10 µM, 30 µM, 50 µM, 70 µM, 90 µM, 150 µM, 180 µM, 210 µM, 250 µM, 270 µM olması sağlanmıştır.

Paklitaksel için belirlenen dozlar hazırlanmıştır. Çözücü madde olarak DMSO kullanılmıştır. DMSO oranı %1'i geçmeyecek şekilde final konsantrasyonları; 0,312 nM, 0,625 nM, 1,25 nM, 2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM ve 100 nM olması sağlanarak hazırlanmıştır.

ATRA & Karboplatin kombinasyonunda; ATRA'nın 50 µM, 150 µM ve 250 µM dozları ile Karboplatinin 50 ve 100 µM'lık dozu kullanılmıştır. Maddeler hücrelere aynı anda verilmiştir. DMSO oranı %1'i geçmeyecek şekilde final konsantrasyonları ATRA için 50 µM, 150 µM, 250 µM Karboplatin için 50 ve 100 µM olması sağlanarak hazırlanmıştır.

ATRA & Paklitaksel kombinasyonunda; ATRA'nın 50 µM, 150 µM ve 250 µM'lık dozları ile Paklitakselin 2,5 nM'lık ve 100 nM'lık dozları kullanılmıştır. Maddeler hücrelere aynı anda verilmiştir. DMSO oranı %1'i geçmeyecek şekilde final konsantrasyonları ATRA için 50 µM, 150 µM ve 250 µM, Paklitaksel için 2,5 nM ve 100 nM olması sağlanmıştır.

Karboplatin & Paklitaksel kombinasyonunda; Karboplatinin 50 ve 100 µM, Paklitakselin 2,5 ve 100 nM'lık dozu kullanılmıştır. DMSO oranı %1'i geçmeyecek şekilde final konsantrasyonları Karboplatin için 100 µM ve Paklitaksel için 2,5 nM olması sağlanmıştır.

ATRA & Paklitaksel & Karboplatin kombinasyonunda ATRA'nın 50 µM, 150 µM ve paklitakselin 2,5 nM'lık dozu ve Karboplatinin 50 µM ve 100 µM'lık dozları kombine edilmiştir. DMSO oranı %1'i geçmeyecek şekilde final konsantrasyonlar hazırlanarak hücrelere aynı anda verilmiştir.

### **2.7.2.2. MTT ölçümü**

Test maddeleri ile 12, 24, 48 ve 72 saat muamele edilen hücrelerden inkübasyon süresi sonunda besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 5 mg/ml<sup>-1</sup> MTT solüsyonu ile canlı hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri sonucu MTT boyasının suda çözünmeyen formazan tuzuna dönüşebilmesi için 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılmıştır. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözünmesi için her bir kuyucuğa 0,1 ml DMSO ilave edilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen hücre canlılık oranı % 100 olarak kabul edilerek deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Hücrelerin, deney setlerinde her test maddesi dozu için 8 paralel halinde ekildiği deneyler, birbirinden bağımsız olarak 3 kez tekrarlanmıştır. MTT deneylerinin sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak p<0.05 kabul edilmiştir.

### **2.7.3. Apoptoz tespiti**

#### **2.7.3.1. Floresan boyama ile morfolojik inceleme (DAPI boyama)**

6'lı plakalara yerleştirilen steril lameller üzerine ekilen OVCAR-3 hücreleri 48 saat lamellerin üzerine yapışmaları için 37<sup>0</sup>C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde kültüre edilmişlerdir. Sitotoksisite testleri sonunda belirlenen etkili dozlar lameller üzerine yapışan hücrelere 12 saat süresince uygulanmışlardır. Bu süre sonunda lameller PBS (PBS: 137 µM NaCl, 2.7 µM KCl, 15 µM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8



$\mu\text{M NaHPO}_4$ ; Ph 7.3)'de çözülmüş olan %3.7'lik paraformaldehit çözeltisi ile  $37^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika tespit edilmişlerdir. Tespit işleminin ardından lameller 3 kez PBS ile yıkanarak, 30 dakika  $37^\circ\text{C}$ 'de 1mg/ml DAPI (4'6-diamidino-2 fenilindol) ile karanlık ortamda inkübe edilmişlerdir. Lameller daha sonra PBS ile yıkanarak kapatılmış ve fluoresan mikroskopunda incelenerek fotoğrafları çekilmiştir.

### **2.7.3.2. Kaspaz-3 deneyi**

Hücreler; ATRA, Karboplatin, Paklitaksel ile tek başlarına ve kombinasyonları halinde 12 ve 24 saat muamele edilmiştir. İntrasellüler içeriklerinin toplanması amacı ile lizis edilmişlerdir. Hücreler, hücre içerikleri toplanmak üzere kitin satın alındığı firmanın yöntemine göre lizis edilerek deney gerçekleştirilmiştir (Caspase-3 kiti (Chemicon APT165)). Hücre lizatları pozitif kontrol amacı ile renkli işaret molekülü olan p-nitroalanine (pNA) ile konjuge olan kaspaz-3 spesifik peptit ilave edilmesi ile proteaz aktivitesi için ayrıca test edilmişlerdir. Kaspaz-3 tarafından peptidin kırılması ile ortama salınan kromofor pNA spektrofotometrik olarak 96'lı plakalarda Eliza mikropate okuyucu ile 405 nm dalga boyunda okutulmuştur. Hücre lizatlarında kaspaz enzimatik aktivitesinin seviyesi, direkt olarak renk reaksiyonu ile doğru orantılı olarak değerlendirilmektedir.

Deney sonucunda sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde SPSS programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak  $p < 0.05$  kabul edilmiştir.

### **2.7.4.Real-Time PCR**

#### **2.7.4.1. RNA izolasyonu**

- Hücreler 24 saat süresince maddelerle muamele edildikten sonra süpernatantla birlikte, PBS, PBS-EDTA, tripsin yardımı ile santrifüj tüpüne toplanmıştır. Thoma lamı kullanılarak sayılan  $4 \times 10^6$  hücre, kullanılmak

üzere alınıp 1250 rpm'de 6 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırılmıştır.

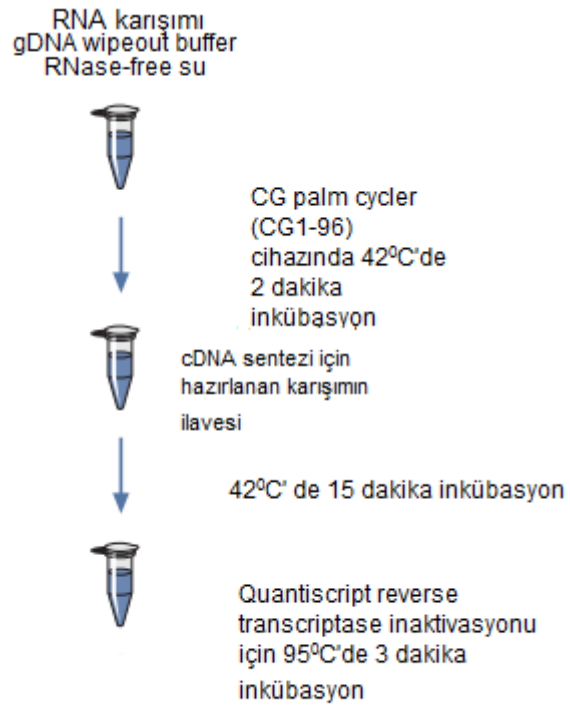
- Hücrelerin üzerine Buffer RTL plus + Beta merkaptotanol karışımı konarak yavaş yavaş pipetlenmiş ve genomik DNA'yı tutan kolonlara konularak 10 000 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edilmiştir. Böylece genomik DNA'nın kolonda kalması sağlanmıştır.
- Alttaki genomik DNA'nın bulunmadığı lizatın üzerine 350 µl %70'lik etanol ekleyerek pipetlenmiş ve pembe renkli kolonlara konarak 10 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Altta kalan sıvı atılarak kolona 700 µl RW1 eklenmiş, 15 sn 10 000 rpm de santrifüj edilmiş ve sıvı yine dökülmüştür.
- Kolonların üzerine 500 µl Buffer RPE konulmuş, 14 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Kolonlar yeni bir toplama tüpünün üzerine koyularak aynı işlem tekrarlanarak 14 000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
- Kolon yeni bir toplama tüpüne konulmuş, hiçbir şey eklemekten kuruması için 14 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Kolon yeni temiz ependorf tüpü içerisine yerleştirildikten sonra üzerine 40µl RNase Free Water tam orta kısma gelecek şekilde dikkatlice eklenmiş ve 10 000 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Üstteki kolon atılarak, altta kalan RNA'lar nano dropta ölçülmüş ve real time PCR için işlem yapılana kadar (-80)°C'de saklanmıştır.
- RNA'nın miktarı ve saflığını belirlemek amacıyla izole edilen RNA nanodrop cihazında spektrofotometrik olarak ölçülmüş 1 ngr DNA ya ulaşacak şekilde DNase, RNase free su ile seyreltilmiştir.

#### **2.7.4.2. cDNA sentezi**

cDNA sentezi için, toplam hacim 20 µl olacak şekilde reaksiyon hazırlanmıştır (Tablo 2.1). cDNA sentez işlemi palm cyclers cihazında 20 dakika da yapılmıştır (Şekil 2.1).

**Tablo 2.1.** cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği

<b>Karışım</b>	<b>Miktar (µl)</b>
Quantiscript reverse transcriptase	1
Quantiscript reverse transcriptase Buffer	4
Reverse transcriptase primer mix	1
RNA	14
<b>Toplam</b>	<b>20</b>

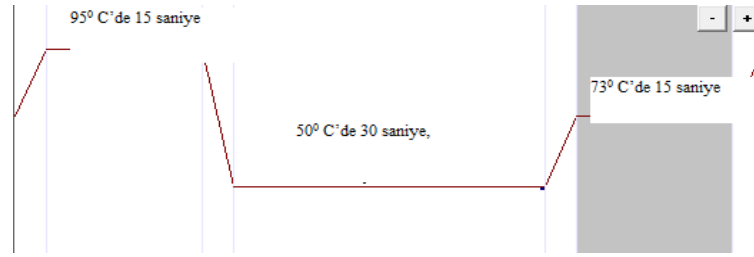


**Şekil 2.1.** cDNA sentezi aşaması (QuantiTect Reverse Transcription Handbook, QIAGEN 2009)

**Tablo 2.2.** RT-PCR için miks içeriği

Karışım	Miktar( µl )
Primer prob	1
Master Mix	10
RNase Free Water	4
Cdna	5
<b>Toplam</b>	<b>20</b>

PCR işlemi, 95<sup>0</sup> C’de 15 saniye, 50<sup>0</sup> C’de 30 saniye, 73<sup>0</sup> C’de 15 saniyeden oluşan 50 çevrim sonunda tamamlanmıştır (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2.** RT-PCR, 1 döngü

**Tablo 2.3.** RT-PCR tekniği ile genlerin ifade seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan primerler

Primer Adı	Forward Primer	Reverse Primer
18S rRNA	5’-ATCAACTTTCGATGGTAGTCG-3’	5’-TCCTGGATGTGGTAGCCG-3’
COX-2	5’TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT-3’	5’-AGATCATCTCTCTGCCTGAGTATCTT-3’
IRS-1	5’-GTCCTAACCGCAACCAGAGTG-3’	5’-CCTTGACCAAATCCAGGTCTATG-3’
VEGF	5’-GCTCTACCTCCACCATGCCA-3’	5’-CACCCTTCGTGATGATTCTGC-3’
Ki-67	5’-GCAGCCCGTGTAACCTGGAATGA-3’	5’-GTCTTCTAGAGCCTGGGCCTT-3’

Çalışmamızda PCR ürünlerinin saptanabilmesi için dizi spesifik floresan probler kullanılmıştır.

### ***Sonuçların değerlendirilmesi***

Hedefin konsantrasyonu hedefin belli bir referansa oranı olarak ifade edilir. Bu metot ile hedef ve referans genin konsantrasyonlarını belirleyebilmek için her ikisine ait standart eğrilerin kullanımına ihtiyaç duyulur. Çalışmamızda RT-PCR sonuçlarımızı yorumlarken, hedef genlerimizin konsantrasyon değerini referans genin konsantrasyon değerine oranlayarak elde ettiğimiz sonuçların kontrol grubuna göre ne kadar değiştiği incelenmiştir.

#### **2.7.5. Mikroskopi**

Hücreler inverted Olympus IX71 mikroskobunda incelenmişlerdir.

#### **2.7.6. Fotografi**

Kültür hücrelerinin mikroskop altında saptanan uygun görüntüleri Olympus DP72 kamera kullanılarak fotoğraflanmıştır.

### 3.BULGULAR

Bu çalışma, ATRA'nın tek başına ve klasik kematerapötiklerle kombinasyonunun OVCAR-3 hücre kültürü üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

ATRA, karboplatin ve paklitakselin tek başlarına ve kombinasyonlarının, OVCAR-3 hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri MTT testi ile belirlenmiştir. Muamele süresi bitiminde MTT verilerek ELISA plate okuyucusunda elde edilen veriler değerlendirilmiştir.

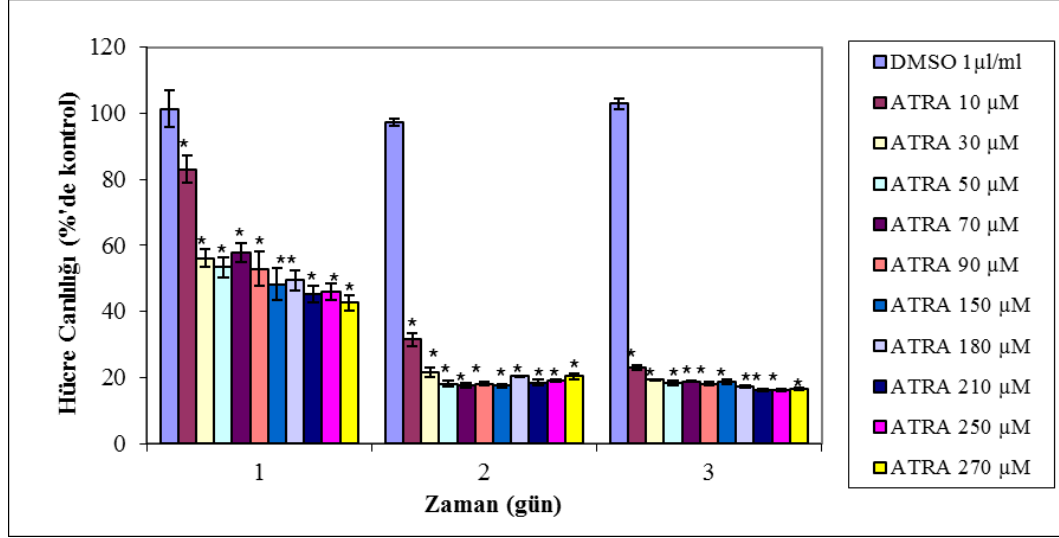
Apoptozun belirgin özelliği olan nükleus parçalanmasını gözleyebilmek amacıyla söz konusu maddelerin belirlenen dozları hücreler üzerinde denenmiş ve DAPI boyama yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Olympus BX50 mikroskobu ile incelenmiş ve Olympus DP70 kamera kullanılarak fotoğraflandırılmıştır.

ATRA, karboplatin ve paklitaksel ile tek başına ve kombine olarak muamele edilmiş OVCAR-3 hücre hattında, kaspaz-3 aktivitesinin saptanabilmesi için Kaspaz 3 Elisa kolorimetrik testi uygulanarak, apoptotik etkiler belirlenmiştir.

ATRA, paklitaksel ve karboplatin tek başlarına ve kombinasyonlar halinde OVCAR-3 hücre hattına uygulanmıştır. Muamelelerin gen düzeyinde meydana getirdiği etkileri saptamak amacıyla Ki-67 (kinaz inhibitör-67), VEGF (vasküler endotel büyüme faktörü), COX-2 (siklooksijenaz-2) , IRS-1 (insülin reseptör substrat-1) ve 18S rRNA genlerinin anlatım düzeyleri rt-PCR yöntemi kullanılarak saptanmıştır.

### 3.1. MTT Testi

#### 3.1.1. ATRA'nın OVCAR-3 hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri

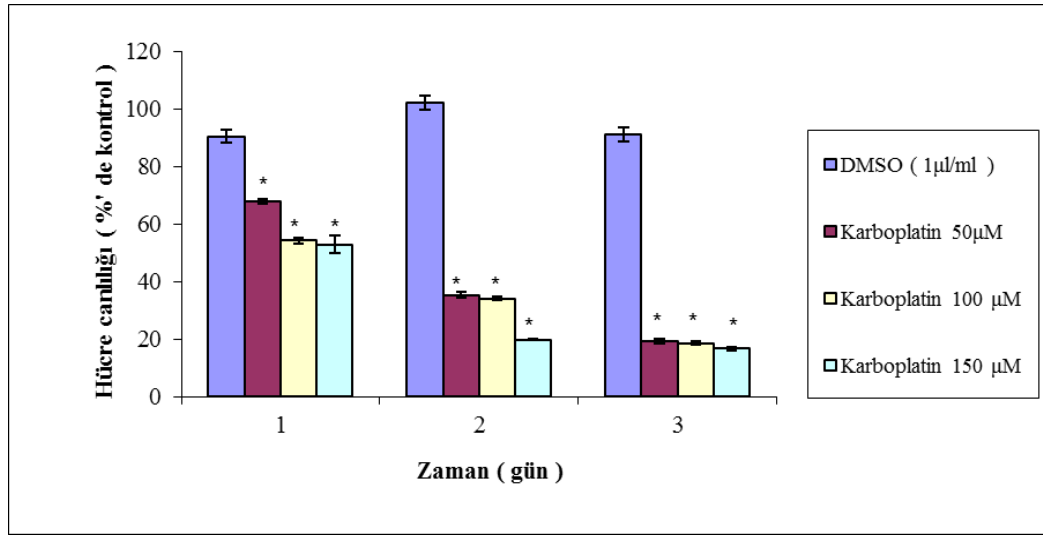


**Şekil 3.1.1.** ATRA'nın OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi, (\*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir, Anlamlılık değeri  $p < 0,05$

24 saat muamele sonunda ATRA'nın 10 µM'lık doz uygulaması sonucu hücre canlılığı oranı % 83'dür (Şekil 3.1.1). 30 µM'lık muamele sonucu hücre canlılığı % 56, 50 µM'lık muamelesi sonucu ise % 53'dür. 70 µM'lık uygulama hücre canlılığı üzerinde % 43 azalmaya neden olurken 90 µM'lık uygulamada ise hücre canlılığında meydana gelen azalma oranı % 48'dir. ATRA 150 µM'lık dozu hücre canlılığında % 52 azalmaya neden olmuştur. 180 µM'lık muamele sonucu hücrelerin canlılık oranı % 49 iken, 210 µM ve 250 µM'lık uygulamalarda % 45'dir. ATRA'nın çalışmamızda uygulanan en yüksek dozu olan 270 µM ile muamelesi hücre canlılığını % 58 oranında azaltmıştır. 48 saat sonunda 10 µM'lık doz uygulanmasında hücre canlılığı % 32 iken, 30 µM'lık doz hücre canlılığında % 78 azalmaya neden olmuştur. 50 µM'lık dozda hücre canlılığında % 82 azalma gözlenmiştir. ATRA 70 µM ve 90 µM'lık uygulamalarında hücre canlılık oranı % 18'dir. 150 µM'lık muamelede canlılık oranı % 17 iken, 180 µM'lık doz uygulamasında hücrelerin canlılık oranı % 20'dir. 210 ve 250 µM'lık doz aralığında hücre canlılıklarında % 72 oranında azalma olmuştur. 270 µM'lık

dozunun muamelesi sonucu ATRA, hücre canlılığını % 80 oranında azaltmıştır. 72 saatlik farklı derişimlerdeki ATRA ile muamelede 10 µM'lık uygulamada hücre canlılığı % 23 iken, 30 µM'lık uygulama sonucu % 19'dur. 50-150 µM arası uygulanan ATRA dozları hücre canlılığını %82 azaltmıştır. 180 µM'lık muamele sonucu hücre canlılığı % 17 iken, 210- 270 µM doz aralığında hücrelerdeki canlılık oranı % 16' dır. ATRA 'nın 24 saat için belirlediğimiz IC<sub>50</sub> değeri 150 µM'dır.

### 3.1.2. Karboplatin'in OVCAR-3 hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri



**Şekil 3.1.2.** Karboplatin'in OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi, (\*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir, Anlamlılık değeri p<0,05

Karboplatinin tez çalışmasında uygulanan dozları yapılan literatür çalışması sonucunda seçilmiştir. "Smith ve ark. (2005)" OVCAR-3 hücre hattına 24 saat boyunca muamele ettikleri karboplatin için IC<sub>50</sub> değerini 22.2 µM olarak belirlediklerini rapor etmişlerdir.

24 saatlik uygulamada, Karboplatinin uygulanan 50 µM 'lık dozunda hücre canlılığı % 68'dir (Şekil 3.1.2). 100 µM'lık derişimde hücre canlılığında % 46 azalma olurken, 150 µM'lık uygulama sonucu hücre canlılığı oranı % 53'dür.

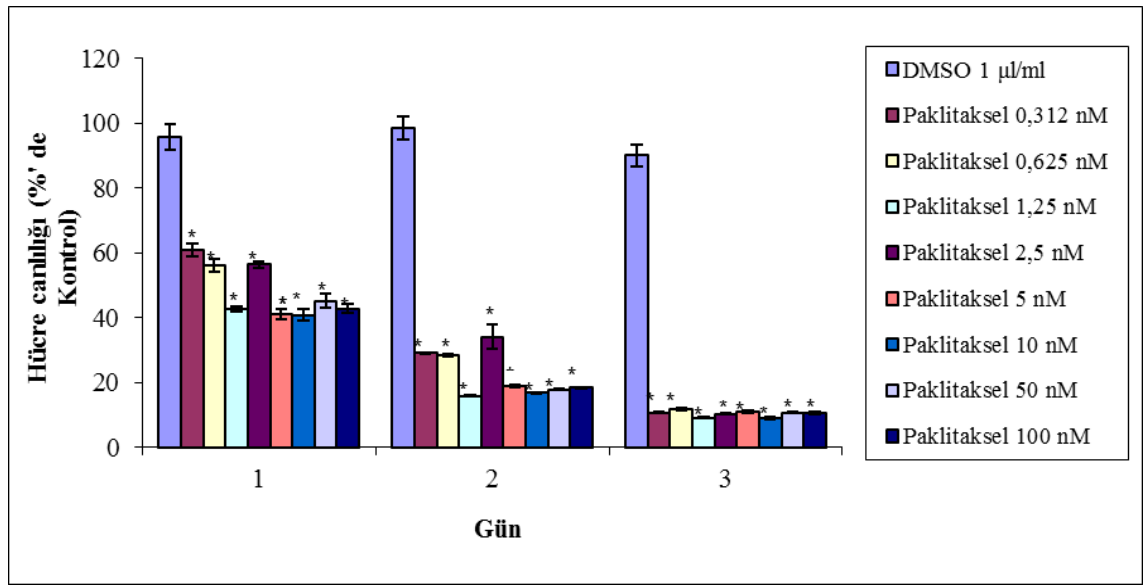
48 saatlik Karboplatin ile muamele sonuçları şöyledir; 50 µM'lık doz % 65 hücre canlılığında azalmaya neden olurken, 100 µM'lık doz uygulaması % 66



oranında hücre canlılığını azaltmıştır. 150  $\mu\text{M}$ 'lık muamele sonucu hücre canlılığı % 20'dir.

72 saat sonunda uygulanan Karboplatinin bütün dozlarında kontrole göre anlamlı azalmalar gözlenmiştir. Bu oran 50  $\mu\text{M}$ ' da % 19, 100  $\mu\text{M}$ 'da % 19 ve 150  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile muamelesinde % 17'dir. Çalışmalar sonucunda karboplatinin 24 saatlik muamelesi için seçtiğimiz  $\text{IC}_{50}$  değeri 100  $\mu\text{M}$ 'dır.

### 3.1.3. Paklitaksel'in OVCAR-3 hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri



Şekil 3.1.3. Paklitaksel'in OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile

değerlendirilmesi, (\*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir, Anlamlılık değeri  $p < 0,05$

Paklitaksel'in tez çalışmasında uygulanan dozları yapılan literatür çalışması sonucunda seçilmiştir. "Smith ve ark. (2005)" OVCAR-3 hücre hattına 24 saat boyunca muamele ettikleri paklitaksel için  $\text{IC}_{50}$  değerini 1.4 nM olarak belirlediklerini rapor etmişlerdir.

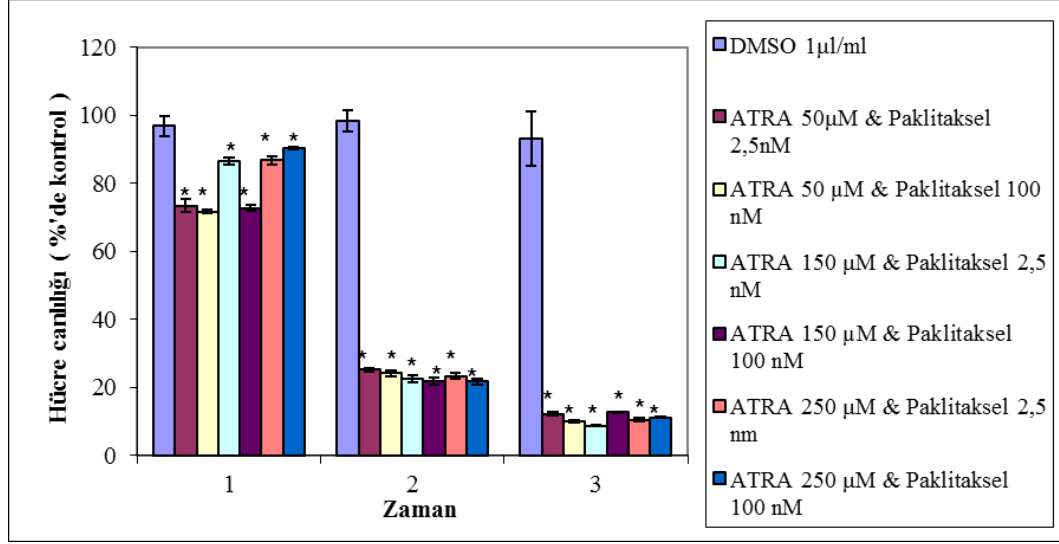
Paklitaksel'in 0,312 nM ile 24 saatlik muamelesi sonunda hücre canlılık oranı % 61'dir (Şekil 3.1.3). 0,625 nM'lık doz uygulamasında hücrelerdeki canlılık oranı % 56 iken, 1,25 nM'lık uygulamada bu oran % 43'dür. Paklitaksel'in 2,5 nM'lık doz uygulaması hücre canlılığında % 44 oranında azalmaya neden olur iken, 5 nM'lık doz uygulaması sonucunda hücre canlılığı % 59 azalmıştır. 10 nM'lık derişimin uygulanması sonucu 24 saat sonundaki hücre

canlılığı % 41 iken, 50 nM'lık doz uygulaması ile hücre canlılığındaki azalma % 55'dir. 100 nM'lık doz derişimi hücre canlılığını % 57 azalmıştır.

Paklitaksel'in 48 saat muamelesinde; 0,312 nM'lık doz uygulamasında hücrelerdeki canlılık oranı % 29, 0,625 nM'lık doz uygulamasında hücrelerdeki canlılık oranı % 28, 1,25 nM'lık doz uygulamasında hücre canlılığı % 16 iken 2,5 nM'lık dozunda bu oran % 34'dur. 5 nM'lık derişimin uygulanması hücre canlılığı % 81 azalırken, 10 nM'lık doz uygulamasında bu oran % 83'dür. Belirtilen süre içerisinde OVCAR-3 hücrelerinin 50 nM ve 100 nM'lık Paklitaksel derişimleri uygulamaları sonucundaki hücre canlılık oranı % 18'dir.

Paklitaksel'in 72 saat sonunda OVCAR-3 hücre canlılığı üzerine etkileri; 0,312 nM'lık doz ile muamelesi sonucu hücre canlılığı oranı %11 iken, 0,625 nM'lık derişiminde bu oran %12 'dir. 1,25 nM'lık doz uygulaması sonucu hücre canlılığı % 9'dur. Paklitaksel'in 2,5 nM'lık dozunun uygulanması hücre canlılığı % 90 azaltırken, 5 nM'lık doz uygulamasının ardından hücre canlılığındaki azalma oranı % 89'dur. 10 nM'lık derişiminin uygulanması sonucu hücre canlılığı oranı % 9 iken ve 50 nM'lık ve 100 nM'lık derişimleri hücre canlılığını % 89 azaltmıştır. Paklitakselin 24 saat için belirlediğimiz IC<sub>50</sub> değeri 2,5 nM'dır.

### 3.1.4. ATRA & Paklitaksel kombinasyonunun OVCAR-3 hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri



Şekil 3.1.4. ATRA & Paklitaksel kombinasyonunun OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi, (\*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir, Anlamlılık değeri p<0,05

ATRA'nın 50 µM'lık dozu ile paklitakselin 2,5 nM'lık dozunun 24 saat muamelesi sonucu hücre canlılığı % 73'dür (Şekil 3.1.4). ATRA'nın 50 µM'lık dozu ile paklitakselin 100 nM'lık dozunun uygulanması hücre canlılığını % 28 azaltmıştır. ATRA'nın 150 µM'lık dozu ile paklitakselin 2,5 nM'lık dozunun birlikte uygulanması sonucu hücrelerdeki canlılık oranı % 87'dir. ATRA'nın 150 µM'lık dozu ile paklitakselin 100 nM'lık dozu hücre canlılığını % 27 azaltmıştır. ATRA'nın 250 µM'lık dozu ile paklitakselin 2,5 nM'lık dozunun muamelesi sonucu hücre canlılığı % 87'dir. ATRA'nın 250 µM'lık dozu ile paklitakselin 100 nM'lık dozu hücre canlılığını % 10 azaltmıştır. Kombinasyonda uygulanan ATRA'nın 50 µM'dozu tek başına uygulandığında OVCAR-3 hücre canlılığını 24 saat muamele sonunda % 47, 150 µM'dozu tek başına % 48 azaltmıştır. 250 µM'lık doz uygulamasında ise hücre canlılığı % 46'dır. Kombinasyonda kullanılan paklitakselin 2,5 nM'lık dozu ise hücre canlılığını % 44 azaltırken 100 nM'lık dozu % 57 azaltmıştır. Seçilen dozlarla oluşturulan ATRA&Paklitaksel kombinasyonunun ilk 24 saatlik muamelesi hücre canlılıkları üzerinde maddelerin tek başına gösterdiği kadar etki göstermemiştir.

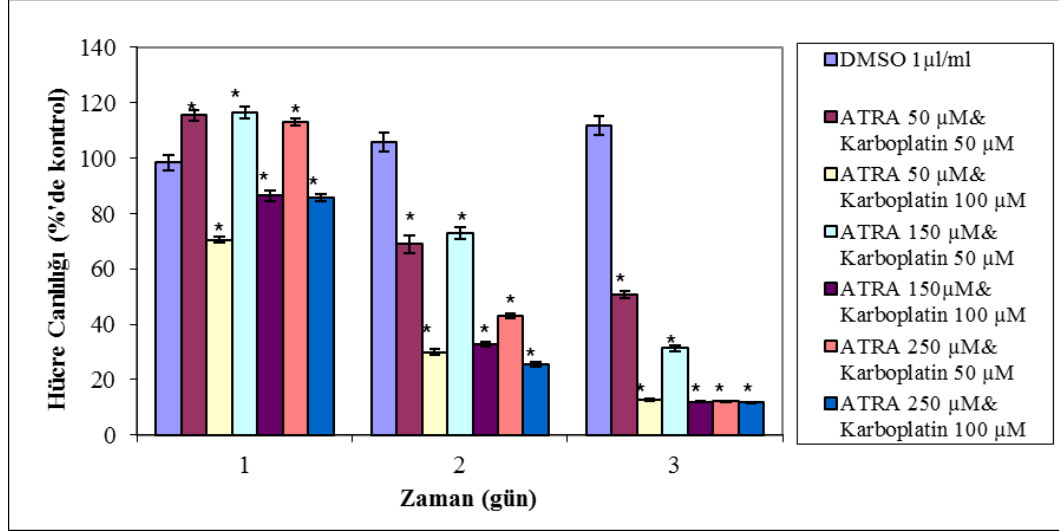
Kombinasyonun 48 saat boyunca uygulanması sonucunda, ATRA'nın 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile paklitakselin 2,5 nM'lık dozu ile muamele sonunda hücre canlılığı % 25 iken, ATRA'nın 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile paklitakselin 100 nM'lık uygulaması hücre canlılığını % 76 azaltmıştır. ATRA'nın 150  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile paklitakselin 2,5 nM'lık doz uygulaması sonucu hücre canlılık oranı % 23'dür. ATRA'nın 150  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile paklitakselin 100 nM'lık doz uygulaması sonucu hücre canlılık oranı % 22'dir. ATRA'nın 250  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile paklitakselin 2,5 nM'lık dozunun uygulanması sonucu hücre canlılığı % 23 iken, ATRA'nın 250  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile paklitakselin 100 nM'lık doz ile muamelesi hücre canlılığını % 78 azaltmıştır. ATRA 50  $\mu\text{M}$ , ATRA 150  $\mu\text{M}$  ve ATRA 250  $\mu\text{M}$  OVCAR-3 hücrelerine 48 saat boyunca uygulandığında hücre canlılıkları üzerinde meydana gelen azalma oranları sırası ile % 82, %83 ve % 71'dir. Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu hücre canlılığı üzerinde 48 saat muamele sonrası % 66 azalmaya neden olurken 100 nM'lık doz uygulaması sonucu hücre canlılık oranı % 18'dir. Maddelerin belirtilen dozları tek başlarına hücreler üzerinde kombinasyon halinde uygulanmalarıyla benzer sitotoksik etki göstermiştir.

ATRA, paklitaksel kombinasyonunun 72 saat muamelesi sonunda hücre canlılık oranları;

- ATRA 50  $\mu\text{M}$  & Paklitaksel 2,5 nM için % 12,
- ATRA 50 $\mu\text{M}$  & Paklitaksel 100 nM için % 9,
- ATRA 150 $\mu\text{M}$  & Paklitaksel 2,5 nM için % 8,
- ATRA 150 $\mu\text{M}$  & Paklitaksel 100 nM için % 13,
- ATRA 250  $\mu\text{M}$  & Paklitaksel 2,5 nM için % 10,
- ATRA 250  $\mu\text{M}$  & Paklitakselin 100 nM için % 11'dir.

Kombinasyonda uygulanan ATRA'nın 50-150  $\mu\text{M}$ 'dozları tek başlarına uygulandığında OVCAR-3 hücre canlılığını 72 saat muamele sonunda % 82, 250  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamasında ise hücre canlılığı %84 azalmıştır. Kombinasyonda kullanılan paklitakselin 2,5 nM'lık dozu hücre canlılığını % 90 azaltırken 100 nM'lık dozu % 89 azaltmıştır. Maddelerin seçilen dozları ile kombinasyon uygulamaları da 72 saat sonunda, hücreler üzerinde tek başlarına etki ettikleri kadar sitotoksik etki göstermiştir (Şekil 3.1.1, 3.1.3 ve 3.1.4).

### 3.1.5. ATRA & Karboplatin kombinasyonunun OVCAR-3 hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri



**Şekil 3.1.5.** ATRA & Karboplatin kombinasyonunun OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi, (\*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir, Anlamlılık değeri  $p < 0,05$

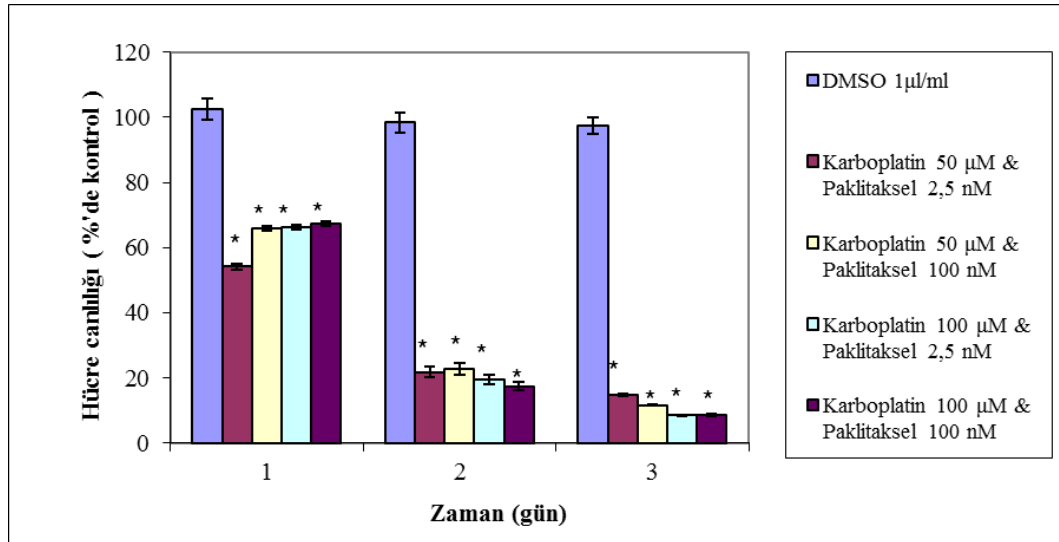
ATRA'nın 50 µM'lık dozu ile karboplatinin 50 µM'lık dozunun 24 saat muamelesi hücre canlılığı üzerinde bir etkiye neden olmamıştır (Şekil 3.1.5). ATRA'nın 50 µM'lık dozu ile karboplatinin 100 µM'lık dozunun uygulanması hücre canlılığını % 30 azaltmıştır. ATRA'nın 150 µM'lık dozu ile karboplatinin 50 µM'lık dozunun birlikte uygulanması hücre canlılığını azaltıcı bir etki göstermemiştir. ATRA'nın 150 µM'lık dozu ile karboplatin 100 µM'lık dozu hücre canlılığını % 14 azaltmıştır. ATRA'nın 250 µM'lık dozu ile karboplatin 50 µM'lık dozunun muamelesi sonucu hücre canlılık oranında bir değişim olmamıştır. ATRA'nın 250 µM'lık dozu ile karboplatin 100 µM'lık dozu hücre canlılığını % 14 azaltmıştır. ATRA ve karboplatinin farklı dozları ile oluşturulan kombinasyonlar 24 saat muamele sonunda, hücre canlılıkları üzerine maddelerin tek başına uygulanmaları kadar etki göstermemiştir.

ATRA'nın 50 µM'lık dozu ile karboplatinin 50 µM'lık dozunun 48 saat muamelesi sonucu hücre canlılığı % 69'dur. ATRA'nın 50 µM'lık dozu ile karboplatinin 100 µM'lık dozunun uygulanması hücre canlılığını % 30 azaltmıştır. ATRA'nın 150 µM'lık dozu ile karboplatinin 50 µM'lık dozunun birlikte

uygulanması hücre canlılığı % 73'dür. ATRA'nın 150  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile karboplatin 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozu hücre canlılığını % 67 azaltmıştır. ATRA'nın 250  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile karboplatin 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozunun muamelesi sonucu hücre canlılık oranı % 43'dür. ATRA'nın 250  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile karboplatinin 100 nM'lık dozu hücre canlılığını % 74 azaltmıştır.

ATRA'nın 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile karboplatinin 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozunun 72 saat muamelesi sonucu hücre canlılığı % 51'dir. ATRA'nın 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile karboplatinin 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozunun uygulanması hücre canlılığını % 87 azaltmıştır. ATRA'nın 150  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile karboplatinin 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozunun birlikte uygulanması hücre canlılığını % 69 azaltmıştır. ATRA'nın 150  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile karboplatin 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozu hücre canlılığını % 88 azaltmıştır. ATRA'nın 250  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile karboplatin 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozunun muamelesi sonucu hücre canlılık oranı % 12'dir. ATRA'nın 250  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile karboplatin 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozu hücre canlılığını % 88 azaltmıştır. ATRA ve karboplatinin kombinasyonda kullanılan dozlarının tek başına uygulaması hücreler üzerinde daha fazla sitotoksik etki göstermiştir (Şekil 3.1.1, 3.1.2 ve 3.1.5).

### 3.1.6. Karboplatin & Paklitaksel kombinasyonunun OVCAR-3 hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri



Şekil 3.1.6. Karboplatin & Paklitaksel kombinasyonunun OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi, (\*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir, anlamlılık değeri  $p < 0,05$

OVCAR-3 hücre hattına farklı dozlarda uygulanan Paklitaksel & Karboplatin kombinasyon uygulaması sonrası hücrelerin canlılık oranları, 24 saat sonunda;

Karboplatin 50  $\mu$ M & Paklitaksel 2,5 nM için % 54,  
Karboplatin 50  $\mu$ M & Paklitaksel 100 nM için % 66,  
Karboplatin 100  $\mu$ M & Paklitaksel 2,5 nM için % 66,  
Karboplatin 100  $\mu$ M & Paklitaksel 100 nM için % 67'dir,

48 saat sonunda;

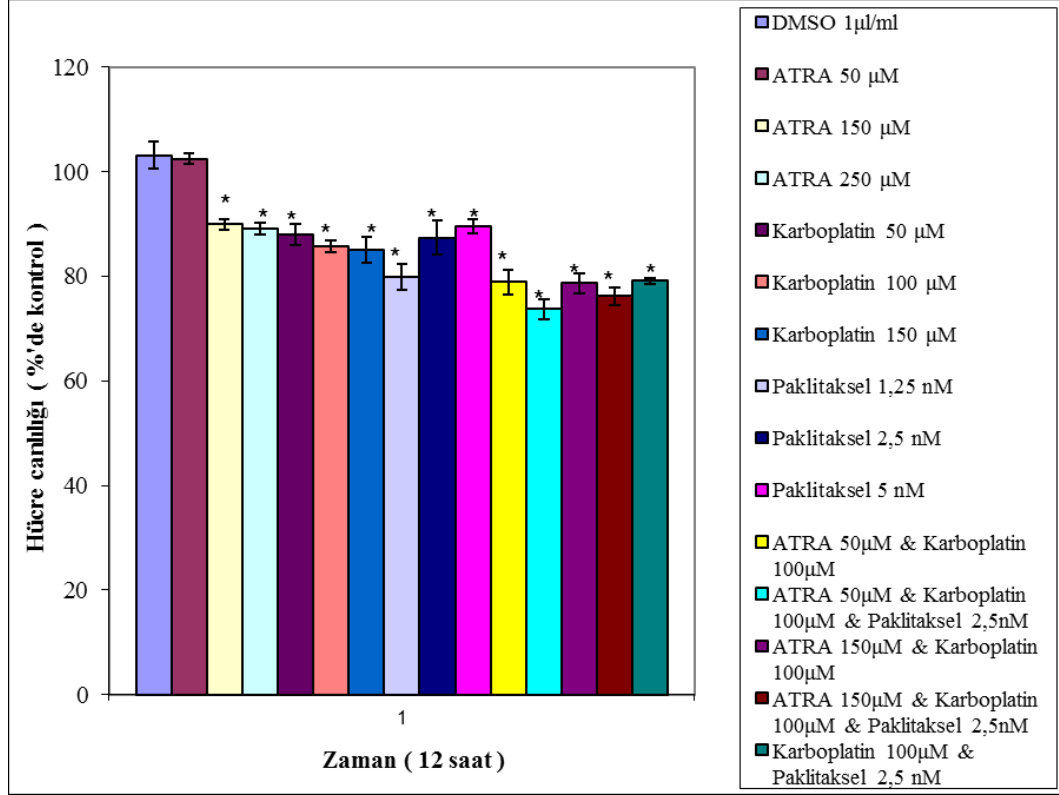
Karboplatin 50  $\mu$ M & Paklitaksel 2,5 nM için % 22,  
Karboplatin 50  $\mu$ M & Paklitaksel 100 nM için % 23,  
Karboplatin 100  $\mu$ M & Paklitaksel 2,5 nM için % 19,  
Karboplatin 100  $\mu$ M & Paklitaksel 100 nM için % 17'dir,

72 saat sonunda;

Karboplatin 50  $\mu$ M & Paklitaksel 2,5 nM için % 15,  
Karboplatin 50  $\mu$ M & Paklitaksel 100 nM için % 12,  
Karboplatin 100  $\mu$ M & Paklitaksel 2,5 nM için % 9,  
Karboplatin 100  $\mu$ M & Paklitaksel 100 nM için % 9'dir.

Farklı dozlar kullanılarak hücrelere zamana bağlı olarak uygulanan Karboplatin & Paklitaksel kombinasyonu 48 ve 72. saat uygulamalarında, maddelerin tek başlarına getirdikleri sitotoksik etkiden daha fazla etkili olmuşlardır (Şekil 3.1.6).

### 3.1.7. ATRA & Karboplatin & Paklitaksel kombinasyonunun OVCAR-3 hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri



Şekil 3.1.7.a. ATRA, Karboplatin ve Paklitakselin tek başlarına ve kombinasyonlarının OVCAR-3 hücreleri üzerindeki 12 saatlik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi, (\*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir, Anlamlılık değeri  $p < 0,05$

Kanser kemoterapisinde kombinasyon ilaç kullanılmasının amacı, organizmanın hızlı bölünen sağlıklı hücrelerinin zarar görmemesidir. Bu nedenle ya kemoterapötik ajanların etkisiz dozları kombine edilerek muamele süresi uzatılmakta ya da etkili dozları kombine edilerek muamele süreleri kısaltılmaktadır. Biz çalışmamızda belirlediğimiz maddelerin  $IC_{50}$  değerlerini kombine ederek 12 saat muamele sonunda hücrelerde meydana getirdiği apoptotik etkileri belirledik. Seçtiğimiz dozlar 12 saat boyunca tek başlarına hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermediler (Şekil 3.1.7.a). Ayrıca oluşturduğumuz kombinasyonların hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacı ile,



hücreleri kombinasyonlar ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele ettik (Şekil 3.1.7.b ve Şekil 3.1.7.c).

ATRA, Karboplatin ve Paklitakselin tek başlarına ve kombinasyonları halinde OVCAR-3 hücreleri ile 12 saat boyunca muamele edilmişlerdir. Elde edilen verilere göre 12 saat boyunca muamele sonunda OVCAR-3 hücrelerinin canlılıkları üzerinde belirgin bir azalma gözlenmemiştir.

ATRA'nın 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile muamelesi OVCAR-3 hücre sayısında önemli bir azalmaya neden olmamıştır.

ATRA'nın 150  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulaması sonucu OVCAR-3 hücrelerinin hücre canlılık oranı % 90,

ATRA'nın 250  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile muamelesi sonunda OVCAR-3 hücrelerinin hücre canlılık oranı % 89,

Karboplatinin 50  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulaması sonucu OVCAR-3 hücrelerindeki hücre canlılığı % 88,

Karboplatinin 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile muamelesi sonunda OVCAR-3 hücrelerinin hücre canlılık oranı % 86,

Karboplatinin 150  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulaması sonucu OVCAR-3 hücrelerindeki hücre canlılığı % 85,

Paklitakselin 1,25 nM'lık dozu ile muamelesi sonunda OVCAR-3 hücrelerinin hücre canlılık oranı % 80,

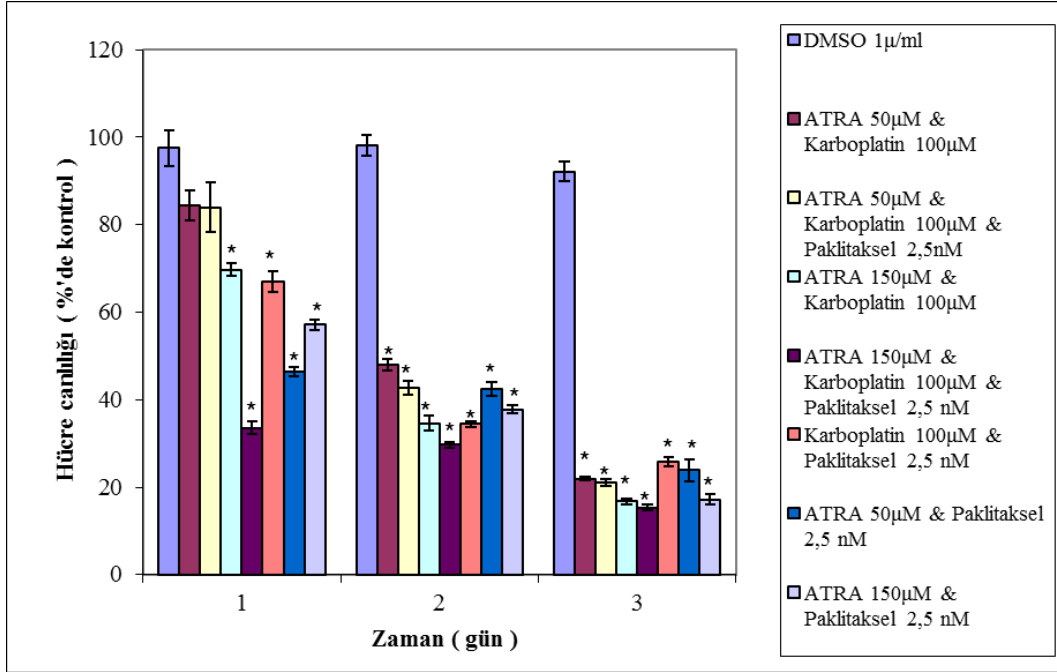
Paklitakselin 2,5 nM'lık doz uygulaması sonucu OVCAR-3 hücrelerindeki hücre canlılığı % 87,

Paklitakselin 5 nM'lık dozu ile muamelesi sonunda OVCAR-3 hücrelerinin hücre canlılık oranı % 90,

ATRA'nın 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile Karboplatinin 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozunun, OVCAR-3 hücrelerine birlikte uygulanması sonucunda hücre canlılık oranı % 79,

ATRA'nın 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile Karboplatinin 100'lık dozu ve Paklitakselin 2,5 nM'lık dozunun, OVCAR-3 hücrelerine birlikte uygulanması sonucunda hücre canlılık oranı % 74,

ATRA'nın 150  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile Karboplatinin 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozunun, OVCAR-3 hücrelerine birlikte uygulanması sonucunda hücre canlılık oranı % 79'dur (Şekil 3.1.7.a).



**Şekil 3.1.7.b.** ATRA, Karboplatin, Paklitaksel kombinasyonunun OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi, (\*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri  $p < 0,05$

ATRA 50 µM ve Karboplatin 100 µM aynı anda OVCAR-3 hücreleri 24 saat, 48 saat ve 72 saat muamele edilmiştir. Zamana bağlı olarak ilk 24 saatte OVCAR-3 hücrelerinde hücre canlılığı oranı % 84'dür. 48 saat sonunda hücre canlılığında % 52 azalma görülürken, muamelenin 72. saatinde OVCAR-3 hücrelerinin hücre canlılığının oranı % 21'dir.

ATRA 50 µM, Karboplatin 100 µM ve Paklitaksel 2,5 nM aynı anda OVCAR-3 hücreleri ile muamele edilmiştir. Muamelenin ilk 24 saatinde OVCAR-3 hücrelerinde görülen canlılık oranı % 84'dür. 48. saat sonunda kombinasyon uygulaması hücre canlılığını % 57 azalmıştır. 72. saat sonunda OVCAR-3 hücrelerinin hücre canlılık oranı % 21'dir.

ATRA 150 µM ve Karboplatin 100 µM'lık dozları birlikte OVCAR-3 hücre hattı üzerine 24 saat, 48 saat ve 72 saat süre ile muamele edilmiştir. 24 saatlik muamele sonunda OVCAR-3 hücrelerinde hücre canlılık oranı % 70'dir. 48. saatin sonunda hücrelerin canlılık oranlarında % 65 azalmıştır.

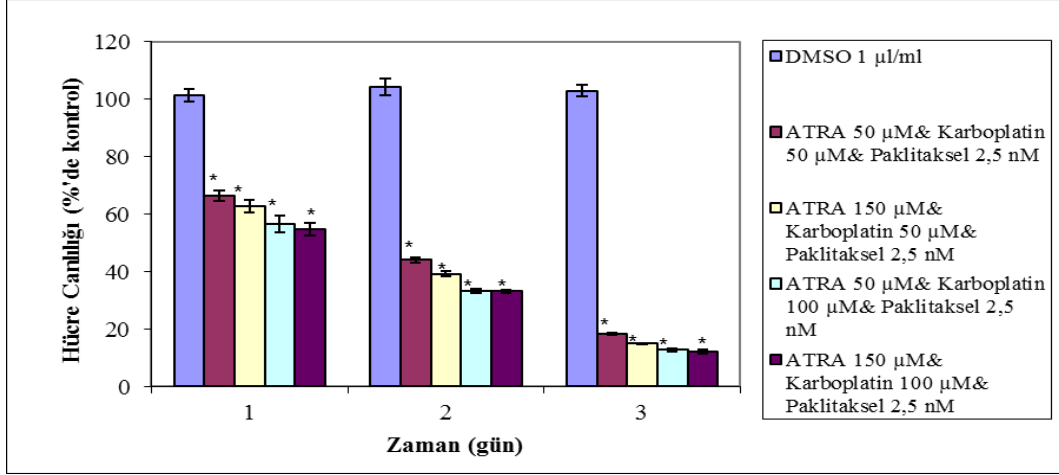
Kombinasyonun 72 saatlik uygulaması sonunda hücrelerin canlılık oranları % 17'dir.

ATRA 150  $\mu\text{M}$ , Karboplatin 100  $\mu\text{M}$  ve Paklitaksel 2,5 nM aynı anda OVCAR-3 hücre hattına 24 saat, 48 saat ve 72 saat süre ile uygulandığında zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etki ettiği saptanmıştır. Muamelenin ilk 24 saatinde OVCAR-3 hücrelerinde görülen canlılık oranı % 34'dür. 48. saat sonunda kombinasyon uygulaması hücre canlılığı % 70 azalmıştır. 72. saat sonunda OVCAR-3 hücrelerinin hücre canlılık oranı % 15'dir.

Karboplatin 100  $\mu\text{M}$ 'ı ve Paklitaksel 2,5 nM'ı eş zamanlı olarak OVCAR-3 hücreleri üzerine 24 saat, 48 saat ve 72 saat süre ile uygulanmıştır. Muamelenin ilk 24 saatinde OVCAR-3 hücrelerinde görülen canlılık oranı % 67'dir. 48. saat sonunda kombinasyon uygulaması hücre canlılığını % 66 azaltmıştır. 72. saat sonunda OVCAR-3 hücrelerinin hücre canlılık oranı % 26'dır.

ATRA 50  $\mu\text{M}$  ve Paklitaksel'in 2,5 nM'lık dozları birlikde OVCAR-3 hücre hattı üzerine 24 saat, 48 saat ve 72 saat süre ile muamele edilmiştir. 24 saatlik muamele sonunda OVCAR-3 hücrelerinde hücre canlılık oranı % 46'dır. 48. saatin sonunda hücrelerin canlılık oranlarındaki azalma oranı % 58'dir. Kombinasyonun 72 saatlik uygulaması sonunda hücrelerin canlılık oranları % 24'tür.

ATRA 150  $\mu\text{M}$  ve Paklitaksel'in 2,5 nM'lık dozları aynı anda OVCAR-3 hücreleri ile muamele edilmiştir. Muamelenin ilk 24 saatinde OVCAR-3 hücrelerinde görülen canlılık oranı % 57'dir. 48. saatin sonunda hücrelerin canlılık oranlarındaki azalma oranı % 62'dir. 72. saat sonunda OVCAR-3 hücrelerinin hücre canlılık oranı % 17'dir (Şekil 3.1.7.b).



**Şekil 3.1.7.c.** ATRA, Karboplatin, Paclitaxel kombinasyonunun OVCAR-3 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi, (\*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir, anlamlılık değeri  $p < 0,05$

Kombinasyonların dozlara ve zamana bağlı olarak OVCAR-3 hücrelerinin hücre canlılıkları üzerine meydana getirdiği azalmalar, 24 saat muamele sonunda;

ATRA 50 µM & Karboplatin 50 µM & Paclitaxel 2,5 nM % 34,  
 ATRA 150 µM & Karboplatin 50 µM & Paclitaxel 2,5 nM % 37,  
 ATRA 50 µM & Karboplatin 100 µM & Paclitaxel 2,5 nM % 43,  
 ATRA 150 µM & Karboplatin 100 µM & Paclitaxel 2,5 nM % 45'dir.

48 saat muamele sonunda;

ATRA 50 µM & Karboplatin 50 µM & Paclitaxel 2,5 nM % 56,  
 ATRA 150 µM & Karboplatin 50 µM & Paclitaxel 2,5 nM % 61,  
 ATRA 50 µM & Karboplatin 100 µM & Paclitaxel 2,5 nM % 67,  
 ATRA 150 µM & Karboplatin 100 µM & Paclitaxel 2,5 nM % 67'dir.

72 saat muamele sonunda;

ATRA 50 µM & Karboplatin 50 µM & Paclitaxel 2,5 nM % 82,  
 ATRA 150 µM & Karboplatin 50 µM & Paclitaxel 2,5 nM % 85,  
 ATRA 50 µM & Karboplatin 100 µM & Paclitaxel 2,5 nM % 87,  
 ATRA 150 µM & Karboplatin 100 µM & Paclitaxel 2,5 nM % 88'dir

(Şekil 3.1.7.c).

Kombinasyonlarda uygulanan ATRA'nın 50 µM'dozu tek başına uygulandığında OVCAR-3 hücre canlılığını 24 saat muamelede % 47, 48 ve 72 saat muamelede %82 azaltmıştır. ATRA'nın 150 µM'dozu 24 saat muamele sonunda %52 hücre canlılığına neden olduğu için çalışmamızda IC<sub>50</sub> değeri olarak seçilmiştir. 48 ve 72 saatlik muamele sonunda ATRA 150 µM'lık doz uygulaması hücre canlılığını % 82 azaltmıştır. İkili kombinasyonlarda kullanılan ATRA'nın 250 µM'lık dozu hücre canlılığını ilk 24 saat uygulamada % 54, 48 saat sonunda % 72, 72 saat uygulama sonunda % 82 azaltmıştır (Şekil 3.1.1).

Çalışmamızda kombinasyonlarda karboplatinin 50 µM ve 100 µM'lık dozları kullanılmıştır. 50 µM'lık dozu ile muamele sonrasında OVCAR-3 hücre canlılıkları 24 saat için % 68, 48 saat için % 35, 72 saat için %19'dur. 100 µM'lık doz ile muamele sonunda 24 saat sonunda hücre canlılığında görülen azalma miktarı % 46, 48 saat sonunda % 66, 72 saat sonunda ise % 81'dir (Şekil 3.1.2).

Kombinasyonlarda kullanılan paklitaksel dozları 2,5nM ve 100 nM'dır. Paklitakselin 2,5 nM'lık uygulaması hücre canlılığını 24 saat sonunda % 44, 48 saat sonunda % 66, 72 saat sonunda ise % 90 azaltmıştır. 100 nM'lık doz uygulaması hücre canlılık oranlarını 24 saat sonunda % 57, 48 saat sonunda % 82, 72 saat sonunda ise % 89 azaltmıştır (Şekil 3.1.3).

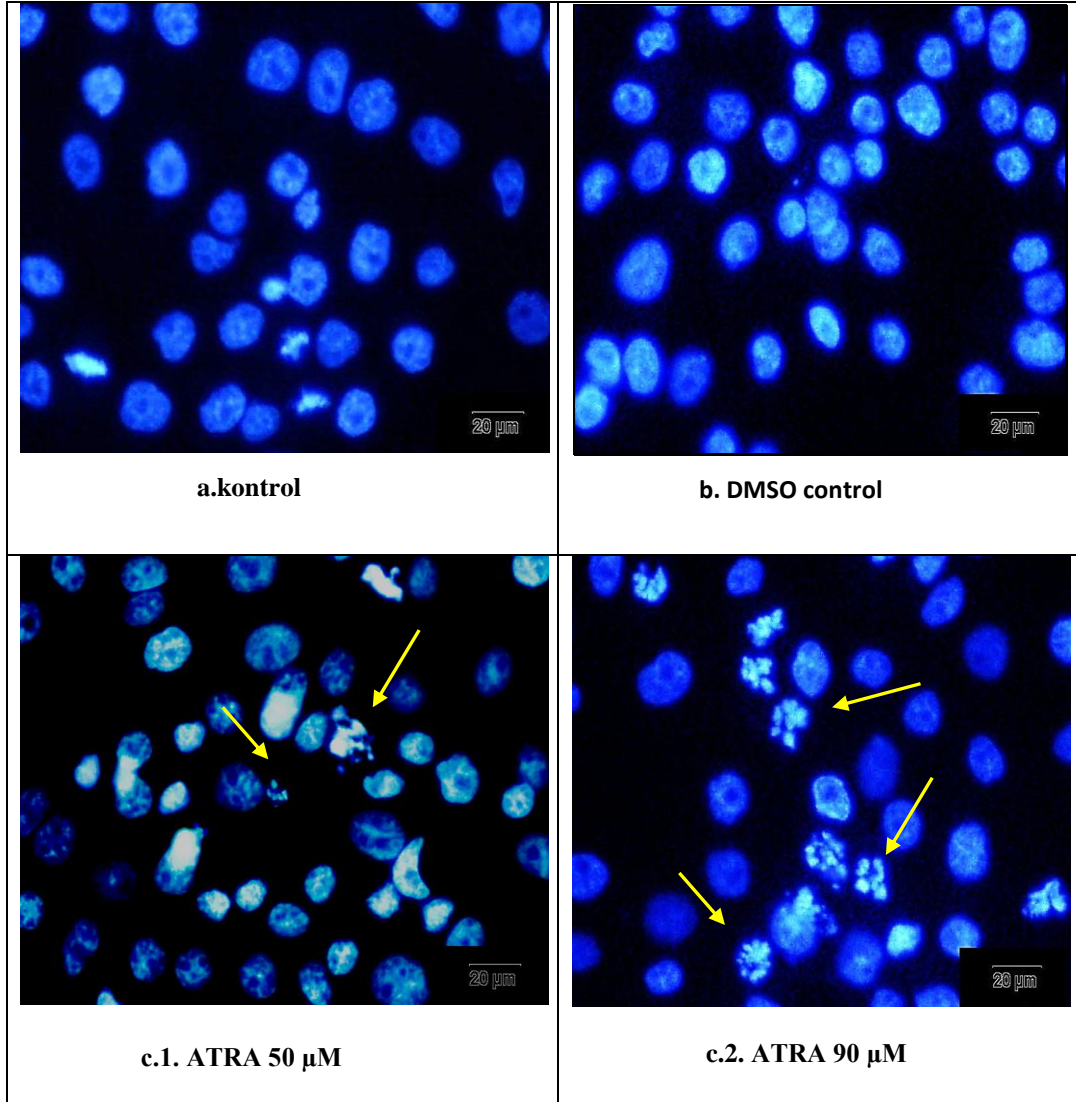
Yaptığımız çalışmada Karboplatin & Paklitaksel kombinasyonu şekil 3.1.4'te gösterildiği gibi OVCAR-3 hücreleri üzerinde diğer kombinasyonlara göre daha yüksek sitotoksik etki göstermiştir.

Çalışmamızda ATRA & Karboplatin & Paklitaksel kombinasyonu hücreler üzerinde, ATRA & Paklitaksel ve ATRA & Karboplatin kombinasyonlarından daha yüksek sitotoksik etki göstermiştir.

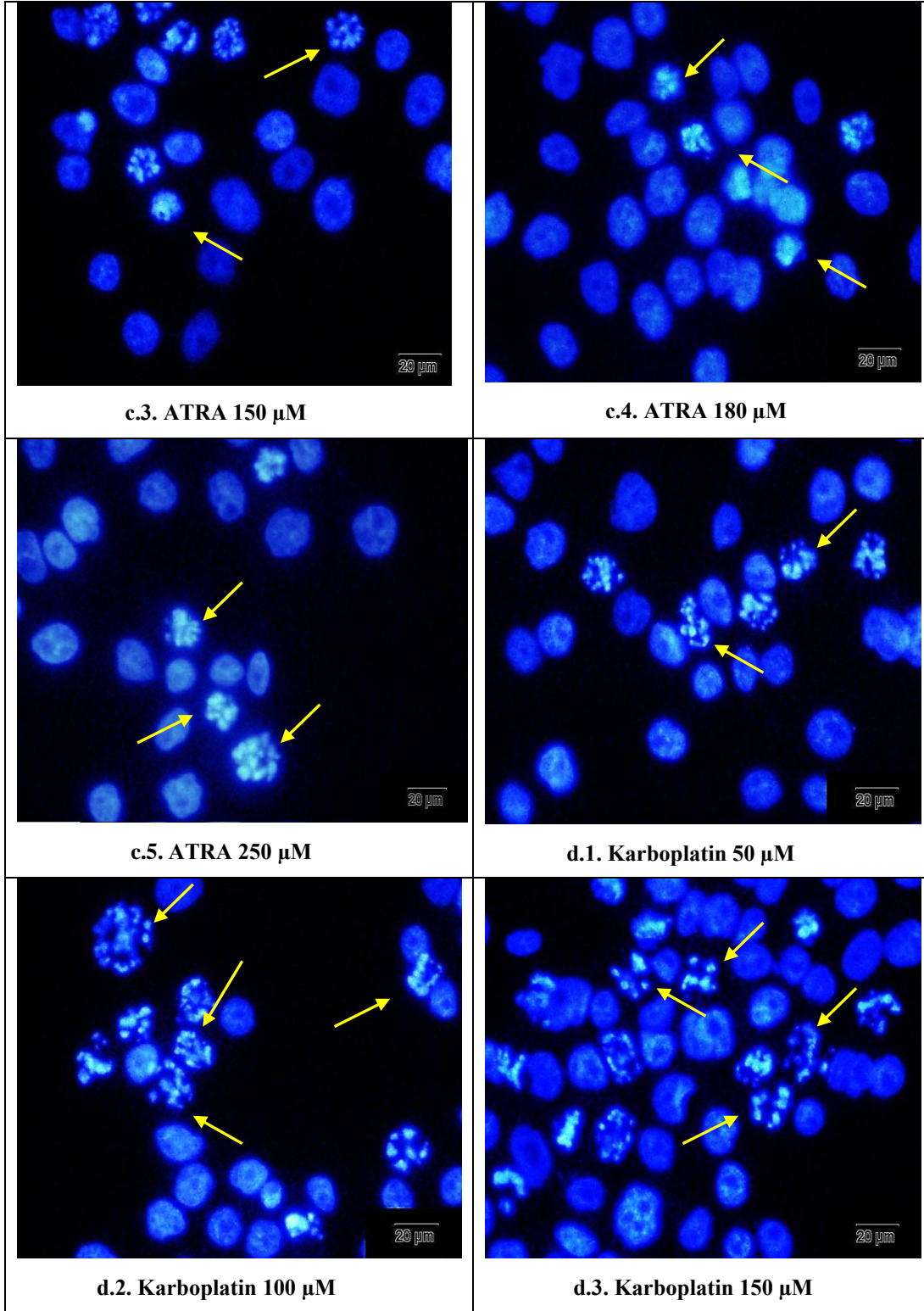
ATRA'nın IC<sub>50</sub> değeri olarak belirlediğimiz 150 µM'lık dozu ile daha az etkili olarak seçtiğimiz 50 µM'lık dozu, çalışmamızda belirlenen karboplatin ve paklitakselin IC<sub>50</sub> değerleri ile kombine edilerek, kombinasyonların hücreler üzerindeki apoptotik etkileri ve belirlediğimiz genlerin anlatım seviyeleri üzerindeki etkileri incelenmiştir.

### 3.2. DAPI Boyama Sonuçları

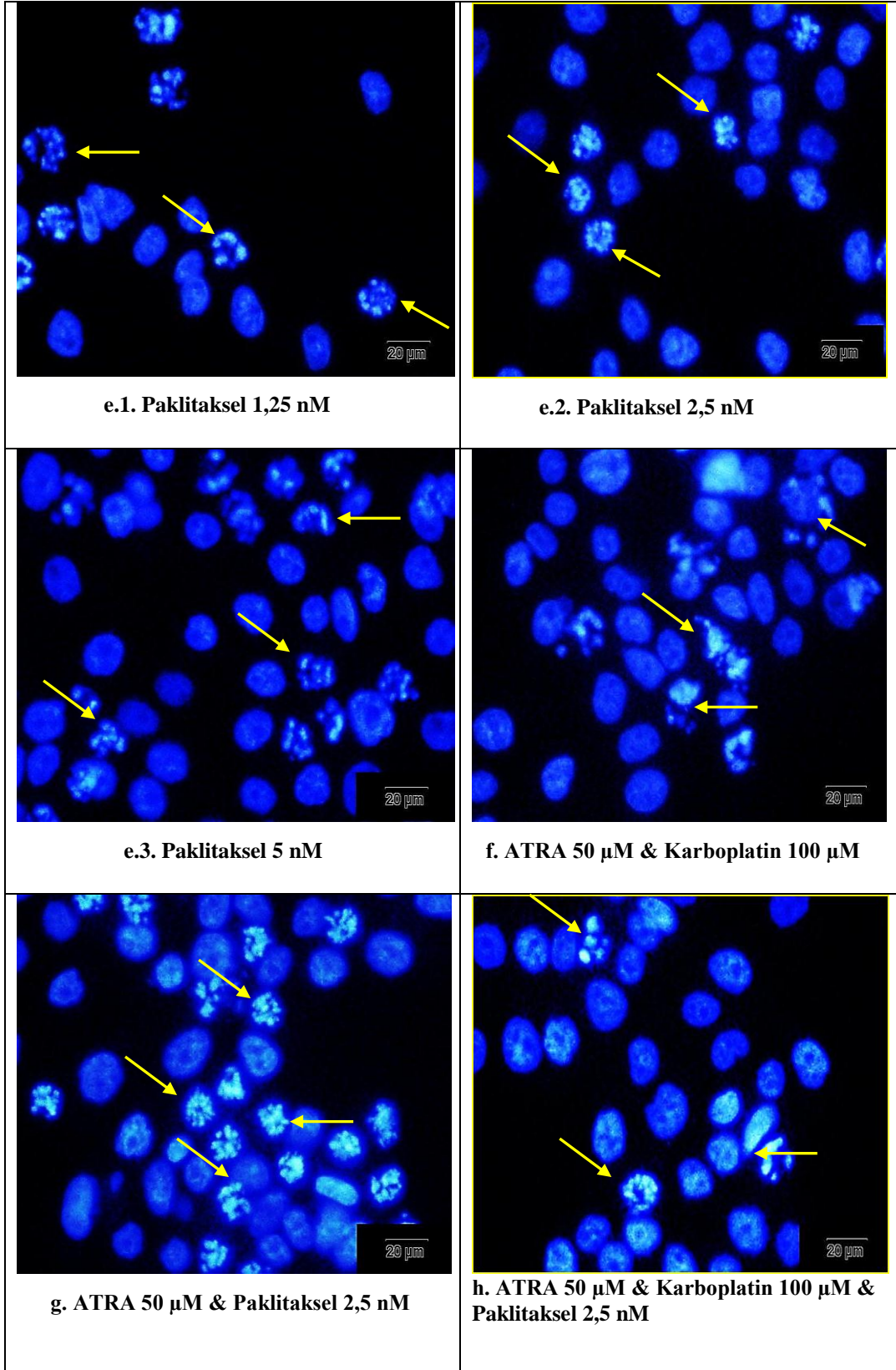
Apoptotik etkinin belirlenmesi için kaspaz-3 yöntemi ve DAPI boyama tekniği kullanılmıştır. Kaspaz-3 testi hücrelere 12 ve 24 saatlik iki grup halinde uygulanmıştır. DAPI boyama ile 12 saatlik muamele sonunda maddelerin hücreler üzerinde tek başına ve kombinasyon olarak oluşturdukları etkiler belirlenmiştir.



**Şekil.3.2.1.** OVCAR-3 hücrelerinin DAPI boyamaları. **a.**Kontrol, **b.**DMSO, **c.1.**ATRA 50 µM, **c.2.**ATRA 90 µM, Ölçü birimi:20 µm

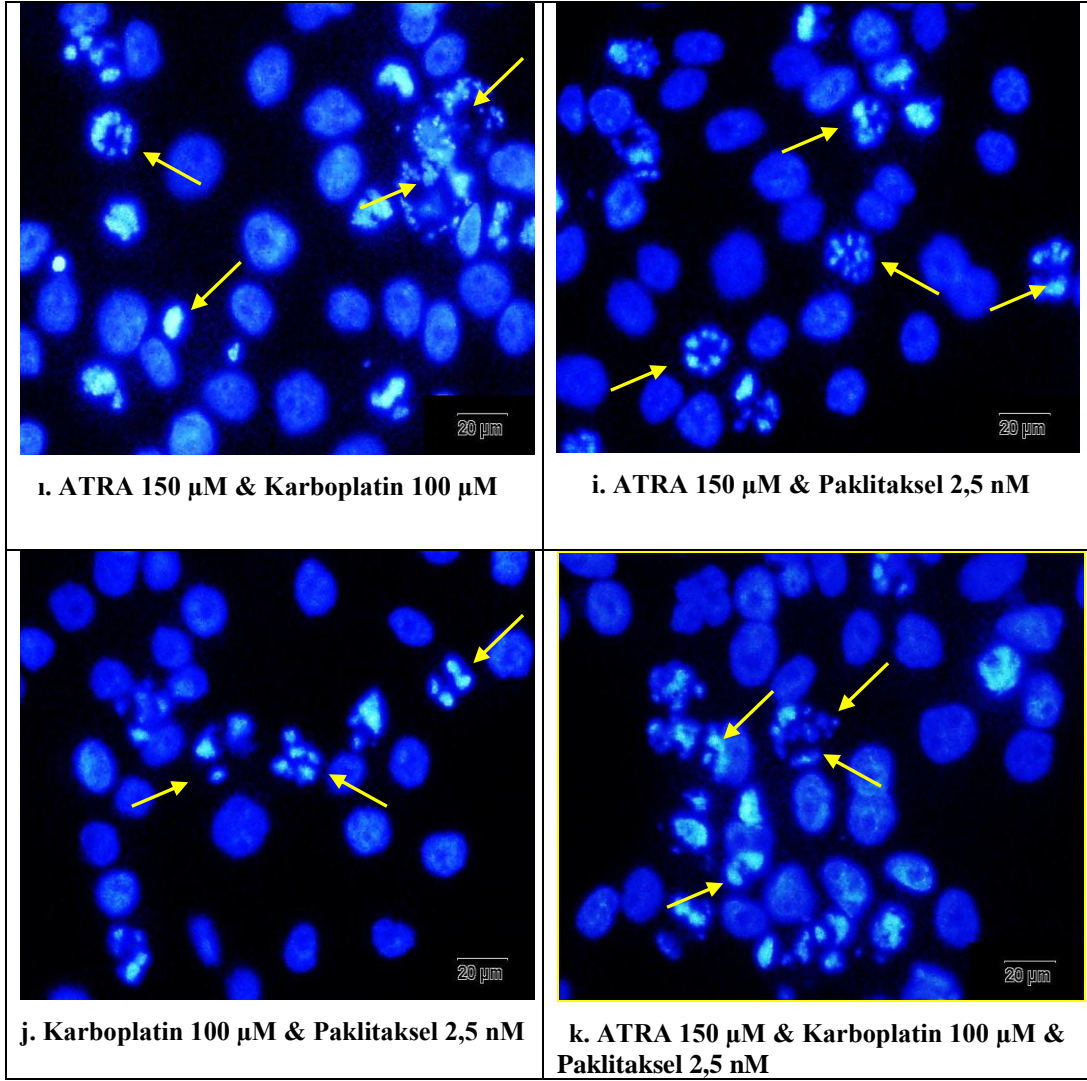


**Şekil.3.2.2.** OVCAR-3 hücrelerinin DAPI boyamaları, **c.3.** ATRA 150 µM, **c.4.** ATRA 180 µM, **c.5.** ATRA 250 µM, **d.1.** Karboplatin 50 µM, **d.2.** Karboplatin 100 µM, **d.3.** Karboplatin 150 µM, Ölçü birimi: 20 µm



**Şekil.3.2.3.** OVCAR-3 hücrelerinin DAPI boyamaları, **e.1.**Paklitaksel 1,25 nM, **e.2.** Paklitaksel 2,5 nM, **e.3.** Paklitaksel 5 nM, **f.**ATRA 50 µM & Karboplatin 100 µM, **g.** ATRA 50 µM & Paklitaksel 2,5nM,**h.**ATRA 50µM&Karboplatin 100µM&Paklitaksel 2,5 nM,Ölçü birimi:20µm





**Şekil.3.2.4.** OVCAR-3 hücrelerinin DAPI boyamaları, **i.** ATRA 150  $\mu$ M & Karboplatin 100  $\mu$ M, **i.** ATRA 150  $\mu$ M & Paklitaksel 2,5 nM, **j.** Karboplatin 100  $\mu$ M & Paklitaksel 2,5 nM, **k.** ATRA 150  $\mu$ M & Karboplatin 100  $\mu$ M & Paklitaksel 2,5 nM

ATRA, Karboplatin ve Paklitakselin tek başlarına ve kombinasyonlarının OVCAR-3 hücreleri üzerinde getirdiği apoptotik etkilerin morfolojik olarak saptanabilmesi için hücreler maddeler ile 12 saat boyunca muamele edilmiş ve DAPI boyama yapılmıştır. Hücrelerde meydana gelen apoptotik badi ve bleppingler sarı oklarla gösterilmiştir.

ATRA'nın 50  $\mu$ M'lık dozu hücre sayısında azalmaya neden olmamıştır fakat hücrelerde az miktarda apoptotik badi oluşumu görülmüştür (Şekil 3.2.1. c.1),

ATRA'nın 90  $\mu\text{M}$ 'lık dozu hücre sayısında azalmaya neden olmuştur. Hücrelerde doz uygulamasına bağlı olarak apoptotik badi oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3.2.1.c.2),

ATRA'nın 150  $\mu\text{M}$ 'lık dozu hücre sayısında belirgin miktarda artışa neden olduğu gözlenmiştir. Hücrelerde apoptotik badi oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3.2.2.c.3),

ATRA'nın 180  $\mu\text{M}$ 'lık doz ve 250  $\mu\text{M}$ 'lık doz muamelesi sonucu hücre sayısında azalma olmuştur, hücrelerde apoptotik badi oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3.2.2.c.4 ve Şekil 3.2.2.c.5),

Karboplatin 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozu hücre sayısında belirgin olarak azalmaya neden olmuştur, muamelesi sonucu apoptotik badi oluşumları gözlemlenmiştir (Şekil 3.2.2.d.1),

Karboplatin 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozu hücre sayısında azalma olmuştur ve apoptotik badi oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 3.2.2.d.2),

Karboplatin 150  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile muamele sonucunda OVCAR-3 hücrelerinde apoptotik badi oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 3.2.2.d.3),

Paklitakselin 1,25 nM'lık dozu ile muamele sonucunda apoptotik badi oluşumları gözlenmiştir (Şekil 3.2.3.e.1),

Paklitakselin 2,5 nM'lık ve 5 nM'lık dozu ile muamele sonunda apoptotik badi oluşumları gözlenmiştir, Paklitakselin 5 nM'lık dozu ile muamele hücrelerde daha fazla apoptotik badi oluşumuna neden olmuştur (Şekil 3.2.3.e.2 ve Şekil 3.2.3.e.3),

ATRA'nın 50  $\mu\text{M}$  'lık dozu ve Karboplatinin 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozu hücrelere birlikte muamele edilmiş ve apoptotik badi oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3.2.3.f),

ATRA'nın 50  $\mu\text{M}$  'lık dozu ve Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu hücrelere birlikte muamele edilmiş ve hücrelerde oldukça fazla sayıda apoptotik badi oluşumuna neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.2.3.g),

ATRA'nın 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozu, Karboplatinin 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ve Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu birlikte muamele edildiğinde hücrelerde apoptotik badi oluşumu gözlenmiştir, bu oranın ATRA'nın 50  $\mu\text{M}$  'lık dozu ve Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu ile kombinasyonundan daha az olduğu saptanmıştır (Şekil 3.2.3.h ve Şekil 3.2.3.g),

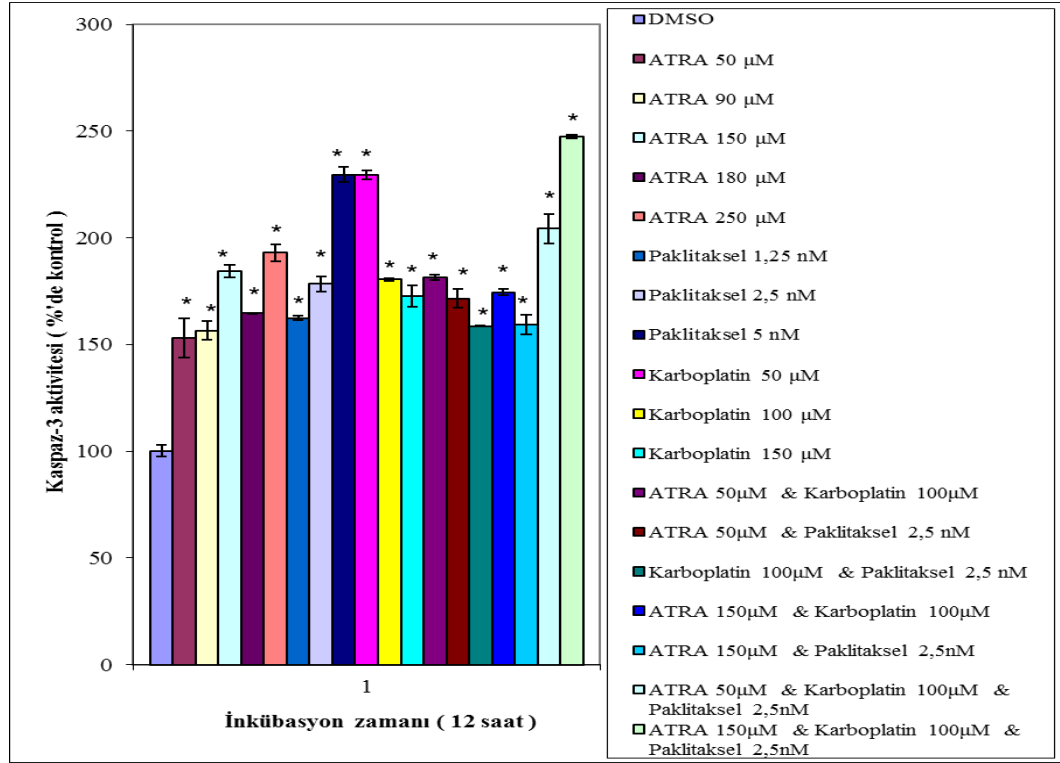
ATRA'nın 150  $\mu\text{M}$ 'lık dozu, Karboplatinin 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozunun hücrelere uygulanması sonucunda hücrelerde apoptotik badi oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3.2.4.i),

ATRA'nın 150  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ve Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu hücrelere birlikte uygulandığında diğer kombinasyon uygulamalarına karşın daha az apoptotik badi gözlendiği görülmüştür. Aynı sonuç OVCAR-3 hücrelerine uygulanan Karboplatinin 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ve Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu ile kombinasyonunun muamelesinde de görülmüştür (Şekil 3.2.4.i. ve Şekil 3.2.4.j),

ATRA'nın 150  $\mu\text{M}$ 'lık dozu, Karboplatinin 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ve Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu birlikte muamele edildiğinde hücrelerde apoptotik badi oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3.2.4.k).

Tek başına OVCAR-3 hücreleri ile yapılan doza bağlı uygulamalarda ATRA'nın en az apoptotik badi oluşumuna yol açtığı görülmüştür. Karboplatinin 150  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ve Paklitakselin 5 nM'lık dozu tek başına yapılan uygulamada en etkindir. Kombinasyon uygulamaları arasında DAPI boyama sonucu en fazla apoptotik badi oluşumu, ATRA'nın 150  $\mu\text{M}$ 'lık dozu, Karboplatinin 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ve Paklitakselin 2,5 nM'lık dozunun birlikte uygulandığı kombinasyon, ATRA'nın 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ve Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu ile uygulanan kombinasyon ve ATRA'nın 150  $\mu\text{M}$ 'lık dozu, Karboplatinin 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozunun birlikte uygulandığı kombinasyonlar olarak saptanmıştır (Şekil. 3.2.4.l, Şekil 3.2.3.h ve Şekil 3.2.4.i).

### 3.3. Kaspaz 3 Elisa Kolorimetrik Testi



Şekil 3.3.1. OVCAR-3 hücrelerinin ATRA, Paklitaksel ve Karboplatin ile tek başlarına ve kombine olarak 12 saatlik muamelesi sonucunda elde edilen Kaspaz-3 sonuçları, (\*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir, Anlamlılık değeri  $p < 0,05$

Maddelerle muamele süresi bitiminde kaspaz-3 aktivitesindeki değişimler kontrol grubu baz alınarak saptanmıştır. Kontrol grubunun kaspaz-3 aktivitesi % 100 olarak kabul edilmiştir.

OVCAR-3 hücreleri ile 12 saat boyunca muamele edilen ATRA'nın uygulanan 50 µM, 90 µM, 150 µM, 180 µM ve 250 µM'lık dozlarının her birisinde kaspaz-3 aktivitesi saptanmıştır. ATRA'nın 90 µM'lık dozu ile 150 µM'lık dozları OVCAR-3 hücre hattında yakın oranda kaspaz-3 aktivitesi göstermektedir. Çalışmada kullandığımız ATRA'nın en yüksek dozu olan 250 µM'lık derişimi en fazla kaspaz-3 aktivitesi göstermiştir.

ATRA'nın doza bağılı olarak 12 saat muamelesi sonucu OVCAR-3 hücrelerinde neden olduğu kaspaz-3 aktiviteleri kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde;

ATRA'nın 50  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamasında kaspaz-3 aktivitesi % 53,

ATRA'nın 90  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamasında kaspaz-3 aktivitesi % 56,

ATRA'nın 150  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamasında kaspaz-3 aktivitesi % 84,

ATRA'nın 180  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamasında kaspaz-3 aktivitesi % 64,

ATRA'nın 250  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamasında kaspaz-3 aktivitesi % 93 olarak belirlenmiştir (şekil 3.3.1).

Hücelere uygulanan Paklitaksel, kaspaz-3 aktivitesini uygulanan doz derişimiyle doğru orantılı olarak artmıştır. Paklitakselin doza bağılı olarak 12 saat muamelesi sonucu OVCAR-3 hücrelerinde neden olduğu kaspaz-3 aktiviteleri kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde;

Paklitakselin 1,25 nM'lık doz uygulamasında kaspaz-3 aktivitesi % 62,

Paklitakselin 2,5 nM'lık doz uygulamasında kaspaz-3 aktivitesi % 78 ,

Paklitakselin 5 nM'lık doz uygulamasında kaspaz-3 aktivitesi % 129 artmıştır.

Karboplatinin belirlenen dozları OVCAR-3 hücre hattı ile 12 saat boyunca muamele edildiğinde kontrol grubuna göre kaspaz-3 aktiviteleri ;

Karboplatinin 50  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamasında % 129 ,

Karboplatinin 100  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamasında % 80,

Karboplatinin 150  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamasında % 73 artmıştır (şekil 3.3.1).

Maddelerin kombinasyonlarının OVCAR-3 hücreleri ile 12 saat muamelesi sonucu, kontrol grubuna göre meydana gelen kaspaz-3 aktivitelerindeki artış;

ATRA'nın 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozunun Karboplatinin 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile birlikte uygulanması sonucu % 82,

ATRA'nın 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozunun Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu ile birlikte uygulanması sonucu % 72,

Karboplatinin 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozunun Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu ile birlikte uygulanması sonucu % 59'dır.

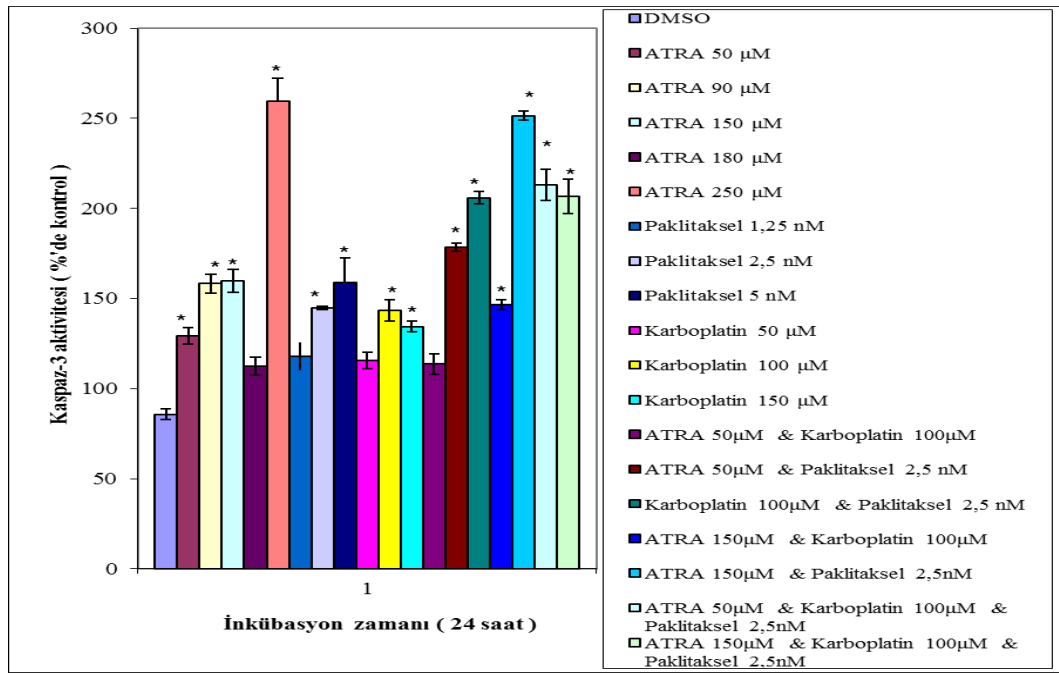
ATRA'nın 150  $\mu\text{M}$ 'lık dozunun Karboplatinin 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile birlikte uygulanması sonucu % 75,

ATRA'nın 150 µM'lık dozunun Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu ile birlikte uygulanması sonucu % 59,

ATRA'nın 50 µM'lık dozu, Karboplatinin 100 µM'lık dozu ve Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu ile birlikte uygulanması sonucu % 104,

ATRA'nın 150 µM'lık dozu, Karboplatinin 100 µM'lık dozu ve Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu ile birlikte uygulanması sonucu % 147'dir.

ATRA'nın 50 µM'lık dozu, Karboplatinin 100 µM'lık dozu ve Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu hücrelere birlikte uygulandığında, uygulanan ikili kombinasyonlara oranla daha fazla kaspaz aktivitesi göstermiştir. ATRA 150 µM'lık dozu, Karboplatinin 100 µM'lık dozu ve Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu hücrelere birlikte uygulandığında kaspaz-3 aktivitesinde önemli oranda artış olduğu saptanmıştır (Şekil 3.3.1).



**Şekil 3.3.2.** OVCAR-3 hücrelerinin ATRA, Paklitaksel ve Karboplatin ile tek başlarına ve kombine olarak 24 saatlik muamelesi sonucunda elde edilen Kaspaz-3 sonuçları, (\*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir, Anlamlılık değeri  $p < 0,05$

ATRA, Karboplatin ve Paklitaksel tek başlarına ve kombinasyonlar halinde OVCAR-3 hücre hattına 24 saat süreyle uygulanmıştır. ATRA'nın

uygulanan 150  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile 180  $\mu\text{M}$ 'lık dozu benzer kaspaz-3 aktivitesi göstermişken, ATRA'nın 250  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulaması hücre hattının kaspaz-3 aktivitesinde önemli oranda artış meydana getirdiği saptanmıştır. Doza bağlı olarak ATRA ile muamele sonucunda kontrol grubuna göre kaspaz-3 aktivasyon oranları;

- ATRA'nın 50  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamasında % 29,
- ATRA'nın 90  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamasında % 58,
- ATRA'nın 150  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamasında % 60,
- ATRA'nın 180  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamasında % 12
- ATRA'nın 250  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamasında % 159'dur.

Paklitakselin doza bağlı olarak 24 saat muamelesi sonucu OVCAR-3 hücrelerinde neden olduğu kaspaz-3 aktiviteleri kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde;

- Paklitakselin 1,25 nM'lık doz uygulaması kaspaz-3 aktivitesini % 18 ,
- Paklitakselin 2,5 nM'lık doz uygulaması kaspaz-3 aktivitesini % 45,
- Paklitakselin 5 nM'lık doz uygulaması kaspaz-3 aktivitesini % 59 oranında arttırmıştır.

Karboplatinin belirlenen dozları OVCAR-3 hücre hattı ile 24 saat boyunca muamele edildiğinde kontrol grubuna göre kaspaz-3 aktivitelerini ;

- Karboplatinin 50  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulaması % 16,
- Karboplatinin 100  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulaması % 43,
- Karboplatinin 150  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulaması % 34 oranında arttırmıştır (Şekil 3.3.2).

ATRA'nın 150  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ile Paklitakselin 2,5 nM'lık dozunun aynı anda hücrelerle muamelesinde kaspaz-3 aktivitesinin ileri derecede arttırmıştır. ATRA ve Paklitakselin kombinasyon olarak uygulanması tek başlarına uygulandıklarından daha yüksek kaspaz-3 aktivitesi meydana getirmiştir. ATRA'nın 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozu, Karboplatinin 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ve Paklitakselin 2,5 nM'lık dozunun aynı anda hücrelere uygulanması sonucu kaspaz-3 aktivitesinde ilaçların tek başlarına meydana getirdiklerinden daha yüksek kaspaz-3 aktivitesi meydana getirdiği saptanmıştır. Söz konusu kombinasyonun OVCAR-3 hücrelerinde meydana getirdiği kaspaz-3 aktivitesi ATRA'nın 150  $\mu\text{M}$ 'lık dozu,

Karboplatinin 100 µM'lık dozu ve Paklitakselin 2,5 nM'lık dozunun kombinasyon olarak meydana getirdiği kaspaz-3 aktivitesinden daha yüksek orandadır. Uygulanan kombinasyonların kontrol grubuna göre OVCAR-3 hücreleri üzerinde meydana getirdikleri kaspaz-3 aktivasyonlarındaki artış oranı ;

ATRA'nın 50 µM'lık dozunun Karboplatinin 100 µM'lık dozu ile birlikte uygulanması sonucu % 14,

ATRA'nın 50 µM'lık dozunun Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu ile birlikte uygulanması sonucu % 78,

Karboplatinin 100 µM'lık dozunun Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu ile birlikte uygulanması sonucu % 106,

ATRA'nın 150 µM'lık dozunun Karboplatinin 100 µM'lık dozu ile birlikte uygulanması sonucu % 46,

ATRA'nın 150 µM'lık dozunun Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu ile birlikte uygulanması sonucu % 151,

ATRA'nın 50 µM'lık dozu, Karboplatinin 100 µM'lık dozu ve Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu ile birlikte uygulanması sonucu % 113,

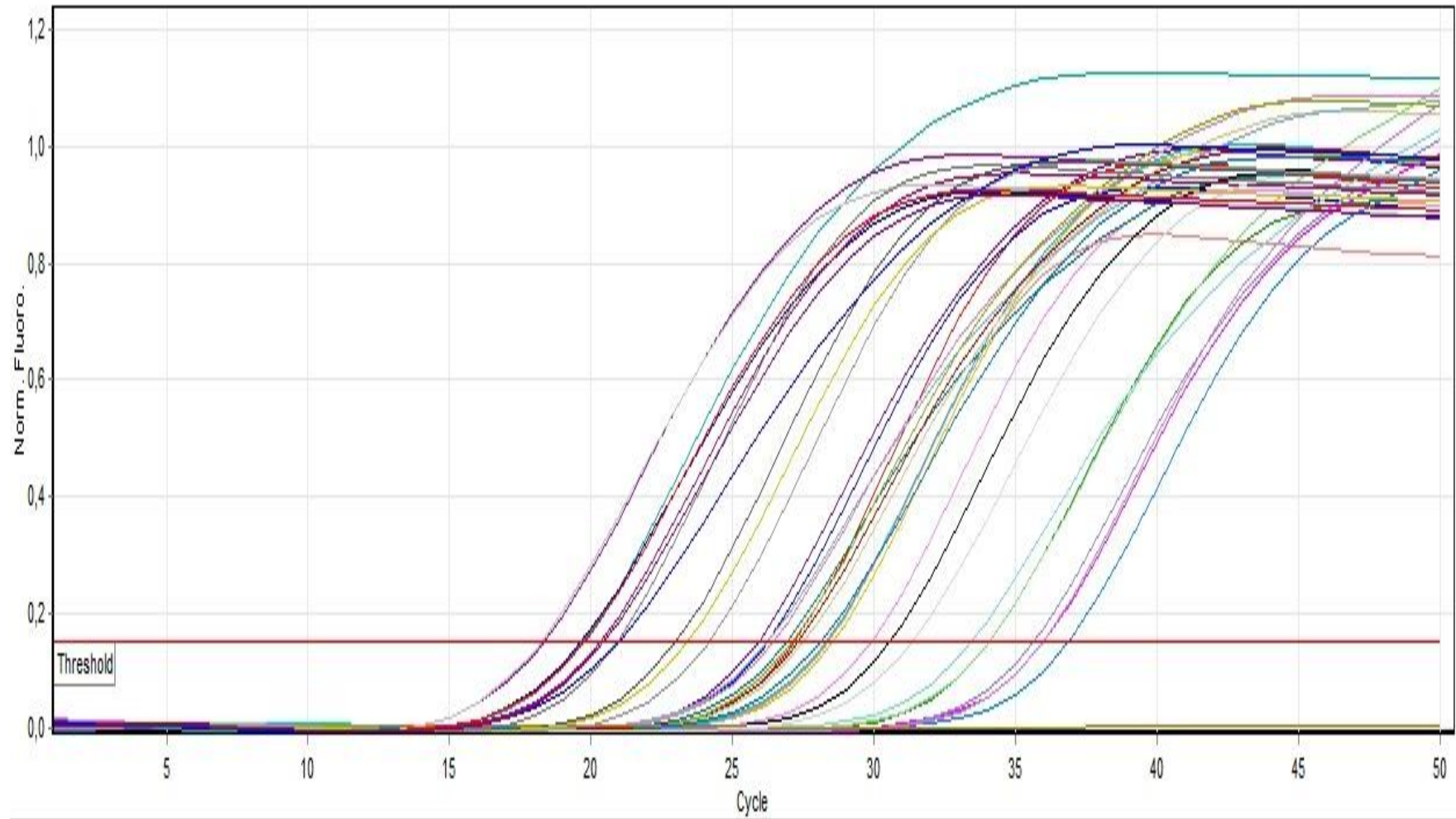
ATRA'nın 150 µM'lık dozu, Karboplatinin 100 µM'lık dozu ve Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu ile birlikte uygulanması sonucu % 107'dir (Şekil 3.3.2).

ATRA'nın uyguladığımız en yüksek dozu olan 250 µM'lık dozu ile 24 saat muamele edilen OVCAR-3 hücrelerinde meydana gelen kaspaz-3 aktivitesi, 12 saat muameleye oranla daha yüksektir. ATRA, Karboplatin ve Paklitakselin diğer tüm tekli uygulamalarında ve kombinasyonlarında saptanan kaspaz-3 aktivitelerinin 12 saatlik uygulamalarda daha yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 3.3.1 ve Şekil 3.3.2).

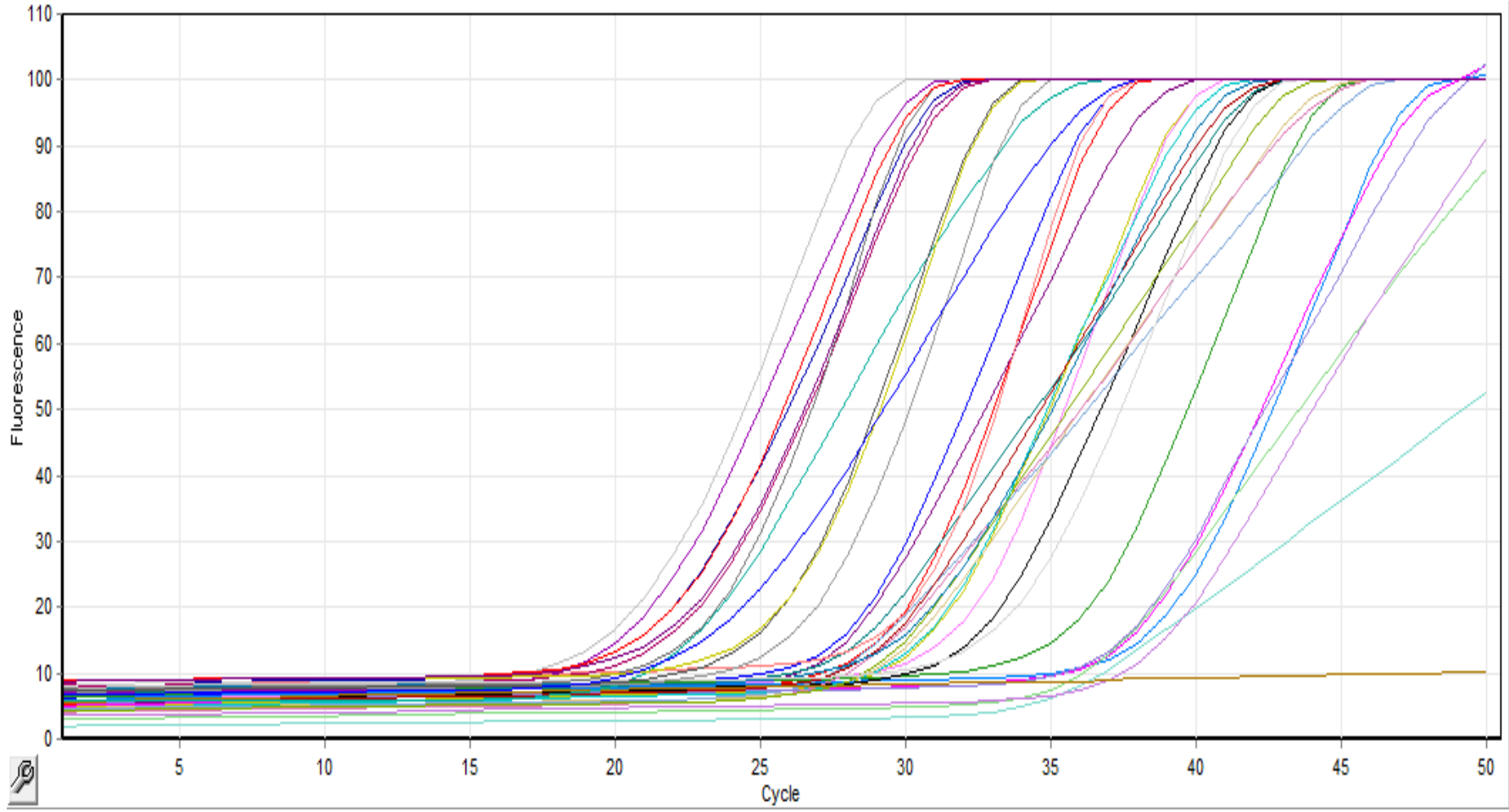
#### **3.4. RT-PCR Bulguları**

OVCAR-3 hücreleri 24 saat boyunca ATRA, Paklitaksel ve Karboplatinin farklı dozları ve kombinasyonları ile muamele edilmiştir. Sentezlenen cDNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak Ki-67, COX-2, VEGF, IRS-1 ve 18s rRNA gen primerleri ile RT-PCR yapılmıştır. Elde edilen gen ürünleri Rotor-Gene Q Series Software Version 2.0.2 kullanılarak görüntülenmiştir.

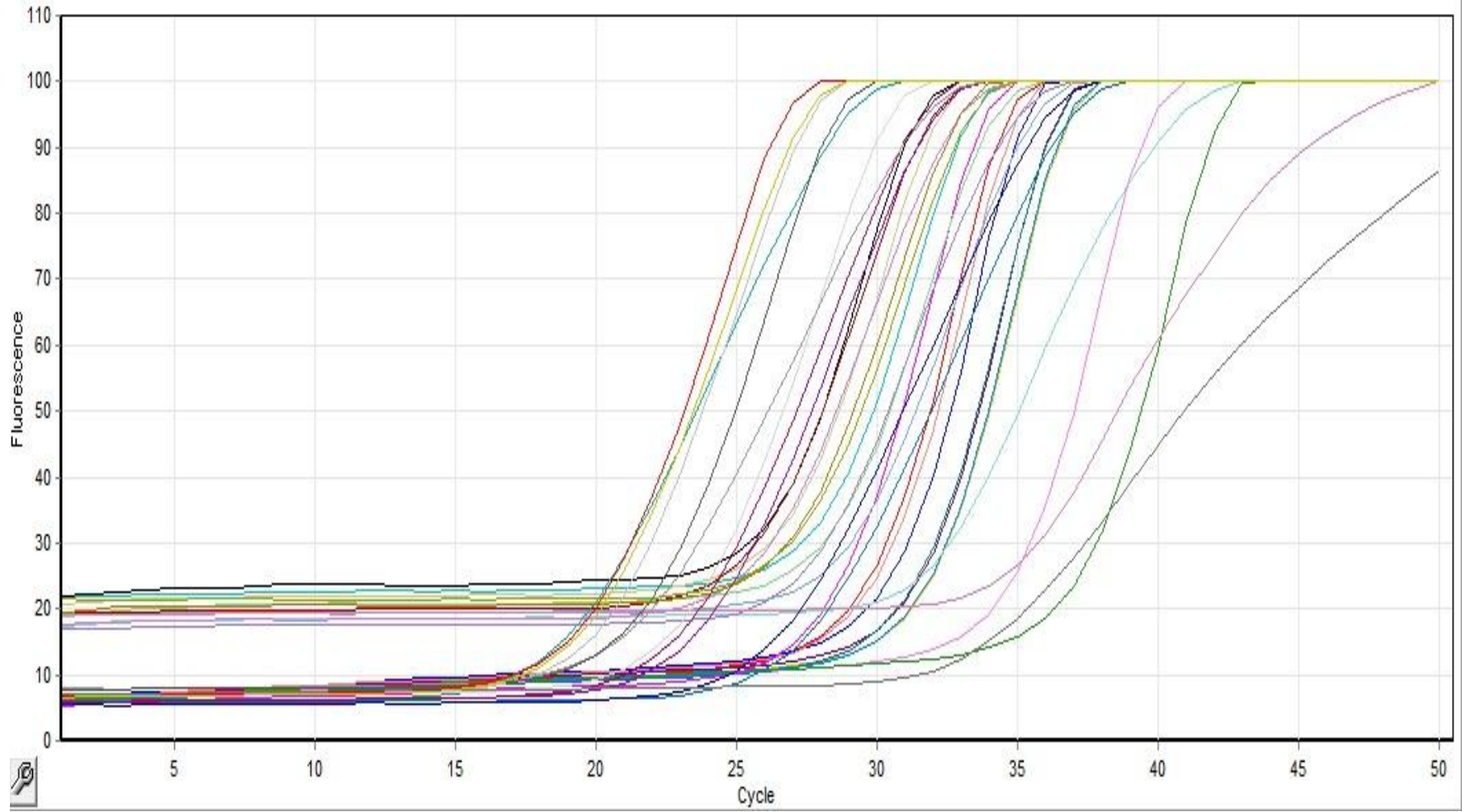




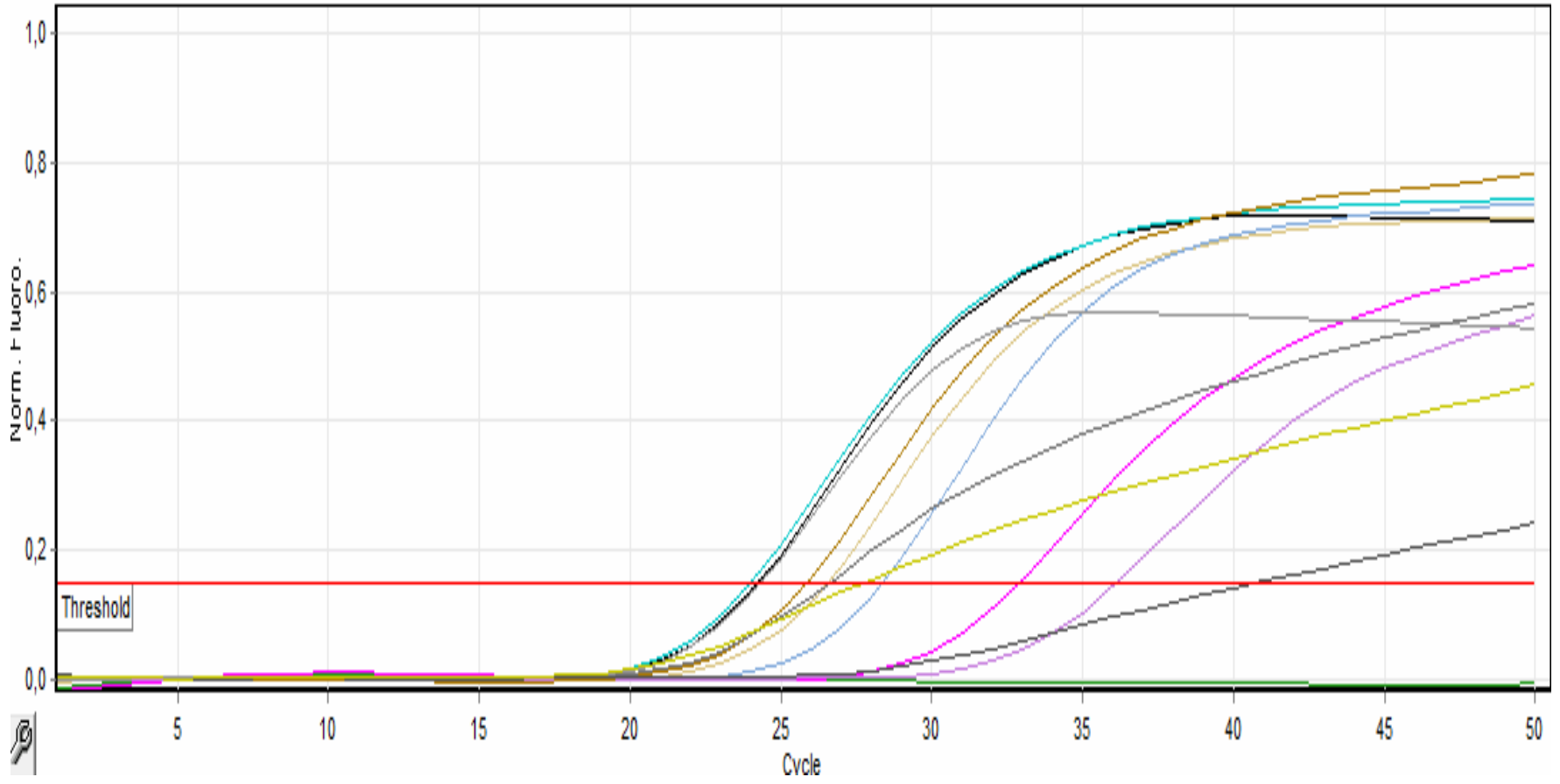
Şekil.3.4.1. Test maddelerinin uygulandığı örneklerde 18S rRNA genine ait amplifikasyon eğrileri



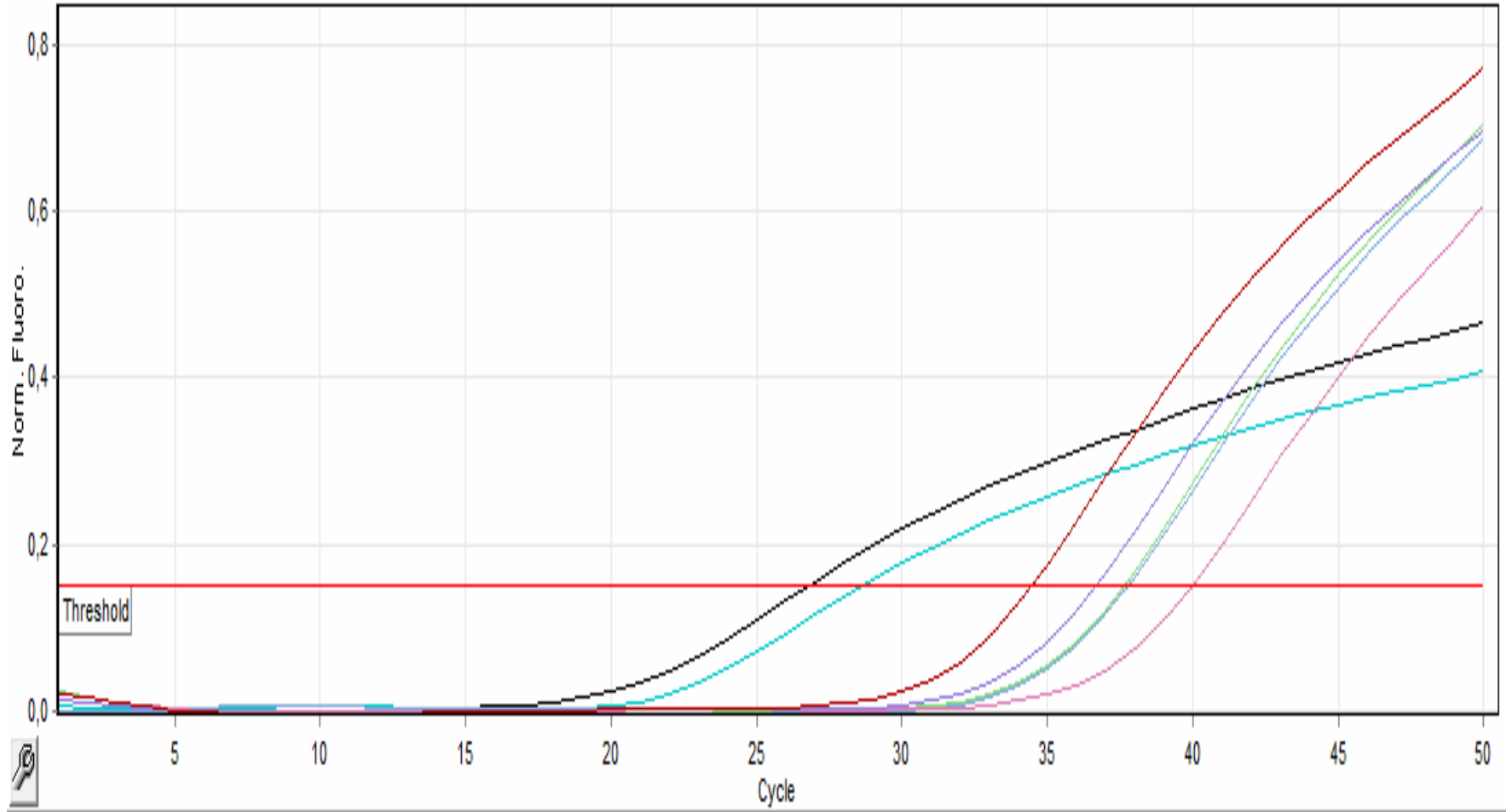
Şekil 3.4.2. Test maddelerinin uygulandığı örneklerde IRS-1 genine ait amplifikasyon eğrileri



Şekil 3.4.3. Test maddelerinin uygulandığı örneklerde VEGF genine ait amplifikasyon eğrileri



Şekil 3.4.4. Test maddelerinin uygulandığı örneklerde Ki-67 genine ait amplifikasyon eğrileri



Şekil 3.4.5. Test maddelerinin uygulandığı örneklerde COX-2 genine ait amplifikasyon eğrileri

Muamele edilen ATRA'nın 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozu, aktivasyon durumlarına bakılan genlerin seviyelerinden Ki-67 gen anlatım seviyesinde kontrol grubuna göre % 36 azalmaya neden olmuştur (Tablo 3.4.1).

ATRA'nın 90  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulaması aktivasyonu incelenen genlerden IRS-1 gen ifadesinde, kontrol grubuna göre % 73 oranında azalma göstermiştir, Ki-67 ifadesinde % 57 ve COX-2 geninin anlatım seviyesinde de azalmaya neden olmuştur (Tablo 3.4.1).

ATRA'nın 150  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulaması, IRS-1 gen ifadesini % 85 oranında ve COX-2 gen ifadesinde de kontrol grubuna oranla azaltmıştır (Tablo 3.4.1).

Muamele edilen ATRA'nın 180  $\mu\text{M}$ 'lık dozu, aktivasyon durumlarına bakılan gen seviyelerinden COX-2'nin ifadesinde azalma meydana getirmiştir, Ki-67 gen ifadesini % 87, VEGF gen ifadesini ise % 97 oranında azaltmıştır (Tablo 3.4.1).

ATRA'nın 250  $\mu\text{M}$ 'lık dozu; IRS-1 gen ifadesini % 90, Ki-67 gen ifadesini % 47, VEGF gen ifadesini % 92 oranında azaltmıştır. Kontrol grubuna göre COX-2 gen ifadesinde de azalmaya neden olmuştur (Tablo 3.4.1).

OVCAR-3 hücreleri ile muamele edilen Karboplatinin 50  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulaması, anlatım seviyesine bakılan genlerden COX-2 gen ifadesinde azalmaya neden olurken, VEGF gen ifadesinde de yüksek oranda azalmaya neden olduğu saptanmıştır (Tablo 3.4.1).

Karboplatinin 100  $\mu\text{M}$ 'lık ve 150  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamaları, COX-2 gen ifadesi üzerinde azalmaya neden olmuştur (Tablo 3.4.1).

Paklitaxelin 1,25nM'lık doz uygulaması OVCAR-3 hücrelerinde IRS-1 gen ifadesinde % 90 oranında inhibasyona neden olurken, Ki-67 gen ifadesinde %60 oranında azalmaya neden olmuştur. COX-2 gen ifadesinde de azalma meydana getirmiştir (Tablo 3.4.1).

Paklitaxelin 2,5 nM'lık doz uygulaması sonucunda; IRS-1 gen ifadesinde % 76, Ki-67 gen ifadesinde % 52 azalma saptanmıştır. COX-2 gen ifadesinde de azalma meydana getirmiştir (Tablo 3.4.1).

Paklitakselin 5 nM'lık dozu ile 24 saat muamele edilen hücrelerde, VEGF geninin ifadesinde % 77 oranında azalma saptanmıştır. COX-2 gen ifadesinde de azalma meydana getirmiştir (Tablo 3.4.1).

ATRA'nın 150 µM'lık dozu, Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu ve Karboplatinin 100 µM'lık dozları ile kombinasyon muamelesi sonucu, hücrelerin COX-2 gen aktivasyonunu neredeyse inhibe etmiştir. ATRA'nın 50 µM'lık dozu, Paklitakselin 2,5 nM'lık dozu ve Karboplatinin 100 µM'lık dozlarının kombinasyon olarak uygulanması sonucu; IRS-1 gen ifadesinde % 56, COX-2 geninin ifadesinde % 57, VEGF gen ifadesinde % 73 azalma meydana geldiği saptanmıştır (Tablo 3.4.1).

ATRA'nın 50 µM'lık dozu ile Karboplatinin 100 µM 'lık dozunun kombinasyonu sonucu; VEGF gen ifadesinde % 8 oranında, IRS-1 gen ifadesinde ise % 39 oranında azalma görülmüştür (Tablo 3.4.1).

ATRA'nın 150 µM'lık dozu ile Karboplatinin 100 µM'lık dozunun; Paklitaksel 2,5 nM ile Karboplatin 100 µM 'lık dozunun ve ATRA 50 µM'lık dozu ile Paklitakselin 2,5 nM'lık dozlarının kombine muamelesi sonucu COX-2 gen ifadesinde kontrol gruplarına göre azalma meydana geldiği belirlenmiştir (Tablo 3.4.1).

**Tablo 3.1.** ATRA, karboplatin ve paklitakselin tek başlarına ve kombine olarak uygulamalarının Ki-67, VEGF, COX-2, IRS-1 ve 18S rRNA gen ifadelerinde meydana getirdiği değişiklikler

No	Örnek ismi	IRS-1/18srRNA	Ki-67/18srRNA	COX-2/18srRNA	VEGF/18srRNA
1.	Kontrol	0,001616	0,001624	6,2063E-07	0,004757
2.	Çözücü kontrol (DMSO)	0,025629	0,37593	7,5388E-05	0,114314
3.	ATRA 50 µM	9,53E-05	0,001039	7,7704E-05	7,44E-05
4.	ATRA 90 µM	0,000439	0,001033	1,0423E-06	9,98E-05
5.	ATRA 150 µM	0,000236	0,004851	2,4767E-05	1,83E-05
6.	ATRA 180 µM	0,001959	0,002032	5,4853E-06	0,000155
7.	ATRA 250 µM	0,000164	0,000868	1,9575E-05	0,000364
8.	Karboplatin 50 µM	0,003429	0,008836	3,6474E-05	0,00104
9.	Karboplatin 100 µM	1,54E-08	4,98E-06	1,7337E-07	9,86E-07
10.	Karboplatin 150 µM	0,001875	9,4E-06	0,0012664	9,26E-06
11.	Paklitaksel 1,25 nM	0,000156	0,000656	1,6682E-06	1,56E-07
12.	Paklitaksel 2,5nM	0,000382	0,000774	2,5938E-06	7,48E-06
13.	Paklitaksel 5 nM	0,002912	0,007906	0,0111973	0,001112
14.	ATRA150µM&Paklitaksel 2,5nM	0,049286	0,504493	7,4961E-05	0,25796
15.	ATRA150µM&Paklitaksel 2,5nM & Karboplatin 100 µM	0,005442	0,015627	0,0001193	0,017507
16.	ATRA50µM& Paklitaksel 2,5nM & Karboplatin 100 µM	0,000704	1	3,9551E-06	0,001307
17.	Paklitaksel2,5nM&Karboplatin100 µM	0,004043	0,023154	3,638E-06	0,010723
18.	ATRA 50µM & Karboplatin100 µM	0,000981	0,003289	7,7325E-06	0,004372
19.	ATRA150µM& Karboplatin 100 µM	0,002616	0,015541	5,1174E-06	0,017064
20.	ATRA50µM& Paklitaksel 2,5nM	0,063645	0,060045	0,0114587	0,064075



#### 4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Hücre kültürleri, yeni ilaç adaylarının etkilerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Yeni ilaç adaylarının bilinen ya da etki etmesi düşünülen moleküler hedefler üzerinde neden oldukları etkiler böylece belirlenebilmektedir. Geliştirilmiş kanser ilaç bileşenlerinin hücre fenotipinde meydana getirdiği değişiklikler nedeni ile yenilenen tümör büyümesi, klinik uygulamalarda beklenmeyen sonuçların alınmasına neden olmaktadır. Klinikte görülen bu sonuçların nedenlerinin tahmin edilebilmesi için insan tek tabakalı kanser hücre hatlarının kullanımı oldukça yaygındır ve önemli bir belirleyicidir. Çalışmalar farklı hücre hatları üzerinde yapılmaktadır. Bu durum primer tümörlerde meydana gelen genomik değişimler hakkında geniş veritabanı oluşumunu sağlamaktadır. Böylece hedeflenen inhibitöre yönelik tepkilerin belirlenmesi klinik bulguların açıklanabilmesine de olanak sağlamaktadır (Gullbo ve ark 2011).

Batı ülkelerinde ovaryum kanseri, jinekolojik kanserler arasında 2. yüksek ölüm oranına sahiptir (Schlosshauer ve ark 2009). Cerrahi müdahale ve kemoterapi sonrasında hastalığın tüm evrelerinde % 45 sağkalım, ilerlemiş evrelerinde ise % 30 sağkalım görülmektedir. Erken evrelerinde ovaryum kanseri, cerrahi müdahaleleri takip eden platin ve taksan içeren kemoterapiye karşı duyarlıdır. Fakat ileri derecede ovaryum kanseri görülen kadınlarda, hastalık tekrar etmekte ve ilave bir tedaviyi gerektirmektedir (Modesit ve Parsons 2010). İkinci etapda tedavi platin içerikli bileşikler ile gemcitabine, topotecan, etoposide, 5-flourouracil ve kombinasyonlarıyla devam etmektedir (Schlosshauer ve ark. 2009).

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

Kemoterapötik ajan olarak kullanılabilen ATRA'nın;

- AP-1 (aktivasyon protein-1) aktivitesini represe edilerek,
- TGF- $\beta$  gibi supresör büyüme faktörlerini indükleyerek,
- G<sub>1</sub> fazına spesifik olan gen ekspresyon düzenlemelerini yaparak, etki ettiği

bilinmektedir (Sherman ve ark. 2011).

Retinoik asitler epitelyal dokularda gelişim ve onarımdan sorumludur. Bazı kanser hücrelerinde de çoğalmayı ve hücre gelişimini engellemektedir. Retinoik asitler akciğer, lösemi, cilt, göğüs, prostat, ovaryum kanseri gibi birçok kanser türünde hem tedavi hemde koruma amaçlı kullanılmaktadır. Fakat halen retinoik asitlerin kanser hücre büyümesini nasıl inhibe edebildiği anlaşılamamıştır (Um ve ark. 2001).

Retinoik asitler anti tümör etkilerini tümör hücrelerinin farklılaşmasını indükleyerek göstermektedirler. Farklılaşmayı nükleusdaki retinoik asit reseptörleri ve retinoid X reseptörleri aracılığı ile ya da sitoplazma da bulunan hücrel retinoik asit bağlayıcı proteinler üzerindeki gen ekspresyonlarına etki ederek gerçekleştirmektedirler. Böylece metabolizmaları ve hücreye alınimleri değişmektedir. Retinoidlerin etkilediği birçok reseptör ve gen ekspresyon yolları, retinoidlerin birçok hücrel süreçte etkin olarak rol aldığına göstergesidir. “Carter ve Bellido (1999)” RL92-2 (Endometriyum kanser hücre hattı) ile yaptıkları çalışmada retinoik asitlerin tirozin fosfatlayıcı proteinleri inhibe ettiğini rapor ettiği bulgularına dayanarak sinyal iletiminden sorumlu tirozin kinazların anti-kanser ilaç gelişiminde hedef olarak alınabileceği rapor etmişlerdir.

“Carpentier ve ark. (1998)” yapmış oldukları bir çalışmada, HL60 hücre hattında normal şartlar altında ATRA'nın farklılaşmayı indüklediğini fakat apoptoza neden olmadığını rapor etmişlerdir. Benzer şekilde 9-cis retinoik asit de HL60 hücrelerinde bazı spesifik kültür şartları altında apoptozu indüklemektedir. Mekanizması tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte ATRA'nın etoposide, camptothecin ve actinomycin~D gibi antikanser ilaçlarında apoptoz indükleme etkisini inhibe ettiği düşünülmektedir. Ancak ATRA'nın hücrede apoptoz inhibitörü olan bcl-2 konsantrasyonunu azalttığı rapor edilmiştir. Kültür ortamında görülen apoptoz aynı zamanda biriken kültür bileşenleri nedeniyle olabilmektedir. Kültür koşullarında görülen parametrelerdeki değişimin oldukça geniş olması nedeni ile yapılan çalışmalar tekrarlanabilir olmayabilmektedir. Bu durumda her yeni çalışmada farklı bir sonuç elde edilebilmesi mümkündür. Normal kültür şartlarında azalan FCS miktarının, hücrelerde apoptozu indüklediği bilinmektedir. ATRA ile muamele edilen hücrelerden düşük FCS oranına sahip

hücre hatlarında apoptozun arttığı rapor edilmiştir. Elde edilen bu sonuç “Carpentier ve ark. (1998)” tarafından ATRA’nın plazma proteinlerine bağlanma özelliği ile açıklanabilmektedir. Düşük FCS’li ortamda serbest kalan ATRA, apoptozu daha yüksek oranda indükleyebilmektedir. FCS konsantrasyonunun yüksek olduğu kültür koşullarında, serbest kalan ATRA miktarı düşeceğinden indüklenebilen apoptoz oranında azalmaktadır.

ATRA, göğüs kanseri, akciğer kanseri gibi birçok kanserli hücre hattında apoptozisi indüklemektedir. “Ye ve ark. (2004)”, MCF-7 (göğüs kanserli hücre hattı) ve MGC80-3 (mide kanser hücre hattı) hücre hatlarında ATRA’nın hücrelerin büyümesini inhibe ettiğini MTT yöntemi ile saptamışlardır. ATRA ile muamele edilen hücrelerde apoptoz belirtileri olan, nükleus kondensasyonunun ve kromatin fragmentasyonunun DAPI boyama ile açık olarak görüldüğünü bildirmişlerdir.

ATRA ovaryum kanser hücre büyümesini, hücre siklusunu G0/G1 fazında tutuklayarak durdurmaktadır. RAR ve RXR- $\alpha$  reseptörlerinin nükleusda fazla eksprese edilmesi ovaryum hücre hattında ATRA’ya karşı direncin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Fields ve ark., 2007).

Kemoterapötikler vücudu istila eden çeşitli parazit ya da mikroorganizmalara karşı kullanılan ajanlardır. Organizmanın kendi hücrelerinden oluşan tümör hücreleri, normal dokulardaki hücrelerden farklı morfolojik ve biyokimyasal özellikler taşıdıklarından kanser tedavisinde de kemoterapötiklerden yararlanılmaktadır. Kanser tedavilerinde kemoterapinin temel ilkesi normal doku hücrelerinden hızlı çoğalma göstermesi gibi seçici bir özellik baz alınarak uygun ajanın seçimidir. Organizmanın sağlıklı dokularına hasar vermeden, belirlenen tümörlü doku hücreleri üzerinde gerektiği kadar toksik etki oluşturabilmektir. Kanser tedavilerinde kullanılan birçok ilaç, reseptör ya da mitokondri aracılı yollara etki ederek apoptoz mekanizması üzerinden hedef kanser hücrelerini öldürmektedir. Mitokondriyal membran potansiyelinde meydana gelen değişim sonucu sitokrom-c, mitokondriden salınmakta ve kaspazlar aktive edilmektedir. Kemoterapide kullanılan ajanlardan olan sisplatin, etoposid, doksorubisin gibi ajanlar Fas aktivasyonuna neden olarak birçok tümör hücre hattında apoptoza neden olmaktadır (Dülger 2011; Vermeulen ve ark. 2005).

Ovaryum kanserli hücrelerde anjiyogenez, hücre canlılığı, hücre büyümesi ve metastaz gibi biyolojik olayların mekanizmalarının anlaşılması üzerine yeni nesil tedavilerde bu süreçler hedef alınarak farklı ajanların uygulanmaya başlanması söz konusudur. Ovaryum kanserinde cerrahi müdahalenin ardından, hastalığın tekrar ilerlemesini engellemek için uygulanan yöntem kemoterapi ile devam etmektedir. Yıllardır karboplatin ve paklitaksel kombinasyon olarak ovaryum kanserinde, kemoterapi tedavisinde kullanılmaktadır. Hastalığın bu kombinasyona optimum yanıtlar verdiği yapılan çalışmalarca desteklenmektedir (Pliarchopoulou ve Pectasides, 2011; DiSaia ve Bloss 2003).

MTT testinin en büyük avantajı basit ve hızlı bir yöntem olmasıdır. İlaçların birden fazla konsantrasyonları aynı anda çalışılabilmektedir. Hücre proliferasyonu ya da ölümüne neden olan birçok etmen belirlenebilmektedir. Elde edilen veriler birçok farklı yöntemin de uygulanabilirliğine ışık tutmaktadır (Campling ve ark, 1991).

Çalışmamızda OVCAR-3 hücre hattına ATRA'nın farklı dozları tek başına ve klasik kemoterapötikler ile kombine uygulanarak araştırılmıştır. Hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesinde MTT testi kullanılmıştır. ATRA, OVCAR-3 hücre hattı üzerinde doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etki göstermiştir. ATRA'nın MTT testi sonuçları doğrultusunda seçilen dozları, apoptotik etkinin saptanabilmesi için OVCAR-3 hücreleri ile 12 saat muamele edilmiştir. Muamele sonrası apoptoz belirteçleri olan apoptotik badi oluşumları DAPI boyama yapılarak gözlemlenmiş ve fotoğraflanmıştır.

Karboplatinin ve Paklitakselin tez çalışmasında uygulanan dozları yapılan literatür çalışması sonucunda seçilmiştir “Smith ve ark. (2005)” OVCAR-3 hücre hattına 24 saat boyunca muamele ettikleri karboplatin için  $IC_{50}$  değerini 22.2  $\mu$ M, Paklitaksel için 1.4 nM olarak belirlediklerini rapor etmişlerdir. Tez çalışmamızda 24 saat muamele sonunda Karboplatin ve Paklitaksel için  $IC_{50}$  değerleri sırası ile 100  $\mu$ M ve 2.5 nM olarak belirlenmiştir.  $IC_{50}$  değerleri arasındaki bu farklılığın uygulanan hücre sayısının ve maddesiz inkübasyon zamanının farklı olmasına bağlıyoruz. “Smith ve ark. (2005)” nın, 96'lı plakaya ettikleri hücre sayısı 3500 (hücre/kuyucuk), bizimki ise 5000

(hücre/kuyucuk)'dir. Aynı zamanda ‘‘Smith ve ark. (2005)’’ yaptıkları çalışmada hücreleri maddesiz 24 saat inkübasyona bırakmışlardır, bizim çalışmamızda ise hücreler maddesiz olarak 48 saat inkübasyona bırakılmışdır.

Apoptoz, gelişmiş organizmalarda hasar görmüş, infekte edilmiş, hücrelerin organizmadan uzaklaştırılması için gerçekleştirilen kontrollü hücre ölümüne verilen isimdir. Hücre tarafından genetik olarak kontrol edilen bu mekanizma, organizmanın gelişmesinde, dokularda dengenin sağlanmasında ve immün sistemin etkisini göstermesinde işlevsel olan temel süreçtir. Bu nedenden dolayı mekanizmada meydana gelen bir aksaklık, patolojik birçok durumun ortaya çıkmasına, otoimmünite de dejeneratif birçok düzensizliğin belirmesine ve kanser gelişimine neden olmaktadır (Adams 2003).

Mitokondriyal membranda meydana gelen permeabilite (MMP) değişimleri hücre ölümü üzerinde çok önemli rol oynamaktadır. MMP internal yol ile başlayan apoptozun ya da apoptotik olmayan diğer hücre ölümleri için yolların geri dönüşsüz olarak başlatılmasından sorumludur. Stres koşulları altında hücrede oluşan letal ve yaşamsal sinyaller mitokondri membranlarında belirli düzeylerde alınmaktadır. Eğer letal sinyaller baskınsa membran geçirgenliğinde gerekli düzenlenmeler yapılarak katastrofik tepkimelerin başlatılması sağlanmaktadır. Böylece hücrenin ölümü ile sonlanacak olaylar dizisi başlatılmış olmaktadır (Galluzzi ve ark. 2009).

Kaspaz-3 apoptozda sıklıkla aktive edilen ölüm proteazıdır. Hücre yaşamı için hayatsal önem taşıyan birçok proteinin kırılmasında görev almaktadır. Hücrede kaspaz-3'ün aktive edilmesi sitokrom c salınımı ile bağlantılı ya da bağlantısız olarak gerçekleşebildiği gibi kaspaz-9 aktivasyonu ile de olabilmektedir. Beyinde gelişim ve doku dengesinin sağlanmasında gerçekleştirilen programlı hücre ölümlerinde kaspaz-3 aktivasyonu sıklıkla gerçekleşmektedir. Birçok dokuda ve de hücre hatlarında da kaspaz-3 aktivasyonu hücre ölümünden sorumlu tutulmaktadır. Kaspaz-3 apoptozun önemli belirteçlerindedir ve aktive olduğu belirlenen tüm hücrelerde apoptotik kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonuna neden olmaktadır. Bu nedenle kaspaz-3 hücre bütünlüğünün bozulmasında esas olan proteazdır (Porter ve Jänicke 1999).

“Ekber ve ark. (2006)” U-937 (lösemili hücre hattı-monoblast) hücreleri ATRA'nın 100µM'lık dozu ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonucu yüksek kaspaz-3 aktivitesi gösterdiğini rapor etmişlerdir.

OVCAR-3 hücreleri ile 12 saat ve 24 saat boyunca muamele edilen ATRA'nın çalışmamızda kullandığımız her doz uygulamasında, kontrole göre anlamlı kaspaz-3 aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. Kullandığımız ATRA'nın en yüksek dozu olan 250 µM'lık derişimi 24 saat muamele sonunda çok yüksek kaspaz-3 aktivasyonu göstermiştir.

Ovaryum kanserinde hücre büyümesini inhibe etmek için denenmiş kemoterapötik yelpazesi çok geniştir. En yaygın olarak kullanılan alkilleyici ve platin türevleri olan paklitaksel ve sisplatin kullanımındır (Fields ve ark. 2007). Cisplatin ve analogları (CDDP) ileri ovaryum kanser tedavilerinde kullanılan standart kemoterapötiklerdir. Bugün etki mekanizması en iyi bilinen ajanlardır (Zhong ve ark 2007). Maalesef ilaca karşı edilen direnç, hastalarda tedavinin etkisiz kalmasına neden olmaktadır ( Fields ve ark. 2007).

Karboplatin tek başına ovaryum kanser tedavilerinde kullanılan bir ajandır. Alkilleyici bir ajan olan karboplatin DNA sarmallarına bağlanmaktadır. DNA replikasyonuna engel olarak apoptozise neden olmaktadır (Schlosshauer ve ark. 2009).

Ovaryum kanseri erken teşhiste cerrahi müdahelenin ardından paklitaksel kemoterapisine karşı duyarlıdır. Fakat ilerlemiş ovaryum kanserlerinde, hastalığın tekrarı görülmektedir. Bu durumda yeni bir tedavi şeklinin uygulanması gerekmektedir (Modesit ve Parsons 2010).

Çalışmamızda kanser tedavilerinde sıklıkla kullanılmakta olan ve klasik kemoterapötikler olarak bilinen Karboplatin ve Paklitaksel doza ve zamana bağlı olarak OVCAR-3 hücre hattına uygulanmıştır. Zamana bağlı olarak ajanların hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. Her iki ajanın MTT testi sonucuna bakılarak seçilen dozlarının meydana getirdiği apoptotik etkilerin morfolojik olarak saptanması amacıyla DAPI boyama yapılmıştır. Boyama sonucu apoptotik badi oluşumları gözlemlenmiş ve fotoğraflanmıştır. Dozların zamana bağlı olarak oluşturdukları kaspaz-3 aktiviteleri Caspase 3 Elisa

kolorimetrik kitler kullanılarak saptanmış ve kontrol grubuna göre anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

Kanser kemoterapisinde amaç etkili bir tedavi ile hastalığın tamamen ortadan kaldırılabilmesidir. Kemoterapik uygulamaları geliştirmek için önerilerden birisi de toksik ajanların kombine kullanılmasıdır (Villasana ve ark. 2010).

Literatürde OVCAR-3 hücreleri ile yapılan çalışmalarda, hücre hattının platin türevli ajanlara ve Paklitaksele karşı gösterdiği dirençden sıklıkla bahsedilmektedir. İlaçların hücre hattına olan etkilerini arttırmak için farklı ajanlar yada inhibitörlerle kombinasyon uygulamaları yapılmaktadır. “Schlosshauer ve ark. (2009)” TOV-112D, A2780, ES2, OV90, SKOV3 ve OVCAR-3 hücreleri üzerinde Karboplatin ve Rapamycin tek başlarına ve kombinasyon olarak uygulamışlar ve OV90, SKOV3 ve OVCAR-3 hücre hatlarının karboplatine karşı dirençli olduğu saptamışlardır. Fakat Rapamycin ve Karboplatinin kombine olarak uygulandıkları çalışmada, tek başına uygulanan ajanlara oranla büyük ölçüde büyümenin büyük ölçüde inhibe edildiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca A2780 ve PA-I hücrelerinde kombinasyon uygulamanın apoptotik hücre sayısını arttırdığını rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda ATRA, karboplatin ve paklitaksel sitotoksik etkilerin belirlenmesi, apoptotik etkilerin morfolojik olarak saptanabilmesi, muamele sonucu oluşan kaspaz-3 aktivitesinin saptanabilmesi için ayrı ayrı ve kombinasyon olarak OVCAR-3 hücre hattı ile zamana ve doza bağlı olarak muamele edilmiştir. Kombinasyon olarak uygulanan ajanlar hücre canlılığını inhibe etmiştir. Ajanların muamele sonucu OVCAR-3 hücre hattında kaspaz-3 aktivitesini arttırdığı saptanmıştır. Apoptotik belirteçler olan kromozom yoğunlaşması, apoptotik badi oluşumu DAPI boyama ile saptanmıştır.

Tedaviye gösterilen direnç, ovaryum kanserinin metastazına neden olarak ölümle sonuçlanmaktadır. Ovaryum kanserinin oluşum mekanizmasına ait birçok nokta artık aydınlatılmış iken, metaztaıyla ilgili mekanizalar henüz tam anlaşılammaktadır. Genler üzerinde yapılan çalışmalar sonucu ovaryum kanserlerinde, hücre migrasyonu ve invazyonuna eşlik eden moleküler yolaklara ulaşılabilceği beklenmektedir (Dai ve ark., 2009).

VEGF tümör indüklü anjiogenezde en önemli faktörlerden birisidir. Endotelyal hücre canlılığını ve proliferasyonunu sağlamaktadır, vasküler permeabiliteyi arttırmaktadır. Artmış VEGF ekspresyonu birçok ovaryum kanser hücre hattında ve farklı aşamalarda kanser biyopsilerinde görülmektedir (Dai ve ark., 2009).

VEGF ovaryum kanserinde de olmak üzere birçok kanser türünde fazlaca eksprese edilmektedir. Anjiogenezis, ovaryum tümör büyümesi ve metastazında temel olarak rol almaktadır. İleri aşamalarda ovaryum kanser vakalarında yüksek VEGF ekspresyonu ve yoğun kılcıl damar oluşumu gözlenmektedir.

“ Zhang ve ark. (2007)” CDDP (sisplatin ve analogları) ile muamele edilen A2780 ve OVCAR-3 hücre hatlarında, VEGF ekspresyonunun azaldığını rapor etmişlerdir.

Artmış COX-2 ifadesinin insanda bütün ovaryum kanser dokularında görülmeyebilir. Özellikle ilerlemiş vakalarda ve tedaviye cevap vermeyen ovaryum tümör dokularında COX-2 sentezi artmaktadır. Literatürde platin bileşiklerinin COX-2 inhibisyonuna etki mekanizmaları hakkında tutarlı bir veri bulunmamaktadır. COX-2 ifadesi bazı tümör çeşitlerinde sitotoksik ajanla muamelenin ardından artabilmektedir. “Bijman ve ark. (2008)” yaptığı çalışmada, WiDR (insan kolon kanserli hücre hattı) hücrelerinde sisplatin ile muamele sonrası COX-2 protein düzeyinde artma gözlemlenirken, Celecoxib ve Docetaxel ile muamelede protein ekspresyon seviyesinde herhangi bir artış gözlenmemiştir. Aynı çalışmada insan ovaryum kanseri hücre hatları (A2780, OVCAR-3, H134 ve IGROV-1) ile de çalışılmış fakat COX-2 protein sentezine rastlanmamıştır.

“Reyes ve ark. (2006)” OVCAR-3 hücrelerini 72 saat boyunca 70 µM ve 100 µM Celecoxib ile muamele etmişlerdir. Yüksek dozlardaki Celecoxib ile muamele hücre canlılığı üzerine inhibitör etki gösterirken, hücre proliferasyon markerı sayılan Ki-67 seviyesinde azalma olduğu belirtilmiştir.

IGF-1R, IGF sinyali ile kanserli hücrelerde mitojenik etkinin arttırılmasından sorumludur. IRS-1 ve IRS-2 IGF'in hücre içerisinde iletiminde rol almaktadır (Banudavi ve ark. 2010).



R1507 bir anti IGFR-1R antibadisidir. IGF-1R fonksiyonunun blok edilmesi için kullanılan antagonistik antibadiler ve küçük molekülü tirozin kinaz reseptörleri, hastalarda çok umut verici bir tedavi yöntemidir. IGF-1R sinyalizasyonu tümör hücrelerinin kemoterapi yada diğer antikanser ajanlara karşı duyarsızlaşmasına neden olmaktadır. Son zamanlarda faz-1 klinik denemelerde olumlu sonuçlar alınan R1507 anti-IGFR-1R antibadisi ile tek başına muamelede ilerlemiş Ewing's sarkomu gösteren 4 hastada olumlu sonuçlar göstermiştir (Rikhof ve ark. 2009).

Paklitaksel, epitelial ovaryum kanser tedavisinde çok sıklıkla kullanılan bir kemoterapötik ajandır. Etkisini mikrotübüllerin depolimerizasyonuna neden olarak göstermektedir. Prostaglandin endoperoksidaz sentaz (PES) enzimi, siklooksijenaz (COX)'a bağlı olarak araziidonik asidin prostoglandinlere parçalanmasından sorumlu olan enzimdir. Yapılan çalışmalara göre taksanlar, apoptotik hücre ölümünü bcl2'ye bağlı olarak indüklemektedir. "Munkarah ve ark (2003)" yaptıkları çalışmada endotelial ovaryum kanserinde COX-2 ifadesinin bcl2 ifadesi ve azalmış apoptoz oranı ile bağlantılı olduğunu ve taksanlarla birlikte kullanılan COX-2 inhibitörünün apoptoz miktarını arttırabileceğini rapor etmişlerdir. Artan COX-2 miktarı, taksanların sitotoksik etkilerini inhibe etmektedir.

Çalışmamızda ATRA ve klasik kemoterapötiklerden olan karboplatin ve paklitaksel OVCAR-3 hücreleri ile farklı dozlarda tek başlarına 24 saat boyunca uygulanmışlardır. Muamele sonrası hedeflenen gen ifade seviyelerindeki değişimler rt-PCR yöntemi ile belirlenmeye çalışılmıştır. ATRA tek başına COX-2 ve IRS-1 gen ifadesinde azalmaya neden olurken, karboplatin COX-2 gen ifade seviyesini azaltmıştır. COX-2'nin ifade seviyesinde etkin olan paklitakselin IRS-1 ve Ki-67 gen anlatım düzeylerinde de azalmaya neden olduğu görülmüştür. ATRA ve kulladığımız klasik kemoterapötikler ikili ve üçlü kombinasyonları halinde de OVCAR-3 hücreleri ile muamele edilmiş ve 24 saat sonundaki gen ifade seviyelerine bakılmıştır. Uygulanan ikili ve üçlü kombinasyonlar Cox-2 geninin ifadesinde azalmaya neden olmuştur. ATRA'nın 50 µM'ı, karboplatinin 100 µM'lık dozu ve paklitakselin 2,5 nM'lık dozunun kombinasyon olarak uygulaması IRS-1 ve VEGF ekspresyon düzeylerinde azalmaya neden olmuştur.

ATRA 50  $\mu$ M ve karboplatin 100  $\mu$ M'lık derişimlerinin uygulandığı ikili kombinasyonda IRS-1 ve VEGF gen anlatım seviyelerinde azalma görölmüştür. Ajanların tek başlarına uygulanması, kombinasyonlarına oranla ekspresyon seviyelerinde daha yüksek oranda azalmaya neden olmuştur.

Yaptığımız çalışmada vitamin A türevlerinden olan ATRA'nın, yüksek dozlarının tek başına OVCAR-3 hücre hattında zamana bağlı olarak etki gösterdiği saptanmıştır. Karboplatin ve Paklitaksel ile kombinasyonunda OVCAR-3 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak büyüme inhibe edilmiş ve apoptoza neden olmuştur. Sonuçlarımız Atranın klasik kematerapötikler ile oluşturulacak çoklu ilaç kombinasyon tedavisi için umut verici olduğunu desteklemektedir. İlaç etkileri ve kombinasyonlarındaki etkileşimleri *in vivo* sistemlerde daha farklı olabileceğinden, sonuçlar hayvan deneylerince desteklenmelidir.

## KAYNAKLAR

- Adams, J.M. (2003), *Ways of dying: multiple pathways to apoptosis*, Genes and Development, **17**, 2481-2495.
- Adamson, P. (1996), *All-Trans-Retinoic Acid Pharmacology and Its Impact on the Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia*, The Oncologist, **1**, 305-314.
- Alexandre, S., Rast, C., Nguyen-Ba, G., Poirier, G.G. ve Vasseur, P. (2000), *PARP degradation in apoptotic Syrian hamster embryo (SHE) cells compared to HL 60 cell line*, Biochimie, **82**, 1115-1122.
- Alique, M., Herrore, H.J. ve Lucia-Cazana, J. (2007), *All- trans retinoic acid induces COX-2 and prostoglandin E<sub>2</sub> synthesis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: involment of retinoic acid receptors and extracellular-regulated kinase1/2*, Journal of Neuroinflammation, **4**, 1-9.
- Altunkaynak, B.Z. ve Özbek, E. ( 2008 ), *Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz nedir*, Tıp Araştırmaları:6, **2**, 93-104.
- Al-Bader, M.D., Al-Sarraf, H.A. (2005), *Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat-validation by semi-quantitative RT-PCR*, Developmental Brain Research, **156**, 38-45.
- Arce, F., O Gätjens-Boniche O., Vargas E, Valverde B ve Diaz C.,(2005), *Apoptotic events induced by naturally occurring retinoids ATRA and 13-cis retinoic acid on human hepatoma cell lines Hep3B and HepG2*, Cancer Letters **229**:271-281.

- Athanassiadou, P., Grapsa, D., Athanassiades, P., Gonidi, M., Athanassiadou, A.M., Tsipis, A., Patsouris E. (2008), *The prognostic significance of COX-2 and survivin expression in ovarian cancer*, Pathology-Research and Practice, **204**, 241-249.
- Banudavi, S., Senthilkumar, K., Sharmila, G., Arunkumar, R., Vijayababu, M.R. ve Arunakaran, J. (2010), *Effect of zinc on regulation of insulin-like growth factor signaling in human androgen-independent prostate cancer cells*, Clinica Chimica Acta, **411**, 172-178.
- Baud, V. ve Karin, M. (2001), *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*, Trends in Cell Biology, **11**.
- Barnes, M.W. (1994), *PCR amplification of up to 35-kb DNA with high yield from  $\lambda$  bacteriophage templates*, Proc. Natl. Sci., **91**, 2216-2220.
- Barnes, A.P., Miller, B.E., Kucera, G.L. (2007), *Cyclooxygenase inhibition and hyperthermia for the potentiation of the cytotoxic response in ovarian cancer cells*, Gynecologic Oncology, **104**, 443-450.
- Bast, C.R., Mills, G.,R ve J.R. (2004), *Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Progression of Epithelial Ovarian Cancer*, The Ovary, **38**, 631-632.
- Bell, D.A. (2005), *Origins and molecular pathology of ovarian cancer*, Modern Pathology, **18**, 19-32.
- Belotti, D., Vergani, V., Drudis, T. (1996), *The microtubule-affecting drug paclitaxel antiangiogenic activity*, Clinical Cancer Research, **2**, 1843-1849.
- Bijman, M.N.A., Hermelink, C.A., Berkel, M.P.A., Laan, A.C., Janmaat, M.L., Peters, G.J. ve Boven, E. (2007), *Interaction between celecoxib and docetaxel or cisplatin in human cell lines of ovarian cancer and colon cancer is independent of COX-2 expression levels*, Biochemical Pharmacology, **75**, 427-437.

- Birben, E. (2006), *Polimeraz Zincir Reaksiyonu*, Astım Alerji İmmünoloji, **4**, 92-94.
- Bizzo, D.M.S., Meira, D.D., Lima, J.M., Mororó, J.S., Rocha, J.C.C. ve Ornellas, M.H.F. (2010), *Peritoneal VEGF burden as a predictor of cytoreductive surgery outcome in women with epithelial ovarian cancer*, International Journal of Gynecology and Obstetrics, **109**, 113-117.
- Blagosklonny, M.V. ve Fojo, T. (1999), *Molecular effects of Paclitaxel; myths and reality*, Int. J. Cancer, **83**, 151-156.
- Blaner, W.S. (2007), *STRA6, a Cell-Surface Receptor for Retinol-Binding Protein: The Plot Thickens*, Cell Metabolism, **5**, 164-166.
- Bonnet, D., Heusèle, C., Simon, C. ve Pantaloni, D. (1984), *4',6-Diamidino-2-phenylindole, a Fluorescent Probe for Tubulin and Microtubules*. The Journal of Biological Chemistry, **260**, **5**, 2819-2825.
- Bono, J., Tolcher, A. ve Rowinsky, E., (2003), *The future of cytotoxic therapy: selective cytotoxicity based on biology is the key*, Breast Cancer Research, **5**, 154-159.
- Buchynska, L.G., Nesina, I.P., Yurchenko, N.P., Bilyk, O.O., Grinkevych, V.N. ve Svintitsky, V.S. (2007), *Expression of p53, p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, p<sup>16INK4A</sup> and Ki-67 proteins in serious ovarian tumors*, Exp. Onco., **129**, **1**, 49-53.
- Bushue, N. ve Wan, Y.J.Y. (2010), *Retinoid pathway and cancer therapeutics*, Advanced Drug Delivery Reviews, **62**, 1285-1298.
- Broxterman, H.J. ve Georgopapadakou, N.H. (2005), *Anticancer therapeutics: "Addictive" targets, multi-targeted drugs, new drug combinations*, Drug Resistance Updates, **8**, 183-197.

- Campling, B.G., Pym, J., Baker, H.M., Cole, S.P. ve Lam, Y.M. (1991), *Chemosensitivity testing of small cell lung cancer using the MTT assay*, Br. J. Cancer, **63**, 75-83.
- Carmicheal, J., Mitchell, J.B., DeGraff, W.G., Gamson, J., Gazdar, A.F., Johnson, B.E., Glarstein, E. ve Minna, J.D. (1985), *Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay*, Br.J.Cancer, **57**, 540-547.
- Carpentier, Y., Mayer, P., Bobichont, H. ve Desoize, B., (1998), *Cofactors in In Vitro Induction of Apoptosis in HL60 Cells by All-trans Retinoic Acid(ATRA)*, Biochemical Pharmacology, **55**, 177-184.
- Carroll, K.K. ve Kritchevsky, D. (1994), *Nutrition and Disease Update Cancer*, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, Bölüm 4, 28-34.
- Carter, A.K. ve Bellido, T. (1999), *Decrease in protein tyrosine phosphorylation is associated with F-actin reorganization by retinoic acid in human endometrial adenocarcinoma (RL95-2) cells*, Journal of Cellular Physiology, **178**, 320-332.
- ChangXin, S., LiHua, H., Lin, X. ve YiRong, L. (2008), *The detection of circulating tumor cells of breast cancer patients by using multimarker (Survivin, hTERT and hMAM) quantitative real-time PCR*, Clinical Biochemistry, **42**, 142-200
- Coleman, A.W. (1979), *Use of the fluorochrome 4'6-diamidino-2-phenylindole in genetic and developmental studies of chloroplast DNA*, J. Cell Biology, 299-305.
- Çetin, Y. ve Bullerman L.B. (2005), *Cytotoxicity of Fusarium mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay*, Food and Chemical Toxicology, **43**, 755-764.
- Dai, L., Gu, L., Ding, C., Qui, L. ve Wen, D. (2009), *TWEAK promotes ovarian cancer cell metastasis via NF- $\kappa$ B pathway activation and VEGF expression*, Cancer Letters., **283**, 159-167.

- Damiano, J.S., Cress, A.E., Hazlehurst, A.L., Shtil, A.A. ve Dalton, W.S. (1999), *Cell Adhesion Mediated Drug Resistance (CAM-DR): Role of Integrins and Resistance to Apoptosis in Human Myeloma Cell Lines*, American Society of Hematology, **93**:1658-1667.
- Darrell, P.C., Christina, A., Wagnon, ve Harvey, B.Jr., *Reverse Transcriptase (RT) Inhibition of PCR at Low Concentrations of Template and Its Implications for Quantitative RT-PCR*, Appl Environ Microbiol., 669-677.
- Degos, L., Dombret, H., Chomienne, C., Daniel, M.T., Miclea, J.M., Chastang, C., Castaigne, S. ve Fenau, P. (1995), *All-trans-Retinoic as a Differentiating Agent in the Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia*, The Journal of The American Society of Hematology, **85**, 10.
- Delva, L., Cornic, M., Balitrand, N., Guidez, F., Miclea, J.M., Delmer, A., Teillet, F., Fenau, P., Castaigne, S. ve Degos, L. (1993), *Resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) therapy in relapsing acute promyelocytic leukemia: study of in vitro ATRA sensitivity and cellular retinoic acid binding protein levels in leukemic cells*, Blood., **82**, 2175-2181.
- Delva, L., Bastie, N.J., Egly-Rochette, C., Kraşba, R., Balitrand, N., Despouy, G., Chambon, P. ve Chomienne (1999), *Physical and Functional Interactions between Cellular Retinoic Acid Binding Protein II and the Retinoic Acid-Dependent Nuclear Complex*, Molecular and Cellular Biology, **19**, 7158-7167.
- Demir, G. (2007), *Akciğer Kanserlerinde Kemoterapi*, İ.Ü. Cerrahpařa Tıp Fakóltesi Sürekli Tıp Eęitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi No:58, 175-178.
- Dempke, W., Rie, C. ve Grothey, A. ( 2001 ), “*Cyclooxygenase-2:a novel target for cancer chemotherapy?*” J. Cancer Res. Clin. Oncol., **127**, 411-417.

- Devrim, K.E. ve Kaya, N. (2004), *POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU*, Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg., 10, **2**, 209-214.
- DiaSaia, P.J. ve Bloss D.J. (2003), *Treatment of ovarian cancer: new strategies*, Gynecologic Oncology, **90**, 24-32.
- Dixon, H.B.F. (1983), *NOMENCLATURE OF RETINOIDS*, INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY and INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY JOINT COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE, Pergamon Press Ltd, 55, **4**, 722-723.
- Dülger, G. (2011), Kemoterapötiklere Giriş,  
[www.ekutuphane.teb.org.tr/pdf/eczaciodasiyayinlari/antibiyotkler/2.pdf](http://www.ekutuphane.teb.org.tr/pdf/eczaciodasiyayinlari/antibiyotkler/2.pdf), 14, 07.
- Edinger, A.L. ve Thompson, C.B. (2004), *Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy*, Current Opinion in Cell Biology, **16**, 663-669.
- Ekber, J., Brunhoff, C., Järås, M., Fan, X., Landberg, G. ve Persson, J.L. (2006), *Increased expression of cyclin A1 protein is associated with All-trans retinoic acid-induced apoptosis*, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, **38**, 1330-1339.
- Elmore, S., (2007), *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*, Toxicol Pathol. **35**(4): 495–516.
- Ferrara, N. (2010), *Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis*, Cytokine & Growth Factor Reviews, **21**, 21-26.
- Fields, A.L., Soprano, D.R. ve Soprano, K.J. ( 2007 ), *Retinoids in Biological Control and Cancer*, Journal of Cellular Biochemistry, **102**, 886-889.
- Fraga, D., Meulia, T., Fenster, S. (2008), *Real-Time PCR*, Current Protocols Essential Laboratory Techniques, Bölüm 10.3, 1-34.



- Fu, Y.G., Sung, J.J.Y, Wu, K.C., Wu, H.P., Yu, J., Chan, M., Chan, V.Y.V., Chan, K.K., Fan, D. ve Leung, W.K. (2004), *Inhibition of gastric cancer –associated angiogenesis by antisense COX-2 transfectans*, Cancer Letters, **224**, 243-252.
- Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp,O., Vitale,I., Rigoni, A., Vacchelli, E., Michaud, M., Zischka, H., Castedo, M. ve Kroemer, (2009), *Mitochondrial gateways to cancer*, Molecular Aspects of Medicine 31,1-20. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, **38**, 1330-1339.
- Ghezzi, F., Cromi, A., Serati, M., Uccella, S., Formenti, G., Bogani, G. ve Vanoli, P. (2010), *Radiation –induced bowel complications: laparoscopic versus open staging of gynecologic malignancy*, Ann. Surg. Oncol., **18**, 782-791.
- Ghobrial, M.I., Witzing, E.T. ve Adjei, A.A. (2005), *Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy*, CA Cancer J. Clin., **55**, 178-194.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. ve Mathieu, C. (2001), *An Overview of Real-Time Quantitative PCR:Applications to Quantify Cytokine Gene Expression*, METHODS, **25**, 386–401.
- Gotlieb, W.H., Bruchim, I., Gu, J., Shi, Y., Camirand, A., Blouin, M.J., Zhao, Y. ve Pollak, M.N. (2006), *Insulin-like growth factor receptor I targeting in epithelial ovarian cancer*, Gynecologic Oncology, **100**, 389-396.
- Grove, D.S. (1999), *Quantative Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Core Facility Using Taqman and the Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division 7700 Squence Detector*, Journal of Biomolecular Techniques, **10**, 11-16.
- Gullbo, J., Fryknä, M., Rickardson, L., Darcy, P., Hägg, M., Wickström, M., Hassan, S., Westman, G., Brnjic S., Nygren, P., Linder, S. ve Larsson, R. (2011), *Phenotype-based drug screening in primary ovarian carcinoma cultures identifies*

- intracellular iron depletion as a promising strategy for cancer treatment*, Biochemical Pharmacology, **82**, 139-47.
- Güleş, Ö. ve Eren, Ü. (2008), *Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler*, Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, **2**, 73-78.
- Güllü, İ. (2004), *Anjiyenez ve antianjiyjenik tedaviler*, XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Non –Hodgkin Lenfoma, 34-39.
- Gültekin, N., Karaoğlu, K. ve Küçükateş, E. (2008), *Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri*, Türk Kardiyol. Dern. Arş., **36**, **2**, 120-130.
- Güneş, H.V. (2003), *Moleküler Hücre Biyolojisi*, Kaan Kitapevi, 1. baskı, 167.
- Gürsoy, G. (2011), *Eğitim ve araştırma hastaneleri ile üniversite hastanelerinde kanser nedeniyle ölen hastalar*, [www.ukdk.org/pdf/kitap/22.pdf](http://www.ukdk.org/pdf/kitap/22.pdf). 14:58.
- Halis, T.M., Kop, L.A., Gibson, J., Lebakken, S.C., Hancock, M., Kramer, H.K. ve Etienne, T.T. (2007), *An improved  $\beta$ -lactamase reporter assay: multiplexing with a cytotoxicity readout for enhanced accuracy of hit identification*, Journal of Biomolecular Screening, **12**, 635-644.
- Hamilton, T.C., Young, C.R. ve McKoy, W.M. ( 1983 ), *Characterization of a Human Ovarian Carcinoma Cell Line ( NIH:OVCAR-3 ) with Androgen and Estrogen Receptors*. Cancer Research, **43**, 5379-5389.
- Heid, C.A., Stevens, J. ve Livak, K.J. (1996), *Real time quantitative PCR*, Genome Research, **6**, 986-994.
- Hockenbery, D. (1995), *Defining Apoptosis*, American Journal of Pathology, **146**, 16-19.

- Hou, L., Fan, Y., Yao, J., Zhou, J., Li, C., Fang, Z. ve Zhang, Q. (2011), *Low molecular weight heparin-all-trans-retinoid acid conjugate as a drug carrier for combination cancer chemotherapy of paclitaxel and all-trans-retinoid acid*, Carbohydrate Polymers, 86, **3**, 1157-1166.
- Hu, L., Hoffman, J. ve Lu, Y. (2002), *Inhibition of Phosphatidylinositol 3'-Kinase Increases Efficacy of Paclitaxel in in Vitro and in Vivo Ovarian Cancer Models*, **62**, 1087-1092.
- Huerta, S., Goulet, E.J., Huerta-Yepez, S. ve Livingston, E.D. (2006), *Screening and Detecting Apoptosis*, Journal of Surgical Research, **139**, 143-156.
- Innis, M.A. ve Gelfand, D.H. (1990), *Optimization of PCRs*, A Guide to Methods and Applications, **3**;12, 1-5.
- Iyengar, P., Espina, V., Williams, W.T., Lin, Y., Berry, D., Jelicks, L.A., Lee, H., Temple, K., Graves, R., Pollard, J., Chopra, N., Russell, R.G., Sasisekharan, R., Trock, B.J., Lipmann, M., Calvert, V.S., Emanuel, F.P., Liotta, L., Dadochova, E., Pestell, R.G., Lisanti, P.M., Bonaldo, P. ve Scherer, P.E. (2005), *Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor /stroma microenvironment*, J.Clin. Invest., **115**, 1163-1176.
- Jian P., Li Z.W., Fang T.Y., Jian W., Zhuan Z., Mei L.X., Yan W.S. ve Jian N., (2011), *Retinoic acid induces HL-60 cell differentiation via the upregulation of miR-663*, Journal of Hematology & Oncology , **4**, 2-8.
- Kane, A.G. (1995), *Redefining Cell Death*, American Journal of Pathology, **146**, 1.
- Karabulut, B., Karaca, B., Varol, U., Muslu, U., Cakar, B., Atmaca, H., Kısım, A., Uzunoğlu, S. ve Uslu, R. ( 2010 ), *Enhancing cytotoxic and apoptotic effect in OVCAR-3 and MDAH-2774 cells with all-trans retinoic acid and zelodronic acid:*

a paradigm of synergistic molecular targeting treatment for ovarian cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **29**, 2-9.

Kaufmann, S.C., Lee, S-H., Meng, X.W., Loegering, D.A., Kottke, J.T., Henzing, A.J., Ruchaud, S., Samejima, K. ve Earnshaw, W.C. (2008), *Apoptosis-associated caspase activation assays*, *Methods*, **44**, 262-272.

Kehoe, S. (2006), *Treatments for gynaecological cancers*, *Best practice & research clinical obstetrics and gynaecology*, **20**, **6**, 985-1000.

Kelly, M.G., Alvero, A.B. ve Chen, R. (2006), *TLR-4 Signaling Promotes Tumor Growth and Paclitaxel Chemoresistance in Ovarian Carcinoma*, *Cancer Research*, **66**, 3859-3868.

Kubista, M., Andrade, J.M, Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Stahlberg, A., Zoric, N. (2006), *The real time polymerase chain reaction*, *Molecular Aspects of Medicine*, **27**, 95-125.

Kouno, T., Ando, M., Yonemori, K., Matsomoto, K., Shimizu, C., Katsumata, N., Komiyama, M., Okajima, N., Matsuoka, N., Fujimoto, H. ve Fujiwara, Y. (2007), *Weekly Paclitaxel and Carboplatin against Advanced Transitional Cell Cancer after Failure of a Platinum –Based Regimen*, *European Association of Urology*, **52**, 1115-1122.

Langdon, S., Mulgrew, J., Paolini, G.V. ve Horn, P.W. (2010), *Predicting cytotoxicity from heterogeneous data sources with bayesian learning*, Langdon et al. *Journal of Cheminformatics*, **2**, 2-18.

Larsen, A.K., Oualet, D., Ouadrani, K.E., Petitprez, A. (2011), *Targeting EGFR and VEGF(R) pathway croaa-talk in tumor survival and angiogenesis*, *Pharmacology & Therapeutics*, **131**, 80-90.

- Ledermann, L.A. ve Raja, F.A. (2010), *Targeted trials in ovarian cancer*, *Gynecologic Oncology*, **119**, 151-6.
- Lee, J.J., Yu, Y.J., Lee, J.H., Zhang, W.Y., Kim, T.J., Myung, C.S. ve Yun, Y.P. (2009), *The protective effects of Paclitaxel on Platelet Aggregation through the Inhibition of Thromboxane A2 Synthase*, *Arch. Pharm. Res.*, **3**, 387-394.
- Lee, C.S., Kim, Y.J., Jang, E.R., Myung, S.C. ve Kim, W. (2010), *Akt inhibitor enhances apoptotic effect of carboplatin on human epithelial ovarian carcinoma cell lines*, *European Journal of Pharmacology*, **632**, 7-13.
- Leszczynieckaa, M., Roberts, T., Dent, P., Grant, S. ve Fisher, P.B. (2001), *Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications*, *Pharmacology & Therapeutics*, **90**, 105-156.
- Li, D., Wang, Z., Chen, H., Wang, J., Zheng, Q., Shang, J. ve Li, J. (2009), *Isoliquiritigenin induces monocytic differentiation of HL-60 cells*, *Free Radical Biology & Medicine*, **46**, 731-736.
- Lin, J., Li, G., Den, X., Xu, C., Liu, S., Gao, Y., Liu, H., Zhang, J., Li, X. ve Ling, S., (2010), *VEGF and its receptor-2 involved in neuropathic pain transmission mediated by P2X<sub>2/3</sub> receptor of primary sensory neurons*, *Brain Research Bulletin*, **83**, 284-291.
- Livak, K.J. ve Schmittgen, T.D. (2001), *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method*, *Methods*, **25**, 402-408.
- Lossos, IS., Czerwinski, DK., Wechser, M.A. ve Levy, R. (2003), *Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies*, *Leukemia*, **17**, 789-795.

- Lotan, R. (1996), *Retinoids in cancer chemoprevention*, FASEB J. **10**, 1031-1039.
- Lu, L., Katsaros, D. ve Wiley A. (2006), *The relationship of insulin-like growth factor – II, insulin like growth factor protein-3 , and estrogen receptor-alpha expression to disease progression in epithelial ovarian cancer*, Clin. Cancer Res., **12**, 1208-1214.
- Lopez-Hernandez FJ., Ortiz MA., Bayon Y., Piedrafita FJ. (2004), *Retinoid-related molecules require caspase 9 for the effective release of Smac and the rapid induction of apoptosis*, Cell Death Differ., **11**(2):154-64.
- Majno, G. ve Joris, I. (1995), *Apoptosis, Oncosis and Necrosis*, American Journal of Pathology, **1**, 146.
- Mandili, G., Marini, C., Carta, F., Zanini, C., Prato, M., Khadjavi, A., Turrini, F. ve Giribaldi, G. (2011), *Identification of phosphoproteins as possible differentiation markers in all-trans-retinoic acid-treated neuroblastoma cells*, Plos One, **5**, **6**, 18254.
- Masny, A. ve Plucienniczak, A. (2003), *Ligation mediated PCR performed at low denaturation temperatures-PCR melting profiles*, Nucleic Acids Research, **18**, 2-6.
- Menczer, J. (2009), *Cox-2 expression in ovarian malignancies A review of the clinical aspects*, European Journal of Obstetrics&Gynecology and Reproductive Biology, **146**, 129-132.
- Mêric, J.B., Rottey, S., Olausson, K., Soria, J.C., Khayat, D., Rixe, O. ve Spano, J.P. (2006), *Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development*, Critical Reviews in Oncology/Hematology, **59**, 51-54.

- Modesit, S.C. ve Parsons, S.J. (2010), *In vitro and in vivo histone deacetylase inhibitor therapy with vorinostat and paclitaxel in ovarian cancer models Does timing matter?*, Gynecologic Oncology, **119**, 351-357.
- Modugno, F. (2003), *Ovarian cancer and high-risk women—implications for prevention, screening, and early detection*, Gynecologic Oncology, **91**, 15-31.
- Moles, M.A.G., Ruiz-Avila, I., Gil-Montoya, J.A., Esteban, F. ve Bravo, M. (2010), *Analysis of Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma: Why Ki-67 is not a prognostic indicator*, Oral Oncology, **46** , 525-530.
- Mukohara, T., Shimada, H., Ogasawara, N., Wanikawa, R., Shimomura, M., Nakatsura, T., Ishii, G., Park, J.O., Jänne, P.A., Saijo, N. ve Minami, H. ( 2009 ), *Sensitivity of breast cancer cell lines to the novel insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) inhibitor NVP-AEW541 is dependent on the level of IRS-1 expression*, Cancer Letters, **282**, 14-24.
- Mullis, K.B. (1990), *The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction*, Scientific American, 56-65.
- Munkarah, A.R., Genhai, Z., Morris, R., Baker, M.D., Deppe, G., Diamond, M.P. ve Saed , G.M. (2003), *Inhibition of paclitaxel-induced apoptosis by the specific COX-2 inhibitor, NS398, in epithelial ovarian cancer cells*, Gynecologic Oncology, **88**, 429-433.
- Ng K.Y., Ma M.T., Leung K.K., Leung P.S. (2011), *Vitamin D and Vitamin A Receptor Expression and the Proliferative Effects of Ligand Activation of These Receptors on the Development of Pancreatic Progenitor Cells Derived from Human Fetal Pancreas*, Stem Cell Rev and Rep , **7**:53–63.

- Niles, R.M. (2000), *Recent Advances in the Use of Vitamin A (Retinoids) in the Prevention and Treatment of Cancer*, Nutrition, **16**, 1084-1090.
- Niles, R.M. (2004), *Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer*, Mutation Research, **555**, 81-96.
- Smith J.A., Ngo T.H., Martin M.C., Wolf J.K., (2005), *An evaluation of cytotoxicity of the taxane and platinum agents combination treatment in a panel of human ovarian carcinoma cell lines*, Gynecologic Oncology **98**, 141 – 145.
- Ortiz, M.A., Bolan, Y., Hernandez, F.J. ve Piedrafita, F.J. (2002), *Retinoids in combination therapies for the treatment of cancer: mechanism and perspectives*, Drug Resistance Updates, **5**, 162-175.
- Overbeeke, R., Nakken-Steffens H., Vermes, I., Reutelingsperger, C. ve Hanen, C. (1998), *Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays*, Apoptosis, **3**, 2, 115-121.
- Öniz, H. (2004), *Apoptosis: The Death Decision*, SSK Tepecik Eğitim Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, Çocuk Onkoloji ve Kemik İliği Transplantasyon Ünitesi, İzmir, **14**(1):1-20.
- Pfaffl, M. (2000), *Development and validation of an externally standardised quantitative insulin-like growth factor-1 RT-PCR using LightCycler SYBR Green I technology*, Nucleic Acids Research, **3**, 13-16.
- Pires, I., Garcia A., Prada, J., ve Queiroga F.L., (2010), *COX-1 and COX-2 Expression in Canine Cutaneous, Oral and Ocular Melanocytic Tumours*, J. Comph.Path.,**143**, 142-149.



- Pliarchopoulou, K. ve Pectasides, D. (2011), *Epithelial ovarian cancer: Focus on targeted therapy*, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **79**, 17-23.
- Porter, A.G. (1999), *Protein translocation in apoptosis*, *Trends in Cell Biology*, **9**,394-401.
- Porter, A.G. ve Jänicke R.U., (1999), *Emerging roles of caspase-3 in apoptosis*, *Cell Death and Differentiation*, **6**, 99- 104.
- Potemski, P., Pluciennik, E., Bednarek, A.K., Kusinska, R., Kubiak, R., Kupnicka, D.R., Walata, C. ve Kordek, R. (2006), *Ki-67next term expression in operable breast cancer A comparative study of immunostaining and a real-time RT-PCR assay*, *Pathology –Research and Practice*, **202**, 491-495.
- QuantiTectReverseTranscriptionHandbook,(2009),QIAGEN,8, [www.qiagen.com/hb/qtrevtranscription](http://www.qiagen.com/hb/qtrevtranscription)
- Qing-xi Liu Q., Wang N.,1\*Xing-hua Liao X.,1Guang-da Ren G., 1Tao Qin T., Yu, R., Cheng C., Liu G., Zhang T., (2011), *All-trans Retinoic Acid Induced the Differentiation of Human Glioma Cells*, *Clin Oncol Cancer Res.*, **8**: 42-46.
- Repnik, U. ve Turk, B. (2010), *Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death*, *Mitochondrion*, **10**, 662-669.
- Reyes, V.V., Rodriguez –Burford, C., Chhieng, D.C., Oelschlager, D.K., Fuentes, A.R., Barnes, M. ve Grizzle, W.E. (2006), *Celecoxib Inhibits Cellular Growth, Decreases Ki-67 Expressionnext term and Modifies Apoptosis in Ovarian previous termCancer Cell Lines*, *Archieves of Medical Research*, **37**, 689-695.

- Reynold, C.P., Matthay, K.K., Villablanca, J.G. ve Maurer, B.J. (2003), *Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma*, Cancer Letters, **197**, 185-192.
- Ria, R., Roccaro, A.M., Merchionne, F., Vacca, A., Dammocco, F. ve Ribatt, D. (2003), *Vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma*, Leukemia, **17**, 1961-1966.
- Rikhof, B., Jong, S., Suurmeijer, A.J.H., Meijer, C. ve Graff, W.T.A. (2009), *The insulin-like growth factor system and sarcomas*, Journal of Pathology, **217**, 469-482.
- Rizzo, M.T. (2010), *Cyclooxygenase-2 in oncogenesis*, Clinica. Chimica. Acta., **412**, 617-687.
- Rossing, M.A., Haugen-Cushing, K.L., Wicklund, K.G., Doherty, J.A. ve Weiss, N.S. (2008), *Risk of epithelial ovarian cancer in relation to benign ovarian conditions and ovarian surgery*, Cancer Causes Control, **19**, 1357-1364.
- Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S. ve White, M.F. (2002), *SOCS-1 and SOCS-3 Block Insulin Signaling by Ubiquitin-mediated Degradation of IRS1 and IRS2*, The Journal of Biological Chemistry, **4**, 42394-42398.
- Sakai, K., Kaku, T., Kamura, T., Kinukawa, N., Amada, S., Shigematsu, T., Hirakama, T., Kobayashi, H., Ariyoshi, K. ve Nakano H. (1999), *Comparison of p53, Ki-67 and CD44v6 Expression between Primary and Matched Metastatic Lesions in Ovarian Cancer*, Gynecologic Oncology, **72**, 360-366.
- Schlosshauer, P.W., Li, W., Lin, K.T., Chan, J.L-K. ve Wang, L.H. (2009), *Rapamycin by itself and additively in combination with carboplatin inhibits the growth of ovarian cancer cells*, Gynecologic Oncology, **114**, 516-522.

- Segel, M.J., Or, Reuven, Tzurel, A., Lucey, E.C., Goldsteins, R.H., Izbicki, G. ve Breuer, R. (2001), *All-trans retinoic Acid (ATRA) is of no Benefit in Bleomycin induced Lung Injury*, Pulmonary Pharmacology&Therapeutics, **14**, 403-407.
- Sherman, H., Gutman, R., Chapnik, N., Meylan, J., Coutre, J. ve Froy, O. (2011), *All-trans retinoic acid modifies the expression of clock and disease marker genes*, Journal of Nutritional Biochemistry.
- SIGMA-ALDRICH,(2011),*Retinoicacid*,  
[www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/.../1/.../r2625pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/.../1/.../r2625pis.pdf)
- Siddikuzzaman G.C. ve Grace V.M.B., (2011), *All Trans Retinoic Acid and Cancer*, Immunopharmacology and Immunotoxicology, **33**(2): 241–249.
- Soini, Y., Pääkkö, P. ve Lehto, V-P. (1998), *Histopathological Evaluation of Apoptosis in Cancer*, American Journal of Pathology, **153**, 1041-53.
- Steoltzing, O., Liu, W., Reinmuth, N., Parikh, A., Ahmad, S.A., Jung, Y., Fan, F. ve Ellis, L.M. (2003), *Angiogenesis and antiangiogenic therapy of colon cancer liver metastasis*, Annals of Surgical Oncology, **7**, 722-733.
- Stewart, J.D. (2007), *Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin*, Critical Reviews in Oncology Hematology, **63**, 12-31.
- Strillacci, A., Griffoni, C., Sansone, P., Paterini, P., Piazzini, G., Lazzarini, G., Spisni, E., Pantaleo, M.A., Biasco, G. ve Tomasi, V. (2009), *MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells*, Experimental Cell Research, **315**, 1439-1447.
- Tanaka, S., Nohara, T., Iwamoto, M., Sumiyoshi, K., Kimura, K., Takahashi, Y. ve Tanigawa, N. (2009), *Tau expression and efficacy of paclitaxel treatment in metastatic breast cancer*, Cancer Chemother. Pharmacol., **64**, 341-346.

- Teng, L.S., Jin, K.T., He, K-F., Wang, H-H., Cao, J., Yu, D.C. (2010), *Advances in Combination of Antiangiogenic Agents Targeting VEGF-binding and Conventional Chemotherapy and Radiation for Cancer Treatment*, J. Chin Med Assoc., **73**, 281-8.
- Teoh, D., Ayeni, T.A., Rubatt, J.M., Adams, D.J., Grace, L., Star, M.D., Barry, W.T., Berchuck, A., Murphy, S.K., Secord, A.A. (2011), *Dasatinib (BMS25482) has synergistic activity with paclitaxel and carboplatin in ovarian cancer cells*, Gynecologic Oncology, **121**, 187-192.
- Ulukaya, E. (2003), *Apoptosis Ders Notları*, Uludağ Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı, Bursa, [http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptosis\\_ders\\_notu.pdf](http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptosis_ders_notu.pdf) (15-05-2011) 2-19.
- Um, J.S., Lee, S.Y., Kim, E.J., Han, H.S., Koh, Y.M., Hong, K.J., Sin, H.S. ve Park, J.S. (2001), *Antiproliferative mechanism of retinoid derivatives in ovarian cancer cells*, Cancer Letters, **174**, 127-134.
- Üstüner, D. (2010), *Tümör Hücrelerinde Western Blotlama Uygulamaları*, TÜBAV, 3, **4**, 330-334.
- Vandesompele, J., Preter, K.D., Pattyn, F., Poppe, B., Roy, N.V., Paepe, A.D. ve Speleman, F. (2002), *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*, **Genome Biology**, **3**, 2-12.
- Vermeulen, K., Bockstaele, R.V. ve Berneman, Z.W. (2005), *Apoptosis; mechanism and relevance in cancer*, Ann. Hematol., **84**, 627-639.

- Villasana, M., Ochoa, G. ve Aguilar, S. (2010), *Modeling and optimization of combined cytostatic and cytotoxic cancer chemotherapy*, Artificial Intelligence in Medicine, **50**, 163-173.
- Walker N.J. (2001), *Real-Time and Quantitative PCR:Applications to Mechanism-Based Toxicology*, J Biochem Molecular Toxicology, **15**, 121-127
- Weyermann, J., Lochmann, D. ve Zimmer, A. (2005), *A practical note on the use of cytotoxicity assays*, International Journals of Pharmaceutics, **288**, 369-376.
- Weighardt F. (2011), *Gıda Örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların Analizleri*, Bölüm 10;GDO'ların Saptanması için Nicel PCR, Institute for Health and Consumer protection, mbg.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/.../bolum 10.pdf, 2-19.
- White, F.M. (2002), *IRS proteins and the common path to diabetes*, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., **283**, 413-422.
- Willett, C.D., Boucher, Y., Tomaso, E., Duda, D.G., Munn, L.L., Tong, T.R., Chung, D.C., Sahani, D.V., Kavla, S.P., Kozin, S.V., Mino, M., Cohen, K.S., Scadden, D.T., Hartford, A.C., Fichman, A.J., Clark, J.F., Ryan, D.P., Zhu, X.A., Blazzkowsky, L.S., Chen, X.H., Shellito, P.C., Lauwers, G.Y. ve Jain, K.R. (2004), *Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasculuar effects in human rectal cancer*, Nat. Med., 10, **2**, 145-147.
- Wolf G., (1997), *The Vitamin A binding Proteins*, Molecular and Cellular Pharmacology, **8**:871-882.
- Xiao-dong, Z., Feng-hua, W., Yi, Z., Shu-rong, H. ve Li, Y. (2009), *Treatment of platinum-resistant recurrent ovarian cancer using a 'predictive molecule targeted routine chemotherapy' system.*, Chin. Med. J., 122, **23**, 2856-2860.

- Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H.Y., Baltimore, D. (1997), *Daxx, a novel fas - binding protein that activates JNK and apoptosis*, Cell, **89**, 1067-1076.
- Yao, H.J., Ju, R.J., Wang, X.X., Zhang, Y., Li, R.J., Yu, Y., Zhang, L. ve Lu, W.L., (2011), *The antitumor efficacy of functional paclitaxel nanomicelles in treating resistant breast cancers by oral delivery*, Biometarials, **32**, 3285-3302.
- Ye, X., Wu, Q., Liu, S., Lin,S., Zhang, B., Wu, J., Cai, J., Zhang, M. ve Su, W-Jin, (2004), *Distinct role and functional mode of TR3 and RAR $\alpha$  in mediating ATRA-induced signalling pathway in breast and gastric cancer cells*, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, **36**, 98-113.
- Yee, D., Morales, F.R. ve Hamilton, T.C. (1991), *Expression of Insulin-like Growth Factor I, Its binding Proteins, and Its Receptor in Ovarian Cancer*, Cancer Res., **51**, 5107-5112.
- Yoltaş, A. ve Karaboz, İ. (2010), *DNA mikroarray teknolojisi ve uygulama alanları*, Elektronik Mikrobiyoloji DergisiTR, **8**, **1**, 1-19.  
[www.mikrobiyoloji.org/pdf/702100101.pdf](http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702100101.pdf)
- Yılmaz, S. ve Devran, Z. (2011), *Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve Bitkibiyoteknolojisinde Yaygın Uygulamaları*,  
<http://www.batem.gov.tr/yayinlar/derim/2003/31-42.pdf>, 16:21.
- Yin, L.J., Shackel, N.A., Zekry, A., McGuinness, P.H., Richards, C., Putten, D.V.K., McCaughan, G.W., Eris, J.M. ve Bishop, G.A. (2001), *Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I*, Immunology and Cell Biology, **79**, 213-221.

- Yu, L., Liang, X.H., Ferrara, N. (2011), *Comparing protein VEGF inhibitors: In vitro biological studies*, Biochemical and Biophysical Research Communications, **408**, 276-281.
- Zanardi, S., Serrano, D., Argusti, A., Barile, E., Puntoni, M. ve Decensi, A. (2006), *Clinical trials with retinoids for breast cancer chemoprevention*, Endocrine – Related Cancer, **13**, 51-68.
- Zhang, H., Solomon, V.R., Hu, C., Ulubarri, G. ve Lee, H. (2007), *Synthesis and in vitro cytotoxicity evaluation of 4-aminoquinoline derivatives*, Biomedicine & Pharmacotherapy, **62**, 65-69.
- Zhang, Y.W., Davis, E.G., Bai, J. (2008), *Determination of internal control for gene expression studies in equine tissues and cell culture using quantitative RT-PCR*, Veterinary Immunology and Immunopathology, **130**, 114-119.