

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ISHIKAWA ENDOMETRİYUM EPİTELİ DEVAMLILIK
HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE KLOREMİPRAMİN'İN
KARBOPLATİN SİTOTOKSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

MİNE ŞENCAN

**DANIŞMAN
PROF.DR. AYHAN BİLİR**

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






İSTANBUL-2011

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Programında Mine ŞENCAN tarafından hazırlanan Ishikawa Endometrium Epiteli Devamlı Hücre Kültürlerinde Klorimipramin'in Karboplatin Sitotoksitesi Üzerine Etkisi başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

16 / 06 / 2011

Tez Sınav Jürisi

- | <u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u> | <u>İmzası</u> |
|---|---|
| 1.Prof. Dr. Ayhan BİLİR, İstanbul Üni., İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.B.D. |  |
| 2.Prof. Dr. Mehmet GÜRTEKİN, İstanbul Üni., İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji A.B.D |  |
| 3.Prof. Dr. Şule Çetinel, Marmara Üni., Marmara Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.B.D. |  |
| 4.Doç. Dr. Uğur GEZER, İstanbul Üni., Onkoloji Enstitüsü, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı |  |
| 5.Yrd. Doç. Dr. Mine Ergüven, Yeni Yüzyıl Üni., Tıp Fakültesi, Biyokimya A.B.D. |  |

BEYAN

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

Mine ŞENCAN



İTHAF

Bana her zaman destek olan ve inanan, benim için her şeyden önemli olan aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Lisans üstü eğitimim boyunca her an yanımda olan tüm bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen danışman hocam İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Ayhan BİLİR'e,

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, elemanlarına, iki yıl boyunca her daim yanımda olan ekip arkadaşım Mert Şenyürek'e, manevi hiçbir desteğini esirgemeyen çok sevgili asistan arkadaşlarım Tuğba Ekiz ve Müge Ateşkan'a, diğer asistan arkadaşlarım Şengül Özkasap ve Fadima Aktar'a,

Tez çalışmamın pratik çalışmalarında yardımlarından faydalandığım Füsun Öncü, Selahattin Ünal, Sibel Doğan ve Ebru Akyön'e,

Tez deneylerimde ve sonuçlarımın analizinde yardımcı olan Yeni Yüzyıl Üniversitesi öğretim görevlisi Yrd. Doç. Dr. Mine Ergüven'e,

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince maddi, manevi yardımlarından dolayı aileme en içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:9997

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET.....	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İSHİKAWA.....	3
2.2. ENDOMETRİYUM KANSERİ.....	3
2.3. HÜCRE VE DOKU KÜLTÜRÜ HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....	5
2.3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	5
2.3.2. SFEROİD	7
2.3.3. İMMÜNOHİSTOKİMYA.....	7
2.3.4. BrdU.....	9
2.4. PROJEDE KULLANILAN İLAÇLAR	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1. KULLANILAN MADDELER.....	13
3.1.1. Kimyasal Maddeler	13
3.1.2. Enzimler	13
3.1.3. İlaçlar.....	13
3.1.4. Kitler	13
3.1.5. Diğer maddeler	13
3.2. KULLANILAN GEREÇLER	14
3.3. KULLANILAN ÇÖZELTİLER.....	14
3.3.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler	14

3.3.2. İmmünohistokimiyada Kullanılan Çözeltiler	15
3.4. KULLANILAN YÖNTEMLER	16
3.4.1. Hücre Kültürü	16
3.4.2. Doz Belirleme Deneyi	16
3.4.3. Proliferasyon (Tutunma) Deneyi	17
3.4.4. İki Boyutlu Hücre Kültürlerinde BrdU İşaretleme İndeksi İmmünohistokimya Tekniği	18
3.4.5. Üç boyutlu (Sferoid) Hücre Kültürü	19
3.4.5.1. İlaçların Geçirimli Elektron Mikroskobu İle Hücre İnce Yapısı (Ultrastrüktürel) Üzerine Etkilerinin Saptanması.....	20
3.4.5.2. Üç Boyutlu Hücre Kültürlerinde BrdU İşaretleme İndeksi İmmünohistokimya Tekniği	20
3.4.6. Akım Sitometrik Anneksin-V-FITC/PI Boyaması ile İlaçların Programlı Hücre Ölümüne Etkilerinin Saptanması.....	22
3.5. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM.....	23
4. BULGULAR.....	24
4.1. TUTUNMA (PLATING) VERİLERİ	24
4.2. TEK TABAKALI HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE BrdU İŞARETLENME İNDEKSİ (BrdU-LI).....	25
4.3. ÜÇ TABAKALI (SFEROİD) HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE BrdU-LI	27
4.4. AKIM SİTOMETRİK ANNEKSİN-V-FITC/PI BOYAMASI İLE İLAÇLARIN PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜNE ETKİLERİ.....	28
4.5. İLAÇLARIN GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOBU İLE ÜÇ BOYUTLU ISHIKAWA HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE HÜCRELERİN İNCE YAPISI (ULTRASÜKRÜKTÜRÜ) ÜZERİNE ETKİSİ.....	32
5. TARTIŞMA	43
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	52

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 4-1:İshikawa Endometrial Epiteli Hücre Kültürlerinde CAR, CIMP ve CAR+CIMP Kombinasyonlarının Hücre Sayısı Üzerindeki Zamana Bağlı Etkileri .24	
Tablo 4-2: İshikawa Endometrial Epiteli Hücre Kültürlerinde CAR, CIMP ve CAR+CIMP Kombinasyonlarının Sentez Fazındaki Hücelere Etkileri.....25	
Tablo 4-3: İshikawa Endometrial Epiteli Üç Boyutlu (Sferoid) Hücre Kültürlerinde CAR, CIMP ve CAR+CIMP Kombinasyonlarının Sentez Fazındaki Hücelere Etkileri27	
Tablo 4-4: İlaçların Hücreler Üzerindeki İstatistiksel Apoptoz Verileri.....28	

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Östrojen/ PTEN/NF-κB	4
Şekil 2-2: PTEN/NF-κB	5
Şekil 4-1. Zamana Bağlı Hücre Çoğalma Verileri.....	24
Şekil 4-2. Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU-LI.....	26
Şekil 4-3.Üç tabakalı (Sferoid) Hücre Kültürlerinde BrdU-LI.....	27
Şekil 4-4. İlaçların Hücreler Üzerindeki Apoptoz Etkiletinin Verileri	29
Şekil 4-5: TEM Kontrol Grubu	32
Şekil 4-6: TEM Kontrol Grubu	33
Şekil 4-7: TEM CAR Grubu	34
Şekil 4-8: TEM CIMP Grubu	34
Şekil 4-9: TEM CIMP Grubu	35
Şekil 4-10: TEM Kombinasyon Grubu	35
Şekil 4-11: TEM Kombinasyon Grubu	36
Şekil 4-12:Kontrol Grubu 24 Saat Ishikawa Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası.....	37
Şekil 4-13: CAR Grubu 24 Saat Ishikawa Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası.....	37
Şekil 4-14:CIMP Grubu 24 Saat Ishikawa Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası.....	38
Şekil 4-15: Kombinasyon (CAR + CIMP) Grubu 24 Saat Ishikawa Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası.....	38
Şekil 4-16: Kontrol Grubu 72 Saat Ishikawa Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası.....	39
Şekil 4-17: CAR Grubu 72 Saat Ishikawa Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası.....	39
Şekil 4-18:CIMP Grubu 72 Saat Ishikawa Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası.....	40
Şekil 4-19: Kombinasyon (CAR + CIMP) Grubu 72 Saat Ishikawa Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası.....	40
Şekil 4-20:Kontrol Grubu 24 Saat Ishikawa Üç Boyutlu (Sferoid) Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası	41

Şekil 4-21: CAR Grubu 24 Saat Ishikawa Üç Boyutlu (Sferoid) Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası	41
Şekil 4-22:CIMP Grubu 24 Saat Ishikawa Üç Boyutlu (Sferoid) Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası	42
Şekil 4-23: Kombinasyon (CAR + CIMP) Grubu 24 Saat Ishikawa Üç Boyutlu (Sferoid) Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası	42

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Anneksin-V-FITC	: Anneksin-V-Floresan izotiyosiyanat
ATCC	: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
BrdU	: 5-Bromo-2-Deoxyuridine
BrdU-LI	: Bromodeoksiüridin-labeling indeks
CAR	: Karboplatin
CDDP	: Cis-diaminodikloroplatinyum
CDKN2A	: Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CMF-PBS	: Kalsiyumsuz magnezyumsuz fosfat tampon solüsyonu
CIMP	: Klorimipramin
ELISA	: ELIZA (Enzyme-linked immunosorbent assay)
ERBB2	: Human Epidermal growth factor Receptor 2
FCM	: Flow sitometri
FBS	: Fötal sığır serumu
KRAS	: V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MTS	: Multisellüler tümör sferoid
NF-Kb	: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PBS	: Fosfat tamponu içeren %0,9 NaCl
PIP3	: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PTEN	: Phosphatase and tensin homolog
TEM	: Geçirimli elektron mikroskobu
TP53	: Tumor protein 53

ÖZET

Şencan, M. (2011) Klorimipramin'in Ishikawa Endometriyum Epiteli Hücre Kültürlerinde Karboplatin Sitotoksitesi Üzerine Etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji AD. Yüksek Lisans Tezi

Çalışmamızda, antidepresan özelliği bilinen Klorimipramin'in ve antineoplastik ilaç olarak kullanılan Karboplatin'in ayrı ayrı ve birarada kullanıldığında Ishikawa Endometriyum Epiteli hücre kültürlerinde sitotoksik etkileri araştırıldı.

İlaçlar, 200,100,10 ve 1 μ M'lık dozlarda 24, 48 ve 72 saatlik sürelerle hücelere uygulandı. Hücre çoğalma indeksi, BrdU işaretlenme indeksi ile S fazında bulunan hücrelerin oranı, akım sitometrik yöntem ile programlı hücre ölümüne giden hücre sayıları ve geçirimli elektron mikroskobu ile hücrelerdeki morfolojik değişimler saptandı.

Karboplatin ve Klorimipramin'in tek tek uygulandığında inhibisyonu arttırıcı etkisinin olduğu saptandı. Ancak kombine uygulamalar sonunda kombinasyon gruplarının tek tek uygulamalara göre sinerjistik bir sitotoksikite meydana getirdikleri saptandı.

Sonuç olarak Karboplatin ve Klorimipramin'in birlikte uygulandığında kontrol grubuna oranla anlamlı ve etkin sitotoksik etki meydana getirdikleri saptandı.

Anahtar kelimeler : Ishikawa, Karboplatin, Klorimipramin, hücre kültürü, endometriyum

Çalışmamız; İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: **9997**

ABSTRACT

Sencan,M. (2011)., The effects of chlorimipramine on carboplatin cytotoxicity in Ishikawa Endometrium Epithelium cell culture. İstanbul University, Institute of Health Science, Histology and Embryology Department İstanbul.

In our study, cytotoxic effects of chlorimipramine which antidepressant features are well known and carboplatin that is used as an antineoplastic agent were evaluated together and individually in culture of Ishikawa cells.

Drugs were treated in doses of 1,10,100 and 200 μ M at 24,48 and 72 hours. For this purpose, %100 live ishikawa human endometrial epithelial cells will be used in experiments.in culture medium; effects of drugs on the frequency of the total number of cells, ANNEKSİN-V-FITC/PI flow cytometry staining effects of drugs on programmed cell death can be determined, in the two-dimensional cell culture using BrdU-L1 index (Bromodeoxyuridine, 5-bromo-two-deoxyuridine) immunohistochemistry techniques can be shown to the cells in synthesis phase and morphological alterations of cells were detected by transmission electron microscopy.

Individual treatment of carboplatin and chlorimipramine were found that they effectively reduced both the monolayer and spheroid growth of Ishikawa cells. After combined treatment, in combinations groups there were synergetic or additional effects when compared to individual treatment of drugs.

Key words: Ishikawa, Carboplatin, Chlorimipramine, cell culture, endometrium

In conclusion, carboplatin and chlorimipramine are used for treatment with together showed remarkable cytotoxic effects and caused changes in rates of S-phase cells.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University.
Project No: **9997**

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tümör tedavisinde kullanılan ilaçların hücre düzeyindeki etkileri değişik metodlar kullanılarak araştırılmaktadır. Hücre kültürü çalışmalarının çoğu genellikle iki boyutlu tümör hücre kültürleri kullanılarak yapılmaktadır. İki boyutlu hücre kültürlerinden elde edilen sonuçların çoğu zaman in vivo uyumlu olmadığı bilinmektedir. Bu nedenle in vivo uyumlu ve in vivo mikroçevre özelliklerini sağlayan en iyi in vitro modeller üzerinde çalışılmaktadır.

Ishikawa hücreleri; östrojen ve progesteron için steroid reseptörü içeren, uterus fonksiyon bozukluklarına neden olan tip I adenokarsinom hücreleri olup (10), insan endometriyum epitelinden türemektedirler ve günümüzde insan endometriyal kanserini en iyi karakterize eden hücrelerdir(1, 2, 11).

Karboplatin (CAR; cis-diamin-1,1-siklobütan dikarboksilat platinyumII); ovaryum kanseri, endometriyal karsinom gibi çeşitli tümörlerin tedavisinde kullanılan platinyum içeren ikinci nesil antineoplastik alkilleyici bir ajandır (22, 24, 26). Karboplatin çeşitli ilaçlarla (karboplatin + paclitaxel, karboplatin + gemcitabin, karboplatin + cisplatin) birlikte uygulandığında in vivo ve in vitro olarak iyi sinerjizm gösterdiği belirtilmiştir(22, 23, 26, 27). Ancak karboplatinin bilinen bu etkilerine karşılık trisiklik bir antidepresan olan klorimipramin ile ishikawa endometriyum hücre kültürleri üzerinde nasıl bir etkileşim gösterdiği tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda klorimipraminin karboplatin ile kombinasyonlarının ishikawa endometriyum epiteli hücre kültürlerinde hücre çoğalması üzerine etkilerini doza ve zamana bağlı olarak araştırmayı amaçladık.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda; karboplatinin ve klorimipraminin çeşitli hücre soyları üzerine etkileri gösterilmiştir. Depresyon gibi psikiyatrik bozukluklar çeşitli tipte kanser hastalığına yakalanmış hastalıklarda yaygın görülen bir durumdur. Bu durum, tedavinin etkisiz olmasına yol açarken aynı zamanda hayat kalitesini de düşüren bir engel olarak ortaya çıkmaktadır. İyi huylu bir tümörün kontrol altında tutulması ve geriletilmesi ve/veya tamamiyle tedavi edilmesinde hastalık yanında kullanılan antikanser ajanlarda depresyon sebebi olarak gözükmemektedir. Bu nedenle hem endometriyum kanserinin hem de depresyonun kontrol edildiği çoklu tedavi yöntemlerine başvurulmaktadır. Planladığımız çalışma, hücrelerde farklı mekanizmalar üzerine etki eden iki ilacın (antineoplastik bir ilaç olan karboplatinin ve

antidepresan olan klorimipraminin) birlikte uygulanmasının iyi huylu bile olsa hem endometriyum kanserinin hem de depresyonun kontrol altında tutulmasında etkin çoklu tedavi yöntemi adayı olabileceğini göstermek yönündedir. Bu bağlamda elde edeceğimiz sonuçların, özellikle uterus fonksiyon bozukluklarına dolasıylada infertiliteye neden olan endometriyal tümör tedavilerine yönelik çalışmalara yeni uygulama seçeneği kazandırabileceğini düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İSHİKAWA

İshikawa hücre hattı; ilk kez 39 yaşındaki Asyalı bir kadın hastadan, 20 yılı aşan süre öncesinde elde edilmiştir. Bu hücre hattı üreme biyolojisi ve moleküler bilim gibi pekçok araştırma alanlarında kullanılmaktadır (1).

Ishikawa hücreleri; insan endometriyum epitelinden türemektedirler ve günümüzde insan endometriyal kanserini en iyi karakterize eden hücrelerdir(1, 2). Bu hücreler, östrojen ve progesteron için steroid reseptörü içeren, tip I adenokarsinom hücreleri olup, uzun vadeli kültür sonrasında farklılaşmamış hücre eğilimini gösteren hücrelerdir (1, 2).

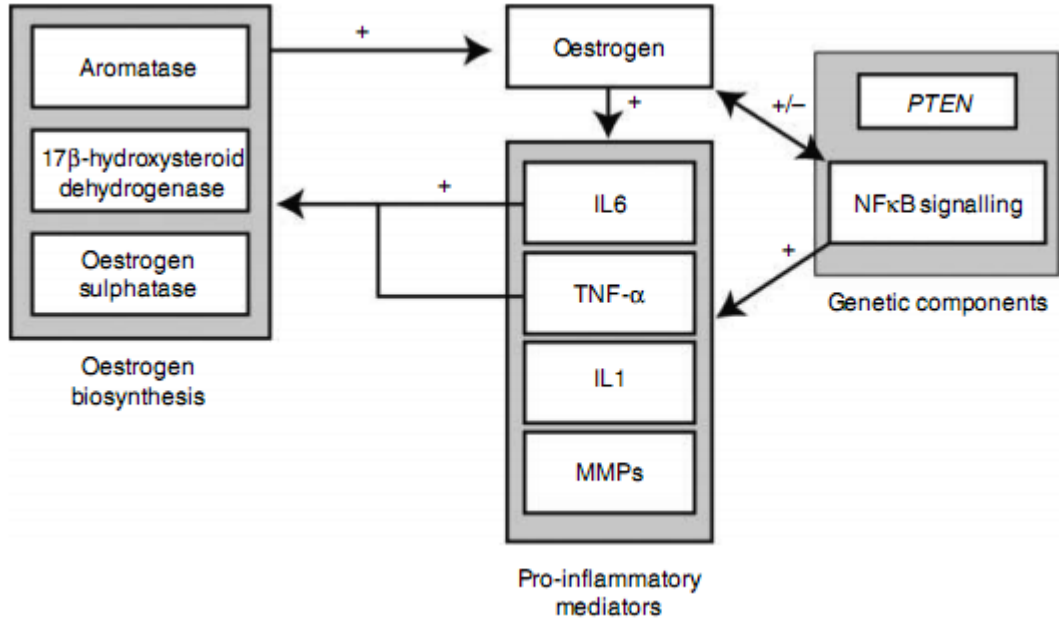
2.2. ENDOMETRİYUM KANSERİ

Endometriyal kanser (endometrial adenokarsinoma); uterusun serviks kısmını döşeyen endometrium tabakasından gelişen bir kanser çeşididir(3, 4). Günümüzde batılı ülkelerde kadınlarda ilk üç sırada görülen kanserlerin meme, akciğer ve kalın bağırsak kanserleri olmasına karşılık, endometriyum kanseri kadın genital kanserleri arasında ilk sırada bulunmaktadır(5) ve en yaygın görülen jinekolojik tümörlerden biridir(3, 6, 7).

1983' te Bokhman; endometriyal adenokarsinomanın östrojen etkisine bağlı olarak iki alt tipinin olduğunu göstermiştir(4,6,7,8,9,10,11). Tip I (endometrioid adenokarsinoma) kanser hücrelerinin çoğalması östrojene bağımlıdır ve bu hücreler östrojen ve progesteron reseptörleri içerirler(4,6,7,10). Bu tip kanser hücreleri yavaş yayılır, mikrosatellit kararsızlık mevcuttur ve KRAS (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), PTEN (phosphatase and tensin homolog) ya da β -catenin (Beta-catenin) genlerinde mutasyon vardır(6,9,10). Tip II (papillar seröz karsinoma) kanser hücreleri çoğunlukla anöploidtir, östrojen ve progesteron hormonu için reseptör içermez (6,10), CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), TP53 (tumor protein 53) ve ERBB2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2) genlerinde mutasyon mevcuttur(6,9).

Kadınlarda iki ana seks hormonu olan östrojen ve progesteron menopozdan önce over (yumurtalık)' larda üretilir. Bu hormonlar arasındaki dengeler her ay menstrüasyon siklusu boyunca değişiklik gösterir. Bu değişiklikler aylık menstrüasyon periyodlarının oluşumunu sağlar. Endometrial kanserle ilişkili en önemli risk faktörü östrojen

hormonuna çok fazla miktarda maruz kalma ile ilişkilidir. Hormonlar arasındaki dengenin östrojen lehine kayması endometriyal kanser gelişim riskini artırır (Şekil2-1).



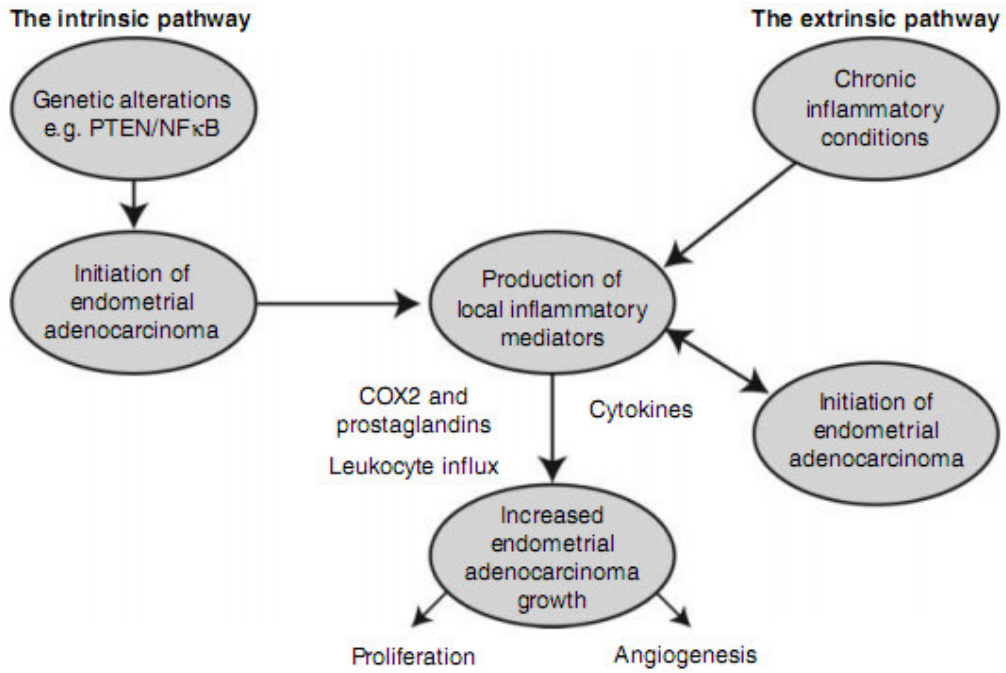
(12)

Şekil 2-1: Östrojen/ PTEN/NF-κB

Östrojen; IL-6, TNF-α gibi inflamator mediatörlerin üretimini stimüle etmektedir ve bu mediatörlerde östrojen biyosentezini indüklemektedir. Östrojen, NFκB sinyal yolu ile oluşan inflamasyon yanıtını indüklenmesini de sağlamaktadır(12).

PTEN; endometriyal adenokarsinomada en yaygın olarak mutasyona uğrayan tümör baskılayıcı bir gendir. Bu gen Akt sinyal yolunun inaktive olmasını sağlayan PIP₃'ün (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate) oluşumunu baskılamaktadır. PTEN, PIP₂'nin (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) PIP₃' e dönüşümünü engelleyen lipid fosfatazları kodlamaktadır. PTEN geni ve Akt sinyal yolu birbirleriyle etkileşim kurarak NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) sinyal yolunun kontrolünü sağlamaktadırlar. PTEN geninde meydana gelen mutasyon sonucu Akt sinyal yolu fosforile olmaktadır ve buna bağlı olarak NFκB sinyal yolunun aktivasyonu başlamaktadır (12) (Şekil 2-2) .

Endometriyal adenokarsinoma hücrelerinde; NFκB sinyal yolu hem PTEN genine bağlı olarak hem de östrojen hormonuna bağlı olarak aktive olmaktadır. NFκB sinyal yolunun aktivasyonunun dokuda tümör gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (12).



(12)

Şekil 2-2: PTEN/NF-κB

Ayrıca tip I adenokarsinom hücrelerinde meydana gelen β -catenin genindeki mutasyon sonucu uterustaki fonksiyon bozukluklarından dolayı infertilite oluşmaktadır (10).

2.3. HÜCRE VE DOKU KÜLTÜRÜ HAKKINDA GENEL BİLGİLER

2.3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Canlı organ ve dokulardaki hücrelerin izole edilerek laboratuvar koşullarında üretilme ve çoğaltılmalarına hücre kültürü adı verilir. Hücre kültürü çalışmalarının gelişimi ve yöntemleri, organ ve doku kültürü çalışmalarıyla yakından ilişkilidir ve onlarla benzer nitelikler taşımaktadır. Doku ve hücre kültürü çalışmaları yüz yılı aşkın bir süredir yapılmaktadır.

Hayvansal hücre kültürü teknikleri 1900'lerin ortalarında laboratuvarında rutin olarak uygulanmaya başlanmış (13); fakat asıl doku kaynaklarından ayrılan sürdürülebilir yaşayan hücre hatları kavramı 19. yüzyılda ortaya konmuştur. 19. yüzyılda İngiliz fizyolog Sydney Ringer sodyum, potasyum, kalsiyum ve magnezyumlu

klorürler içeren tuz çözeltilerinin, vücut dışında yaşayan bir hayvan kalbinin atışını sürdürebilmesi için uygun olduğunu deneysel olarak göstermiştir.

1885'de Wilhelm Roux bir tavuk embriyosu nöral plağının bir kısmını ayırmış ve ılık bir tuzlu su çözeltisinde dokuyu birkaç gün yaşatarak doku kültürünün temellerini de atmıştır.

Hücre kültürlerinin üretilme şekilleri;

1 – Tek tabaka hücre kültürleri: Kültüre edilen hücreler, flaskın yüzeyine yapışarak işlevlerine ve üremeye devam ederler. Bu sayede bir süre sonra tek tabaka halinde yüzeyi kaplarlar.

2 – Süspansiyon hücre kültürleri: Kültüre edilen hücreler, hayatsal işlev ve üremelerini süspansiyon halinde buldukları ortamda sürdürürler (14,15).

Kökenlerine göre hücre kültürü çeşitleri;

1 - Primer hücre kültürleri: Direkt olarak organ ve dokulardan alınan parçalardan hazırlanan hücre kültürleridir. Bunların yalnızca 1 veya 2 pasajları yapılabilir. Orijin doku ile aynı karyotipe sahiptirler.

2- Sekonder hücre kültürleri: Primer hücre kültürlerinde üreyen hücrelerin alınarak tekrar tripsin ile ayrıştırılması ve yeniden besleyici ortamlara konularak üretilmesiyle hazırlanırlar. Bu tür kültürlerin genellikle 40-50 defa pasajı yapılabilir. Hücre popülasyonunun yaklaşık % 75'i orijin hücrelerle aynı karyotipe sahiptir.

3 - Devamlı hücre kültürleri: Bu tür hücre kültürleri, pasajlar yapmak suretiyle sonsuza kadar devam ettirilebilen hücre kültürleridir. Normal dokudan hazırlanabileceği gibi genelde tümör dokusundan orijin alırlar. Bu tür kültürlerin hücreleri orijinal konağın fenotipik ve genotipik özelliklerinden farklılıklar gösterirler. Hücre popülasyonunun % 75'inden daha az kısmı orijin hücrelerle aynı karyotipe sahiptir. Hücreler transformasyona uğramış olup, kromozom sayısı ve niteliği değiştiği için anormal olarak kabul edilir (14,15).

Doku kültürü ve yöntemleri kullanılarak, hücre yapısı, fizyolojisi, patojen hücre ilişkileri, iyonlaştırıcı ışınların hücre düzeyinde incelenmesi ve çeşitli radyobiyolojik problemlere bağlı olarak tümör büyümesinin açıklığa kavuşturulmasına çalışılır. Hücre kültürlerinde, in vivo şartlarda mümkün olmayan, kısa zaman aralığında gerçekleştirilmesi istenen fiziksel ve kimyasal etkenler incelenebilir (14,15).

2.3.2. SFEROİD

Multiselüler tümör sferoid (MTS) modeli laboratuvar koşullarında tümörlerin üç boyutlu yapısını yansıtır. Tek tabakalı kültürde büyütülen hücrelerin kemoterapiye karşı oluşturdukları yanıt ile klinik gözlemler arasında birçok farklılık olduğu, tek tabakalı kültürde çok etkili bulunan ve belirgin antitümoral etkinliği saptanan bir ilacın ya da ilaç kombinasyonlarının klinikte bu derece etkili olmadığı saptanmıştır (16).

Üç boyutlu hücre kültürlerinin (sferoid) in vivo katı tümörlerin özelliklerini tam olarak yansıttığı düşünülmektedir (17).

Sferoid kültürleri hem üç boyutlu organizasyonu hem de intakt dokuların farklılaşmış fonksiyonlarını monolayer kültürlerden daha iyi yansıtır. Üç boyutlu kültürlerin diğer bir avantajı da her bir ayrıntının kolayca gözlemlendiği morfolojik şekle sahip olmalarıdır. Bu morfolojik şekiller, difüze eden makromolekülleri gözlemlemede ve çevresel şartları analiz etmede bize bir şans verir (18).

2.3.3. İMMÜNOHİSTOKİMYA

İmmunohistokimya, işaretlenmiş antikolar kullanılarak hücre ve dokuda antijenlerin bulunduğu yerlerin gösterilmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntem antijene karşı spesifik olarak antikor oluşması ve antijen ile antikorun birleşmesine dayanır. Bu özel bağlantıdan dokuda yer alan antijenlerin, bunlara özel antikolar üretilmesi ile immunohistokimyasal yöntemler geliştirilmiştir (19).

Organizmaya yabancı olan ve kendisine karşı bir bağışık cevap oluşturan maddeye antijen veya immunojen denir. Bir antijen doku üzerindeki protein, karbonhidrat veya lipid molekülü olabilir. Bir veya daha fazla antikor bağlayıcı bölge içerir (19).

Antikor immunoglobulin olarak bilinen serum proteindir. Humoral immun sistemde B lenfositlerinin farklılaşması ile oluşan plazma hücrelerinden salgılanan immunoglobulinler IgG, IgA, IgM, IgE ve IgD olmak üzere 5 tiptir. En sık kullanılan tip IgG'dir. Bu farklılık ağır zincirlerinin değişikliğinden kaynaklanır (19).

Antikolar poliklonal ve monoklonal olmak üzere iki tiptir. Poliklonal antikolar bir hayvanın ilgili protein molekülü ile immunize edilmesi sonucu oluşan antikolardır. Antijenik uyarımla beraber farklılaşan plazma hücre klonlarının oluşturduğu farklı

özelliğindeki antikorların tümüdür. Monoklonal antikorlarda ise geliştirilen hibridoma tekniği ile saf antikor üretilmesi amaçlanmış ve sağlanmıştır (19).

Antikorların işaretlenmesinde 4 yöntem;

a) Floresan bileşikle işaretleme:

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

b) Enzimle işaretleme:

- Peroksidaz
- Alkalen fosfataz
- Glukoz oksidaz

c) Elektron yoğun bileşikle işaretleme:

- Altın Partikülü
- Ferritin

d) Biotinle işaretleme:

Avidin'in biyotin'e çok yüksek affinitesinden yararlanır. Streptavidin peroksidaz en sık kullanılır (19).

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

Tek aşamalı yöntemde; antikor, floresan boya veya enzim ve altın tanecikleri gibi diğer işaretleyiciler ile işaretlenmiş olarak bulunur ve doğrudan kesitler üzerine uygulanır. İki aşamalı yöntemde öncelikle antijene özel birincil antikor kesit üzerine uygulanır. Böylece 1. aşamada, işaretlenmiş primer antikor antijene bağlanır. Daha sonra oluşan antijen-antikor kompleksinin görünür hale gelebilmesi için işaretlenmiş ikinci antikor uygulanır. İşaretleyici olarak biotin, hidrojen peroksidaz, alkalen fosfataz, glukoz oksidaz ve floresan işaretleyiciler kullanılabilir (19).

2.3.4. BrdU

5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU); bölünen hücrelerde timidin bazının üridin ile yer değiştirmesine dayalı olarak bölünen hücrelerle bölünmeyen hücreleri ayıran bir proliferasyon değerlendirme yöntemidir. DNA sentezini tayin etmek için timidin ile işaretleme protokolüne eşdeğerdir. S fazındaki hücrelerin oranı belirlenir. Anti- BrdU monoklonal antikoru ile boyanarak sayım yapılabilir veya ELİSA yöntemi ile ölçülebilir (20).

2.4. PROJEDE KULLANILAN İLAÇLAR

Kemoterapötik Ajanların Sınıflandırılması

Antikanser ilaçlar kimyasal yapılarına, hücre siklusuna etkilerine, orjinleri ve etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadır.

Hücre siklusuna etkiye göre sınıflama

Hücre siklusuna etkisine göre antikanser ilaçlar iki gruba ayrılmaktadırlar:

1) Siklusa spesifik ajanlar

a) Siklus spesifik-faz non spesifik ajanlar: Hücre siklusunda her fazdaki hücreye etkilidirler.

b) Siklus spesifik-faz spesifik ajanlar: Hücre siklusunun belli fazlarına etkilidirler.

2) Siklus-nonspesifik ajanlar

Bölünmeyen hücrelere etkilidirler. Steroid hormonlar ve bleomycin dışındaki antitümör antibiyotikler bu gruba girerler(21).

Orijinler ve etki mekanizmalarına göre sınıflama

Antitümör ilaçlar orjinleri ve etki mekanizmalarına göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılırlar:

1) Alkilleyici ajanlar

2) Antitümör antibiyotikler

3) Antimetabolitler

4) Mitotik ağ inhibitörleri (Bitki alkaloidleri)

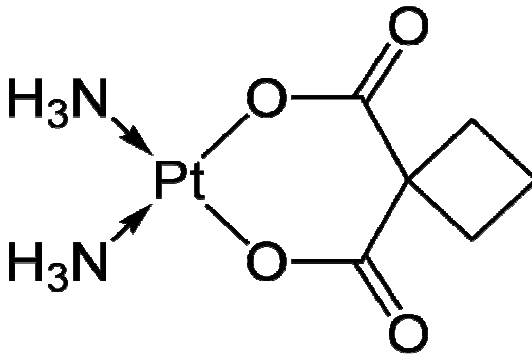
5) Sınıflandırılmayan ajanlar

Bu grupların dışında hormonal ajanlar, biyolojik cevabı modifiye eden ajanlar (BRM), monoklonal antikorlar ve gen tedavileri de kanser tedavisinde kullanılmaktadır (21).

Alkilleyici Ajanlar:

En sıklıkla DNA ve RNA nükleik asitleri ve proteinlerin aminokarboksil, sülfhidril, fosfat grupları yerine alkil gruplarını (CH₂+) transfer ederek hücre fonksiyonlarını bozarlar. DNA ve RNA'nın yedi pozisyonundaki guanine en sık alkilenen bölgedir. Anti kanser açısından en önemli etkileri DNA bütünlüğünü ve fonksiyonlarını bozmalarıdır. Guaninin alkilenmesi sonucu anormal nükleotid dizileri oluşur. Messenger RNA yanlış kodlanır. DNA sarmalında kırıklar oluşur. DNA sarmalları arasında, proteinlerle ve alkilleyici ajanlarla çapraz bağlanmalar ortaya çıkar. Bu grupta yer alan ilaçlar kemik iliği hücreleri ve germ hücreleri gibi hızla çoğalan hücelere toksiktirler. Ortak yan etkileri myelosüpresyon, sterilite, sekonder lökomogen etkidir. Akut myeloid lösemi riski, uygulama süresi ve kümülatif dozla orantılı olarak artmaktadır. Bu grupta; nitrogen mustard, siklofosfamid, ifosfamid, etilen iminler, sülfonik asit esterleri, nitrozürealar, platin bileşikleri, halojenli heksitoller yer almaktadır (21).

KARBOPLATİN:



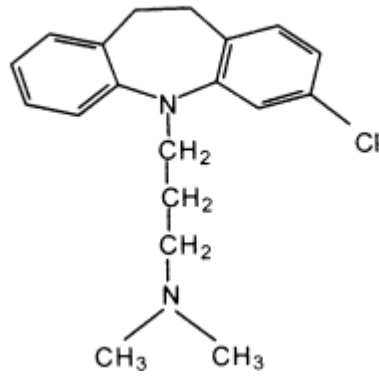
Karboplatin (CAR; cis-diamin-1,1-siklobütan dikarboksilat platinyumII), molekül ağırlığı 371.249 g/mol' dür ve molekül formülü C₆H₁₄N₂O₄Pt' dir. Cis-diaminodikloroplatinyum (CDDP) analogu olan karboplatin, ovaryum kanseri, endometriyal karsinom gibi çeşitli tümörlerin tedavisinde kullanılan platinyum içeren

ikinci nesil antineoplastik alkilleyici bir ajandır (22,23,24,25,26,27). Karboplatin, jinekolojik tümörlerde de yaygın olarak kullanılmaktadır (25).

Karboplatin, siklobütanedikarboksilat kısmının ayrılmasından ve bunu takiben molekülün su almasından sonra DNA ile etkileşir. Filamentler arası çapraz bağlantı oluşturur. Karboplatinin damar içine uygulanmasından sonra, bozulmamış ilacın plazma düzeyleri bifazik tarzda inişe geçer. Başlangıç yarı ömrü 1-2 saattir ve terminal yarı ömrü ($t_{1/2P}$) 3-6 saattir. Karboplatinin nefrotoksisite ve ototoksisite potansiyeli düşüktür (22,23,27,28,29). Ancak, aminoglikozidlerle ve diğer nefrotoksik ve ototoksik ajanlarla birlikte kullanımı böbrek ve işitme ile ilgili toksisite riskini arttırabilir. Kan hücrelerinden özellikle trombositlerin düzeyini düşürmektedir (29).

Karboplatinin, platinyum içeriğinden dolayı bugüne kadar üzerinde çalışılan tümör tiplerinde; DNA hasarına yol açarak tümör hücrelerinin bölünmesini, büyümesini ve çoğalmasını engellediği ve böylece tümör hücrelerinin vücuttaki gelişimlerini ve yayılmasını yavaşlattığı gösterilmiştir(22,25,26). Ayrıca karboplatinin; NRF2, NF-kB, sitokin, TNFR2 ve bağışıklık yanıt yolları olan IL-6, IL-8 yollarında yüksek oranda induksiyona neden olduğu gösterilmiştir(30).

KLORİMİPRAMİN (ANAFRANİL) :



Klorimipramin; 5-hidroksitriptaminin (serotonin) ve nöradrenalinin alınımını engelleyen trisiklik bir antidepresandır(31,32,33). Klorimipramin' in molekül formülü $C_{19}H_{23}ClN_2$ ' dir ve molekül ağırlığı 314.9 Dalton'dur. Yarılanma ömrü yaklaşık 35 saattir. Klorimipramin, Obsesif-Kompulsif hastalık tedavisinde sıklıkla kullanılır. Klorimipramin diğer trisiklik antidepresanlardan daha fazla nöbet geçirme insidansı gibi

dezavantaja sahiptir. Bazı çalışmalar depresyon tedavisinde diğer trisikliklerden daha etkili olduğunu göstermektedir.

Klorimipramin kan-beyin bariyerini geçer ve beyinde uzun süre kalır (34). Bu ilaç seçici olarak normal hücreleri etkilemeden neoplastik hücrelerde mitokondri membran potansiyelinde azalmaya neden olmaktadır ve solunum zincirindeki mitokondriyal kompleks III' ü inhibe etmektedir, Sonuç olarak sitokrom c' nin serbest kalması ve stoplazmaya geçmesi, kaspaz 3 aktivasyonuna sebep olarak hücreleri apoptoza götüren zincirleme reaksiyonları başlatmaktadır (31,32,33).

Böylece trisiklik bileşikler solunumu inhibe ederek ve ATP üretimini sınırlayarak özellikle mitokondrideki membranlar üzerine etkilidirler (34).

Klorimipramin 30 yılın üzerinde klinik kullanımda olan obsesyon tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Farmakolojik ajanların dibenzizapin grubunda olup, güçlü hipofilik antidepresan olarak bilinir(34). Klorimipramin' in var olan kanser ilaçları üzerine etkisi vardır ve hem normal hücrelerde hem de neoplastik hücrelerde fark etmeksizin geri dönüşümsüz DNA hasarına neden olur (34).

Klorimipramin gastrointestinal yolla iyi emilir, farmakolojik olarak aktif ve hem teröpatik hem de istenmeyen etkilerinin yer aldığı önemli bir ilk geçiş metabolizması ile desmetil klorimipramine dönüştürülür. Sistemik dolaşıma ulaştıktan sonra klorimipramin biotransforme olarak desmetil klorimipramine dönüşür ve idrarla atılmadan önce konjuge olan metabolitlere hidroksillenir (35).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

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

3.1. KULLANILAN MADDELER

3.1.1. Kimyasal Maddeler

NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NKH₂PO₄, KCl, NaHCO₃

3.1.2. Enzimler

Tripsin (Gibco)

3.1.3. İlaçlar

Karboplatin

Klorimipramin

3.1.4. Kitler

BrdU, Ultra V block

NCL-BrdU Mouse Monoclonal

Ultra Vision Detection System Anti- Mouse HRP

Large Volume AEC Substrate System, Ultramount

3.1.5. Diğer maddeler

Fötal Sığır Serumu

RPMI-16

3.2. KULLANILAN GEREÇLER

- | | |
|-------------------------------------|-----------------|
| 1. Laminar Akım Hücre Kültür Kabini | (Tezsan) |
| 2. İnkübatör | (Sanyo) |
| 3. Ters (İnvert) mikroskop | (Leitz Wetzlar) |
| 4. Su banyosu | (Nüve) |
| 5. Santrifüj | (Sigma 2-16K) |
| 6. Derin dondurucu | (Arçelik) |
| 7. Buzdolabı | (Bosch) |
| 8. Manyetik karıştırıcı | (Rühromag) |
| 9. Pipetleme aracı | |
| 10. Mikropipet seti | |
| 11. Derin dondurucu | (Arçelik) |
| 12. Buzdolabı | (Bosch) |
| 13. Hassas terazi | |

3.3. KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.3.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler

CMF-PBS

8 gr NaCl

0.25 gr KCl

0.25 gr KH₂PO₄

1.44 gr Na₂HPO₄ tartılarak 1 lt bidistile su içine konarak karıştırıldı.

Otoklavda 121 °C, 3 Atm basınçta 15 dk steril edildi.

NaHCO₃

8.8 gr NaHCO₃ tartılarak 200 ml bidistile su içerisine kondu ve karıştırıldı.

Otoklavda 121°C, 3Atm basınçta 15 dk steril edildi.

TRİPSİN

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

AGAR

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

3.3.2. İmmünohistokimya da Kullanılan özeltiler

PBS

Hazır PBS tablet kullanıldı.

H₂O₂

1,5 ml H₂O₂; 98,5 ml metonole konu.

Solüsyon taze hazırlandı.

HCl

12,08 ml HCl; 87,92 ml distile suya konu.

Solüsyon taze hazırlandı.

NaOH

1 gr NaOH 100 ml distile suda çözündürüldü.

TRİPSİN

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

3.4. KULLANILAN YÖNTEMLER

3.4.1. Hücre Kültürü

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

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

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

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

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

3.4.2. Doz Belirleme Deneyi

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

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

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

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

Karboplatin ve Klorimipramin'in herbiri için final konsantrasyonu 1; 10; 100; 200 μM konsantrasyonlarını sağlayacak şekilde yoğun olarak hazırlanmış çözeltileri 100 μl eşit hacimlerde içerisinde hücrelerin bulunduğu kuyucuklara verildi. Hücreler bütün deney maddeleriyle 24, 48 ve 72 saat sürelerle 37°C ve %5 CO_2 ortamında kültür inkübatöründe kültüre edildiler. Bu inkübasyon sürelerinin sonunda kuyucukların üst medyumları alınarak 3 dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi ve ilaç etkileşimi sonucu inkübasyon medyumuna çıkması mümkün olan hücreler üst medyumdan ayrıldı. Diğer taraftan kuyucuklardaki hücreler üzerine %0,3'lük tripsin solüsyonu eklenerek hücreler zeminden ve birbirlerinden ayrıştırılarak santrifüj edilip tripsin uzaklaştırıldı ve diğer hücrelerle aynı tüpte toplanan hücreler 2ml medyum ile tek hücre süspansiyonu haline getirildi.

Hücreler sayma kamarasında sayılarak toplam hücre sayıları kaydedildi. Her ilaç için etkin olan inhibisyon dozu50 (ID_{50}) değeri belirlendi.

3.4.3. Proliferasyon (Tutunma) Deneyi

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

1. Kontrol
2. Karboplatin =200 μM
3. Klorimipramin=50 μM
4. Karboplatin + Klorimipramin

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

Doz ve zaman grafikleri çizildi ve değerlendirildi.

3.4.4. İki Boyutlu Hücre Kültürlerinde BrdU İşaretleme İndeksi İmmünohistokimya Tekniği

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

Hücre ekiminden 24 saat sonra iki boyutlu hücre kültürlerinde kullanıldığı gibi Karboplatin'in 200 μ M, Klorimipramin'in 50 μ M dozu her kuyucuğa 100 μ l olacak şekilde uygulandı ve 24 saat süreyle 37 °C de %5'lik CO₂ hava karışımında, %95 nemli ortamda inkübe edildi.

İnkübasyon süresinin sonuncu saatinde her kuyucuğa daha önce hazırlanmış taze BrdU solüsyonundan 20 μ M final konsantrasyonu sağlayacak şekilde 100'er μ l verildi ve 1 saat süreyle 37 °C de %5'lik CO₂ hava karışımında, nemli ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda lameller PBS ile yıkandı ve her kuyucuğa % 70 etanol eklenip -20°C 'de 1 saat bekletildi. % 70 etanol uygulamasının sonrasında sırasıyla şu protokol izlendi;

- Kuyucuklar PBS ile 30 dakika hidrate edildi,
- % 0.5' lik H₂O₂ ile karanlıkta 20 dakika süre ile bekletildi,
- PBS ile kısa süre yıkandı,
- 5 dakika distile suda bekletildi,
- 4 N HCl ile 37 °C de 30 dakika bekletildi,
- Distile suda kısa süre yıkandı,
- PBS ile 5' er dakika 2 kez bekletildi,
- Non spesifik blok solüsyonu ile 20 dakika bekletildi,
- Primer antikor ile 1 gece +4 °C de bekletildi,
- Distile suda kısa süre yıkandı,
- PBS ile 5'er dakika 2 kez yıkandı,

- Sekonder anikor ile 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi,
 - Distile suda kısa süreli yıkandı,
 - PBS ile 5'er dakika 2 kez yıkandı,
 - Streptavidin Peroksidaz ile oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi,
 - Distile suda kısa süreli yıkandı,
 - Kromojen solüsyonu oda sıcaklığında, karanlıkta, 11 dakika uygulandı,
 - Distile suda kısa süreli yıkandı,
 - Mayer hematoksilen ile 7 dakika bekletildi,
 - 3 kez çeşme suyu ile yıkandıktan sonra 15 dakika çeşme suyunda bekletildi,
 - Distile su ile yıkayıp lameller lam üzerine alındı,
 - Kapatıcı (Ultramount) kullanılarak lamalar, lamel ile kapatıldı.
- Işık mikroskobunda sayım yapılarak işaretlenme oranları belirlendi.

3.4.5. Üç boyutlu (Sferoid) Hücre Kültürü

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

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

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

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

Sferoidler medyumları ile birlikte 15 ml'lik santrifüj tübüne aktarıldı, 3-5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilip, medyum uzaklaştırıldıktan sonra PBS'de 5 dakika bekletildi ve % 2.5'lük gluteraldehidde 1 saat 4°C'de bekletilerek tespit edildi. PBS ile 2 defa yıkandıktan sonra, 1000 rpm'de 3-5 dakika santrifüj edilip, PBS uzaklaştırıldı, ve % 1'lik osmium tetroksit ile 1 saat 4 °C'de bekletilerek ikinci tespit işlemi yapıldı. OsO₄ uzaklaştırıldıktan sonra, sferoidler PBS'de 10 dakika bekletildi ve % 1 uranil asetatda 4°C'de 30 dakika bekletilerek üçüncü tespit işlemi yapıldı.

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

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

3.4.5.2. Üç Boyutlu Hücre Kültürlerinde BrdU İşaretlenme İndeksi İmmünohistokimya Tekniği

Steril bidistile suda hazırlanmış 60 °C' ye kadar soğutulmuş % 3' lük Agar solüsyonu ve 40°C' ye kadar ısıtılmış medyum 1/1 oranında karıştırılarak hazırlandı ve

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

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

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

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

- Bu sürenin sonunda sferoidler 1000 devirde 3 dakika santrifüj edilerek toplandı,
- % 10 luk formaldehit ile tespit edildi,

-PBS ile yıkandıktan sonra yine PBS içinde 1 ml'lik Ependorf tüplerine alınıp, 1000 rpm'de 3-5 dakika santrifüj edildi.

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

- Sferoid topluluğu ependorflardan çıkarıldı ve iğne ile tutturuldu,
- Tüm sferoid grupları yükselen alkol serilerinden geçirilerek (%70, %90,%96, %100, %100, toluol) dehidrate edilip, parafine gömüldü,
- 10 µm kalınlığında kesitler alındı ve 1 gece 65 °C de etüvde bekletildi,
- Kesitler inen alkol serisi (Toluol, %100, %100, %96, %90, %70) ile hidrate edildi,
- Distile suda 5 dakika bekletildikten sonra, %0,5'lik H₂O₂ 'de karanlıkta 20 dakika bekletildi,
- 3 kez distile suda yıkandıktan sonra, %1'lik tripsinde 37°C'de bekletildi,

- Distile suda 5dk 37°C'de bekletildikten sonra, 4 N HCl ile 37 °C de 30 dakika bekletildi,
- PBS ile 5' er dakika 2 kez bekletildikten sonra, Non spesifik blok solüsyonu ile 20 dakika bekletildi,
- Primer antikor ile 1 gece +4 °C de bekletildi,
- PBS ile 5'er dakika 2 kez yıkandı,
- Sekonder antikor ile 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi,
- PBS ile 5'er dakika 2 kez yıkandı,
- Streptavidin Peroksidaz ile oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi,
- Kromojen solüsyonu oda sıcaklığında, karanlıkta, 11 dakika uygulandı,
- Mayer hematoksilen ile 7 dakika bekletildi,
- 3 kez çeşme suyu ile yıkandıktan sonra 15 dakika çeşme suyunda bekletildi,
- Distile su ile yıkanıp lameller lam üzerine alındı,
- Kapatıcı (Ultramount) kullanılarak lamlar, lamel ile kapatıldı.

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

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

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

Deneylerde % 100 canlı tek hücre süspansiyonundan 5×10^5 ishikawa insan endometrium hücresi bütün zaman aralıkları (24, 48 ve 72 saatler) için 5'er ml RPMI-1640 medyumunu içeren 3'er kuyucuğa ekildi ve inkübatör ortamında tutuldu. Proliferasyon deneylerindeki her bir grup, ilaç konsantrasyonu ve zaman aralığı (24, 48 ve 72 saat) aynı kalarak deneyler gerçekleştirildi. Bu inkübasyon sürelerinin sonunda hücreler toplanıp, PBS ile iki defa yıkandı ve apoptoz kitinde bulunan bağlama tamponu (0.01 M HEPES, 0.14 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) eklenerek süspansiyon haline getirildi. Bağlama solüsyonu içindeki hücre süspansiyonuna (100 µl bağlama solüsyonu

içinde 1×10^6 hücre) 5 µl FITC-etiketli Anneksin V ve vital boya olan propidyum iodid (PI) eklenerek oda ısısında karanlıkta 15 dakika bekletildi. Sonra Anneksin-V-FITC ve PI ile verdiği floresans akım sitometre cihazı ile ölçüldü. Sonuçlar CellQuest ve WinMDI analiz programları ile değerlendirildi ve kontrol grubuna göre ilaçların ölü, canlı ve apoptotik hücre oranları üzerine etkileri saptandı.

3.5. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

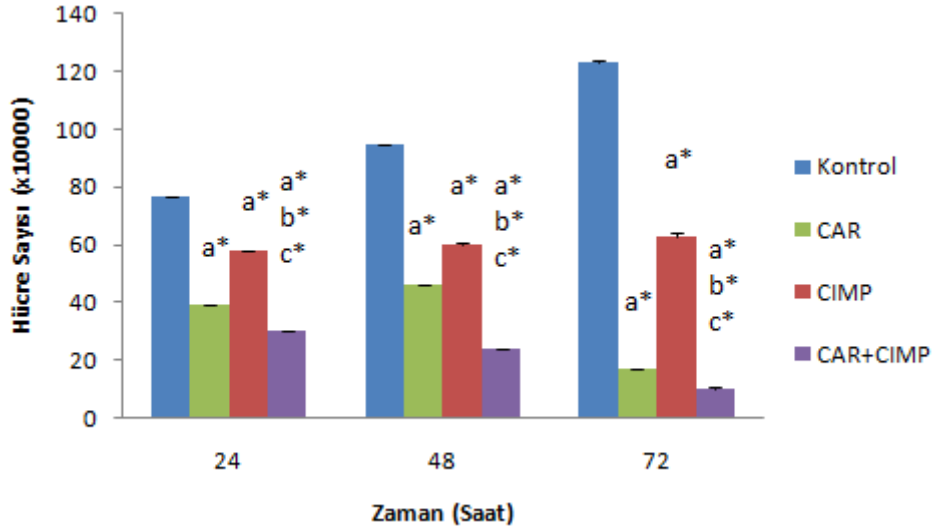
Yapılan deneylerden elde edilen verileri değerlendirmede SPSS 17,0 istatistik programı kullanıldı. Gruplar arası farkın anlamlılığını değerlendirmede Student t-testi kullanıldı. Anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Sonuçlar ortalama +/- SEM olarak gösterilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. TUTUNMA (PLATING) VERİLERİ

Tablo 4-1: İshikawa Endometrial Epiteli Hücre Kültürlerinde CAR, CIMP ve CAR+CIMP Kombinasyonlarının Hücre Sayısı Üzerindeki Zamana Bağlı Etkileri

X 10 ⁴	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
Kontrol	77 ± 1	95 ± 1	123 ± 1
CAR	39 ± 0,3	46 ± 0,6	17 ± 0,6
CIMP	58 ± 0	60 ± 0	63 ± 0
CAR+CIMP	30 ± 0,3	24 ± 0,3	10 ± 0,5



Şekil 4-1. Zamana Bağlı Hücre Çoğalma Verileri

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

* p<0.01, ** p<0.05

- 1) Endometrium epiteli İshikawa tümör hücreleri 24. ve 72. saatler arasında ilaç verilmeden kontrol grubunu oluşturacak şekilde inkübe edildi. Bu zaman dilimi boyunca kontrol grubunu oluşturan hücre sayısındaki artışın, beklenildiği gibi sağlıklı ve katlanarak oluştuğu gözlemlendi. (Şekil 4.1.)

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

Kontrol grubuna göre; 24. saatte ($p<0.01$), 48. saatte ($p<0.01$), 72. saatte ($p<0.01$) istatistiksel olarak anlamlı bir hücre tutunma inhibisyonu gözlemlendi (Tablo 4.1., Şekil 4.1.)

- 3) Klorimipramin (CIMP) grubu incelendiğinde; hücrelerin sayısında 24. ve 72. saatler arasındaki zaman dilimleri boyunca kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde azalmanın olduğu saptandı.

Kontrol grubuna göre; 24. saatte ($p<0.01$), 48. saatte ($p<0.01$), 72. saatte ($p<0.01$) istatistiksel olarak anlamlı bir hücre tutunma inhibisyonu gözlemlendi (Tablo 4.1., Şekil 4.1.).

- 4) Kombinasyon grubu (CAR+CIMP) incelendiğinde; hücre sayısında, 24. ve 72. saatler arasındaki süreç boyunca kontrol grubuna, CAR grubuna ve CIMP grubuna oranla anlamlı bir azalmanın olduğu saptandı (Tablo 4.1., Şekil 4.1.).

Kontrol grubuna göre; 24. saatte ($p<0.01$), 48. saatte ($p<0.01$), 72. saatte ($p<0.01$) istatistiksel olarak anlamlı bir hücre tutunma inhibisyonu gözlemlendi.

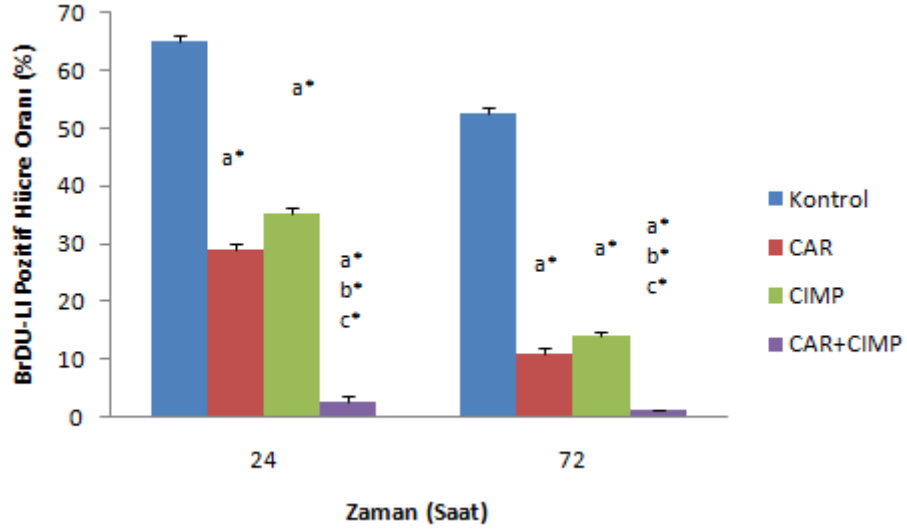
CAR grubuna göre; 24. saatte ($p<0.01$), 48. saatte ($p<0.01$), 72. saatte ($p<0.01$) istatistiksel olarak anlamlı bir hücre tutunma inhibisyonu gözlemlendi.

CIMP grubuna göre; 24. saatte ($p<0.01$), 48. saatte ($p<0.01$), 72. saatte ($p<0.01$) istatistiksel olarak anlamlı bir hücre tutunma inhibisyonu gözlemlendi (Tablo 4.1., Şekil 4.1.).

4.2. TEK TABAKALI HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE BrdU İŞARETLENME İNDEKSİ (BrdU-LI)

Tablo 4-2: İshikawa Endometrial Epiteli Hücre Kültürlerinde CAR, CIMP ve CAR+CIMP Kombinasyonlarının Sentez Fazındaki Hücelere Etkileri

% X	24 SAAT	72 SAAT
Kontrol	65 ± 1	53 ± 1
CAR	29 ± 1	11 ± 1
CIMP	35 ± 1	24 ± 1
CAR + CIMP	3 ± 1	1 ± 0



Şekil 4-2. Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU-LI

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

* p<0.01, ** p<0.05

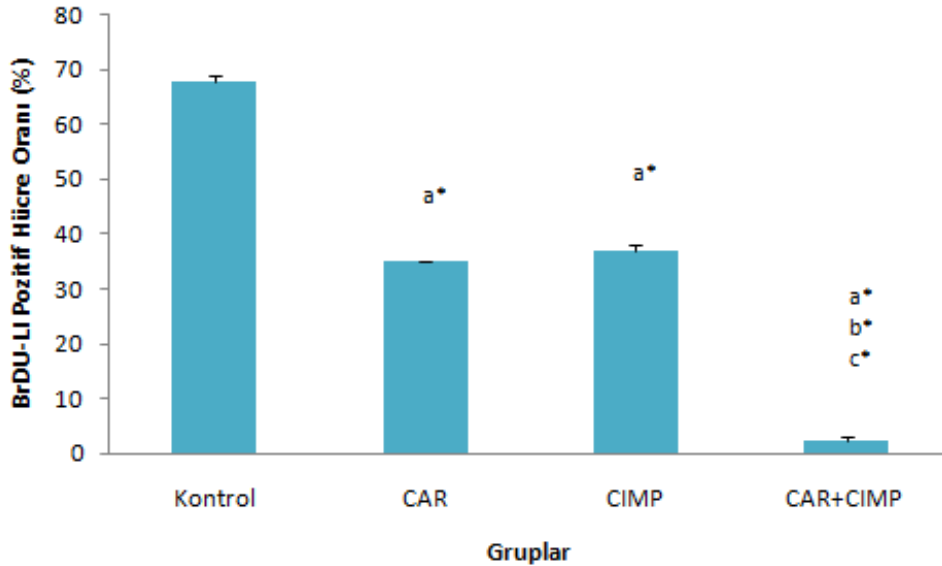
- 1) Kontrol grubundaki hücreler incelendiğinde; 24. saatte % 65 oranında işaretlenme görüldü. 72. saatte ise bu oran % 53 civarlarındaydı (Tablo 4.2., Şekil 4.2.)
- 2) CAR grubundaki işaretlenme oranı 24. saatte % 29, 72. saatte ise %11 oranında izlendi. Her iki zaman dilimide kontrol grubu ile karşılaştırıldığında karboplatinin istatistiksel olarak anlamlı (24. saat p<0,01; 72. saat p< 0,01) sentez fazı inhibisyonu yarattığı saptandı(Tablo 4.2., Şekil 4.2.).
- 3) CIMP grubundaki işaretlenme oranı 24. saatte %35, 72. saatte % 14 oranında görüldü. Her iki zaman dilimide kontrol grubuna oranla incelendiğinde klorimipraminin hücreler üzerinde anlamlı (24. saat p<0,01; 72. saat p<0,01) bir sentez fazı inhibisyonu yarattığı görüldü(Tablo 4.2., Şekil 4.2.).
- 4) Kombinasyon (CAR + CIMP) grubu incelendiğinde 24. saatte % 3, 72. saatte % 1 oranında işaretlenme saptandı (Tablo 4.2., Şekil 4.2.). Her iki zaman dilimide incelendiğinde;

- Kontrol grubuna oranla kombinasyon grubunun hücreler üzerinde anlamlı (24. saat $p<0,01$; 72. saat $p<0,01$) bir sentez fazı inhibisyonu yarattığı gözlemlendi.
- CAR grubuna oranla kombinasyon grubunun hücrelerin sentez fazındaki inhibisyon oranının anlamlı (24. saat $p<0,01$; 72. saat $p<0,01$) bir şekilde arttırdığı saptandı.
- CIMP grubuna oranla kombinasyon grubunun hücrelerin sentez fazındaki inhibisyon oranını anlamlı (24. saat $p<0,01$; 72. saat $p<0,01$) bir şekilde arttırdığı saptandı.

4.3. ÜÇ TABAKALI (SFEROİD) HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE BrDU-LI

Tablo 4-3: İshikawa Endometrial Epiteli Üç Boyutlu (Sferoid) Hücre Kültürlerinde CAR, CIMP ve CAR+CIMP Kombinasyonlarının Sentez Fazındaki Hücelere Etkileri

% X	24. SAAT
Kontrol	68 ± 1
CAR	35 ± 0
CIMP	37 ± 1
CAR + CIMP	3 ± 0,6



Şekil 4-3. Üç tabakalı (Sferoid) Hücre Kültürlerinde BrDU-LI

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

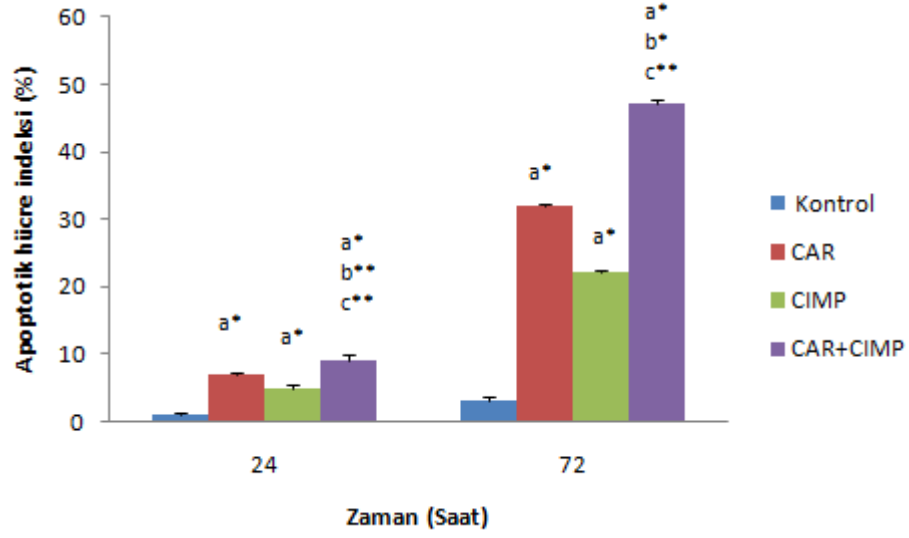
* $p<0.01$, ** $p<0.05$

- 1) Kontrol grubundaki hücrelerin 24. saatteki işaretlenme oranları % 68 civarında saptandı (Tablo 4.3., Şekil 4.3.).
- 2) CAR grubundaki işaretlenme oranı 24. saatte % 35 civarındadır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sentez fazındaki hücrelerin inhibisyonunun anlamlı ($p < 0,01$) bir şekilde arttığı gözlemlendi (Tablo 4.3., Şekil 4.3.).
- 3) CIMP grubundaki işaretlenme oranının 24. saatte %37 civarında olduğu izlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sentez fazındaki hücrelerin inhibisyonunun anlamlı ($p < 0,01$) bir şekilde arttığı gözlemlendi (Tablo 4.3., Şekil 4.3.).
- 4) Kombinasyon grubu (CAR + CIMP) incelendiğinde ise hücrelerdeki işaretlenme oranının % 3 civarına düştüğü saptandı (Tablo 4.3., Şekil 4.3.).
 - Kontrol grubuna oranla kombinasyon grubunun hücreler üzerinde anlamlı (24. saat $p < 0,01$) bir sentez fazı inhibisyonu yarattığı gözlemlendi.
 - CAR grubuna oranla kombinasyon grubunun hücrelerin sentez fazındaki inhibisyon oranının anlamlı (24. saat $p < 0,01$) bir şekilde arttırdığı saptandı.
 - CIMP grubuna oranla kombinasyon grubunun hücrelerin sentez fazındaki inhibisyon oranını anlamlı (24. saat $p < 0,01$) bir şekilde arttırdığı saptandı.

4.4. AKIM SİTOMETRİK ANNEKSİN-V-FITC/PI BOYAMASI İLE İLAÇLARIN PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜNE ETKİLERİ

Tablo 4-4: İlaçların Hücreler Üzerindeki İstatistiksel Apoptoz Verileri

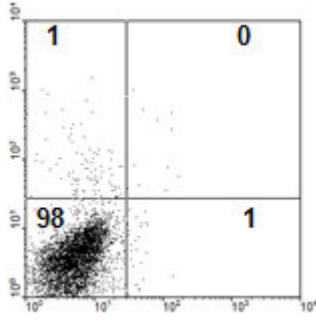
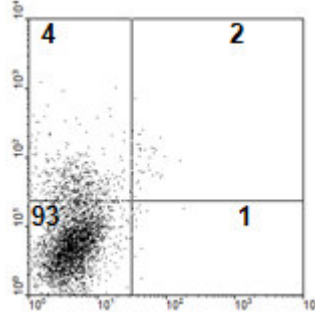
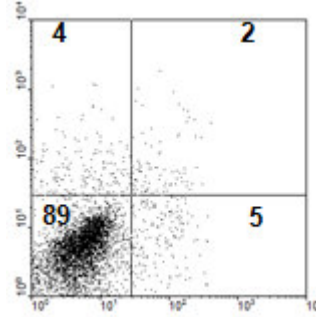
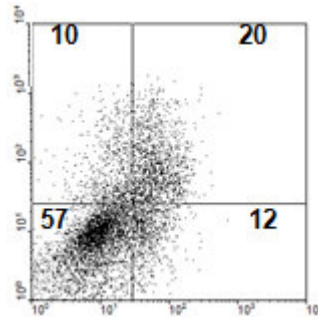
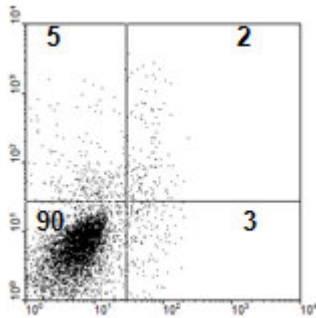
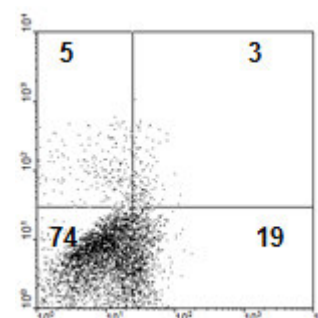
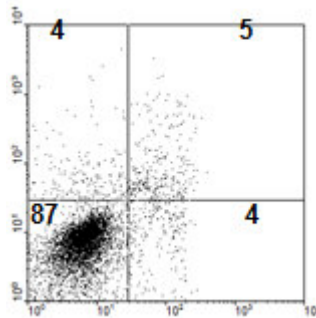
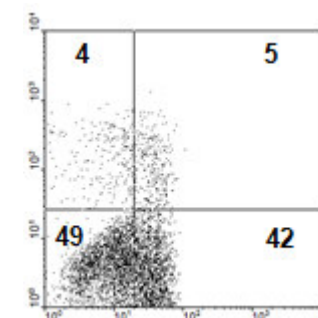
% X	24 SAAT	72 SAAT
Kontrol	1 ± 0	3 ± 1
CAR	7 ± 0	32 ± 1
CIMP	5 ± 0	22 ± 1
CAR + CIMP	9 ± 1	46 ± 1



Şekil 4-4. İlaçların Hücreler Üzerindeki Apoptoz Etkiletinin Verileri

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

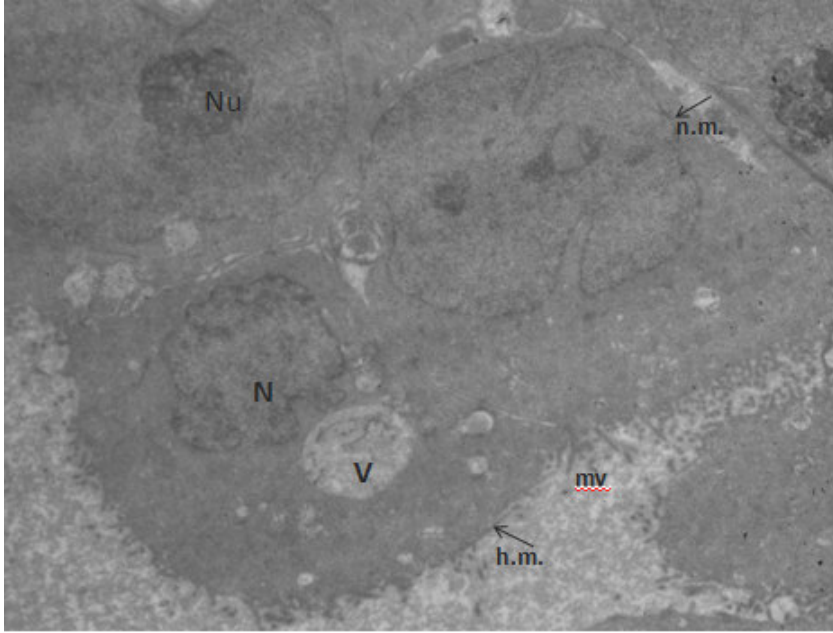
* p<0.01, ** p<0.05, *** p>0.05

Kontrol 24 Saat**Kontrol 72 Saat****CAR 24 Saat****CAR 72 Saat****CIMP 24 Saat****CIMP 72 Saat****CAR + CIMP 24 Saat****CAR + CIMP 72 Saat**

Akım sitometrik analiz ile tüm gruplarda; hücrelerin programlı hücre ölümüne gitme sürecinde elde edilen ham veriler.

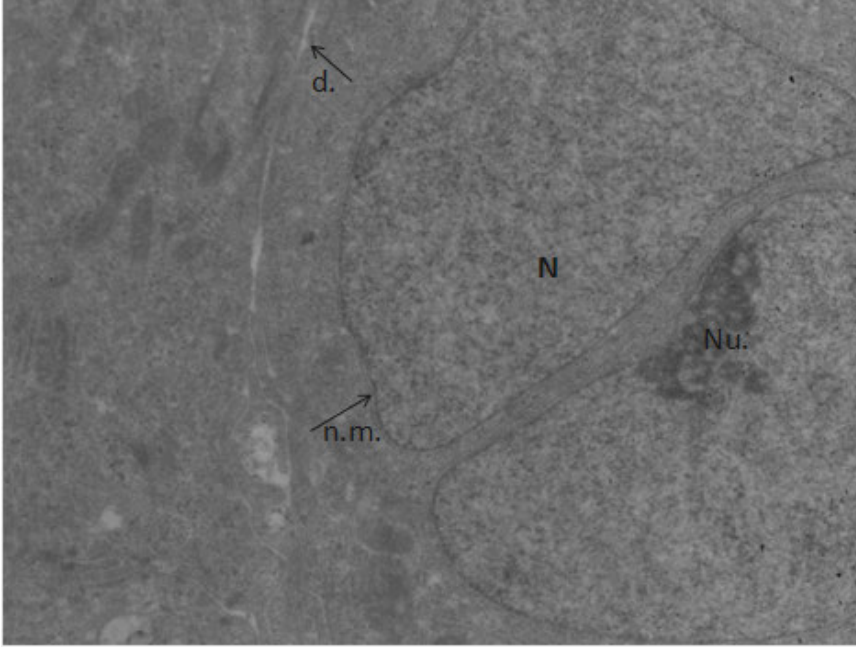
- 1) Kontrol grubunda 24. saatte apoptoza giden hücre oranı % 1 civarında iken bu oran 72. saatte % 3 olarak gözlemlendi (Tablo 4.4., Şekil 4.4.).
- 2) CAR grubu incelendiğinde; 24. saatte % 7 olan apoptoz oranı 72. saatte % 32 olarak izlendi.
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki zaman diliminde anlamlı bir şekilde (24. saatte $p<0,01$; 72. saatte $p<0,01$) apoptoza giden hücre sayısını arttığı saptandı (Tablo 4.4., Şekil 4.4.).
- 3) CIMP grubunda 24. saatte % 5 olan apoptoz oranı 72. saatte % 22 ye çıkmıştır.
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki zaman diliminde apoptoz oranında anlamlı (24. saatte $p<0,01$; 72. saatte $p<0,01$) bir artış saptandı (Tablo 4.4., Şekil 4.4.).
- 4) Kombinasyon (CAR + CIMP) grubunda ise 24. Saatte % 9 olan apoptoz oranı 72. Saatte % 46' ya çıktığı görüldü (Tablo 4.4., Şekil 4.4.).
 - Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki zaman diliminde apoptoz oranında anlamlı (24. saatte $p<0,05$; 72. saatte $p<0,05$) bir artış olduğu izlendi.
 - CAR grubu ile karşılaştırıldığında 24. saatte elde edilen apoptoz oranında anlamlı ($p>0,05$; $p=0,07$) bir veri kaydedilmedi. Ancak 72. Saatte elde edilen apoptoz değerlerinde anlamlı ($p<0,01$) bir artış saptandı.
 - CIMP grubu ile karşılaştırıldığında ise her iki zaman diliminin sonunda anlamlı (24. saatte $p<0,05$; 72. saatte $p<0,01$) bir artışın olduğu görüldü.

4.5. İLAÇLARIN GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOBU İLE ÜÇ BOYUTLU ISHIKAWA HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE HÜCRELERİN İNCE YAPISI (ULTRASÜKRÜKTÜRÜ) ÜZERİNE ETKİSİ



Şekil 4-5: TEM Kontrol Grubu

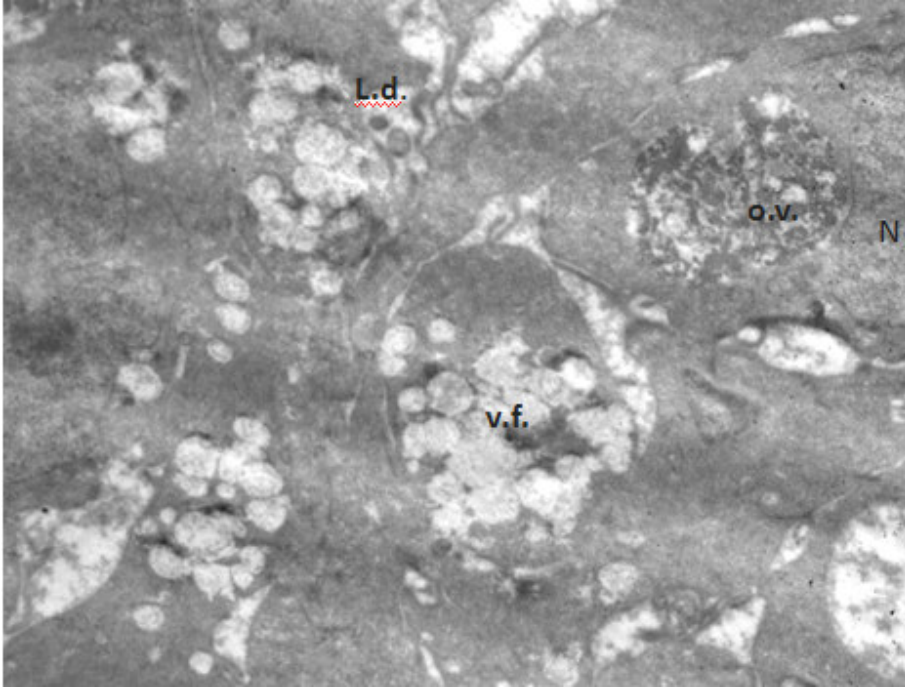
%100 canlı 1×10^6 ishikawa hücrelerinden oluşturulan sferoidlerden çekilen kontrol grubu fotoğrafında; hücreler arası bağlantıların düzgün, hücre membranı (h.m.) ve nükleus membran (n.m.) yapısının intakt olduğu, mikrovillusların (m.v.) düzgün yapıda bulunduğu ve hücrelerin normal morfoloji gösterdikleri gözlemlendi. (N: nükleus, Nu: nükleolus) (X 6000)



Şekil 4-6: TEM Kontrol Grubu

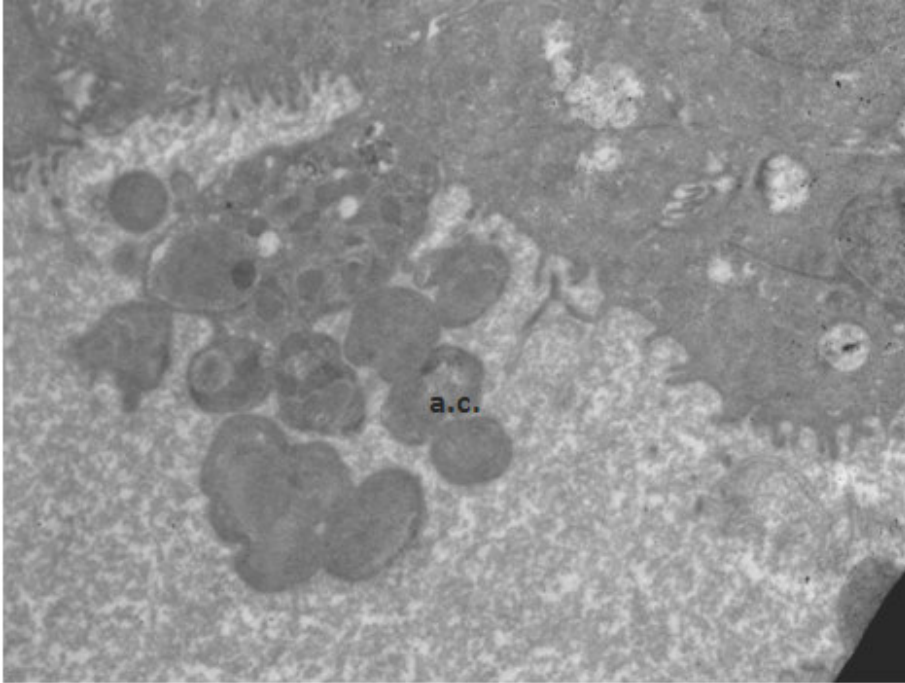
%100 canlı 1×10^6 ishikawa hücrelerinden oluşturulan sferoidlerden çekilen kontrol grubu fotoğrafında; hücre membranı ve nükleus membranının (n.m.) bütünlüğünü koruduğu ve hücrelerin düzgün morfoloji gösterdiği izlendi. (N:nükleus, Nu: nükleolus, d:dezmozom)

(X 15k)



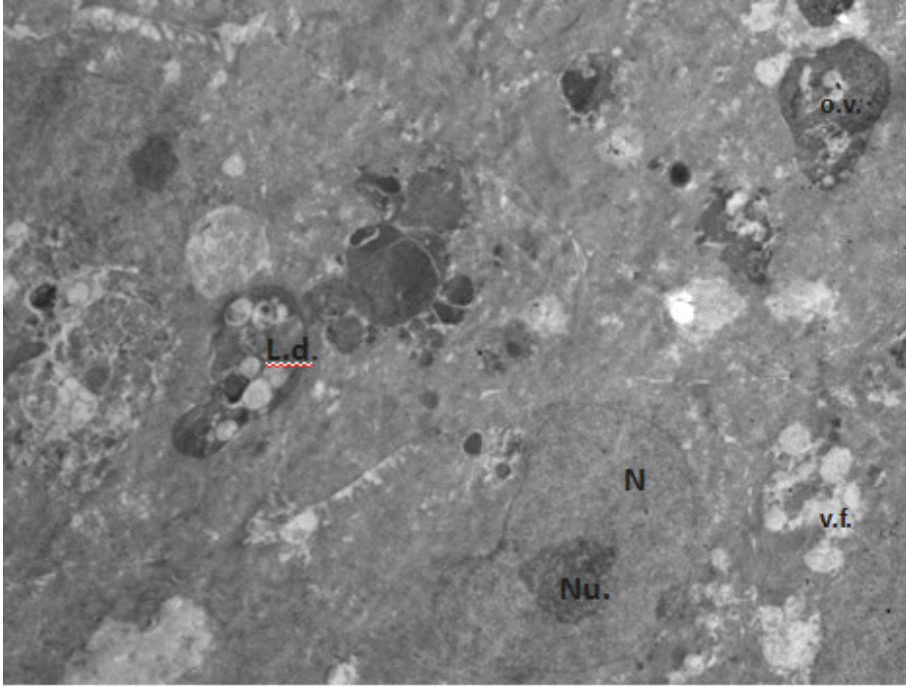
Şekil 4-7: TEM CAR Grubu

%100 canlı 1×10^6 ishikawa hücrelerinden oluşturulan sferoidlerden çekilen CAR grubu fotoğrafında; sferoid bütünlüğünün bozulduğu, lipit vokuollerinin(v.f.) oluştuğu ve otofajik vokuol (o.v.) benzeri yapıların sayısında artışın olduğu gözlemlendi. (N: nukleus, L.d.: litik değişiklikler) (X7500)



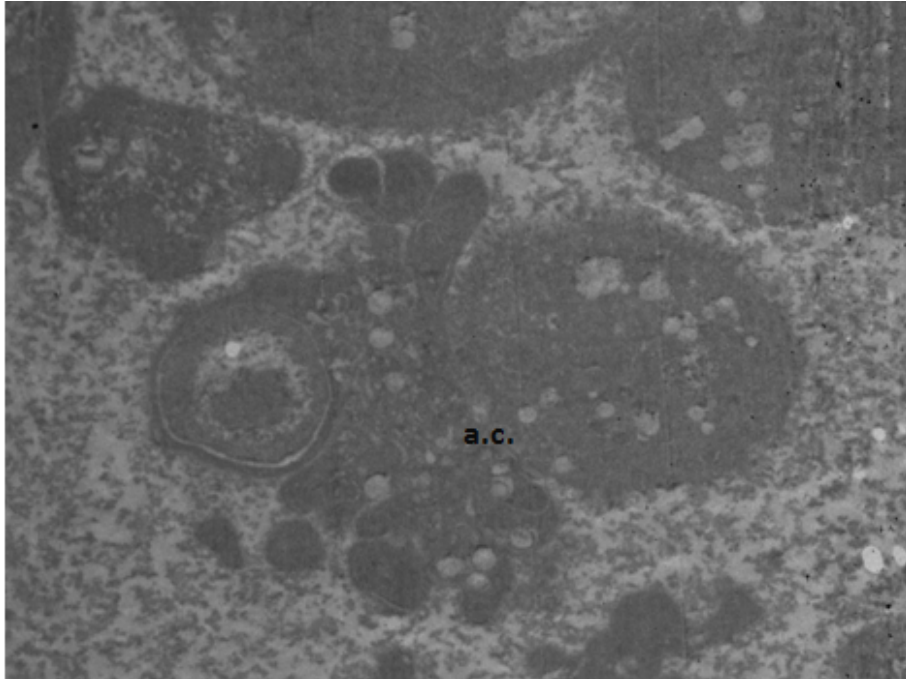
Şekil 4-8: TEM CIMP Grubu

%100 canlı 1×10^6 ishikawa hücrelerinden oluşturulan sferoidlerden çekilen CIMP grubu fotoğrafında; apoptotik cisimciklerin (a.c.) oluştuğu gözlemlendi. (X7500)



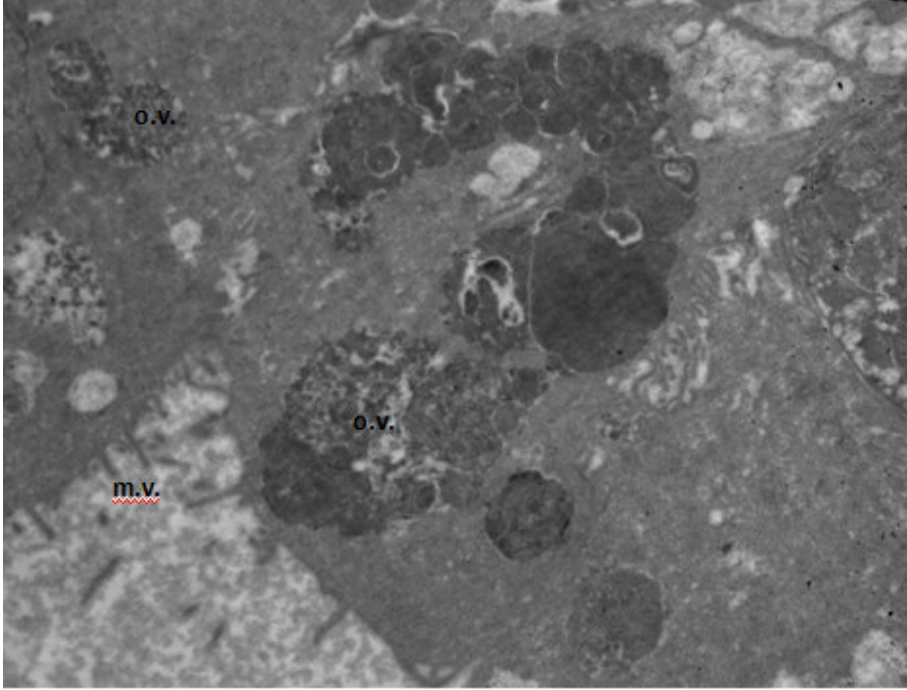
Şekil 4-9: TEM CIMP Grubu

%100 canlı 1×10^6 ishikawa hücrelerinden oluşturulan sferoidlerden çekilen CIMP grubu fotoğrafında; hücrelerin içerisinde litik değişikliklerin (L.d.) olduğu ve otofajik vokuol (o.v.) benzeri yapıların olduğu gözlemlendi. (N: nukleus, Nu: nukleolus, v.f.: vokuol füzyonu) (X5000)



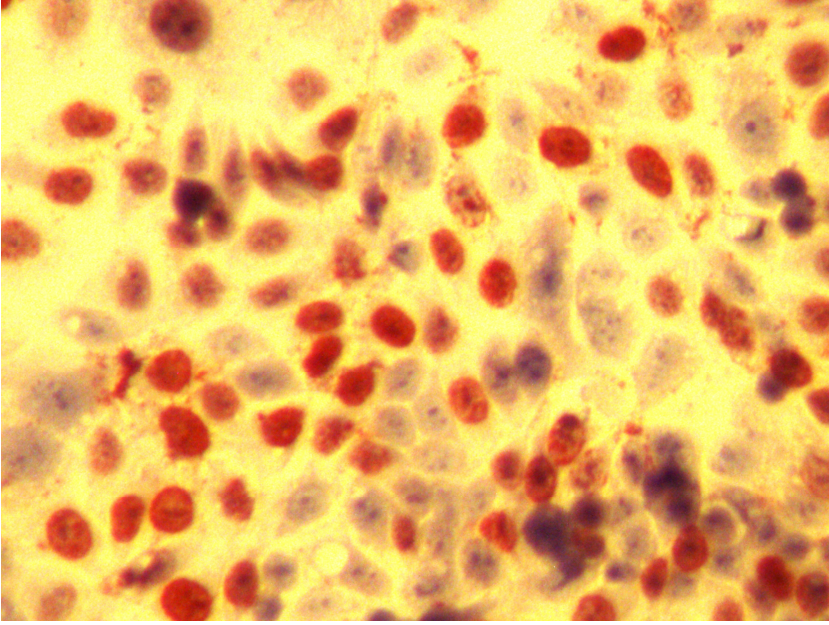
Şekil 4-10: TEM Kombinasyon Grubu

%100 canlı 1×10^6 ishikawa hücrelerinden oluşturulan sferoidlerden çekilen kombinasyon (CAR + CIMP) grubu fotoğrafında; apoptotik cisimcik (a.c.) yapılarının olduğu izlendi. (X5000)

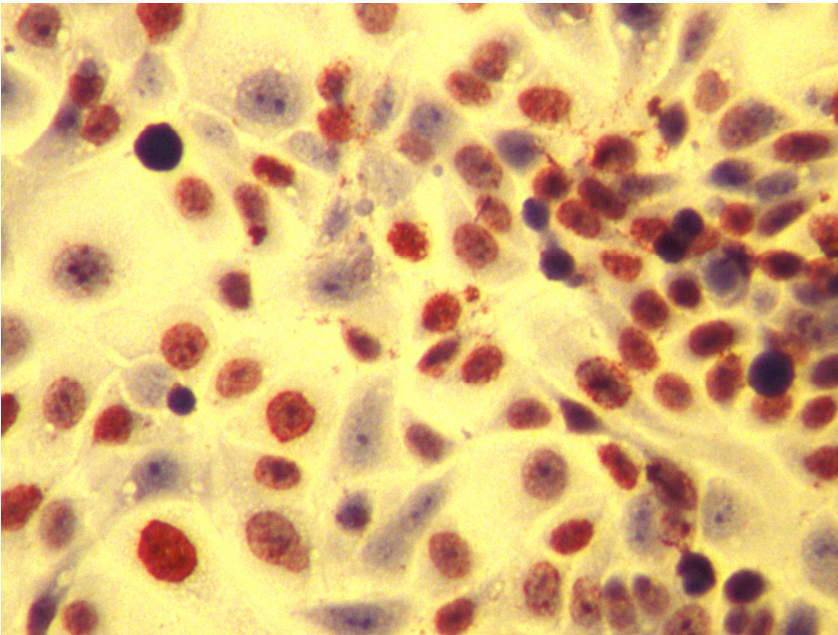


Şekil 4-11: TEM Kombinasyon Grubu

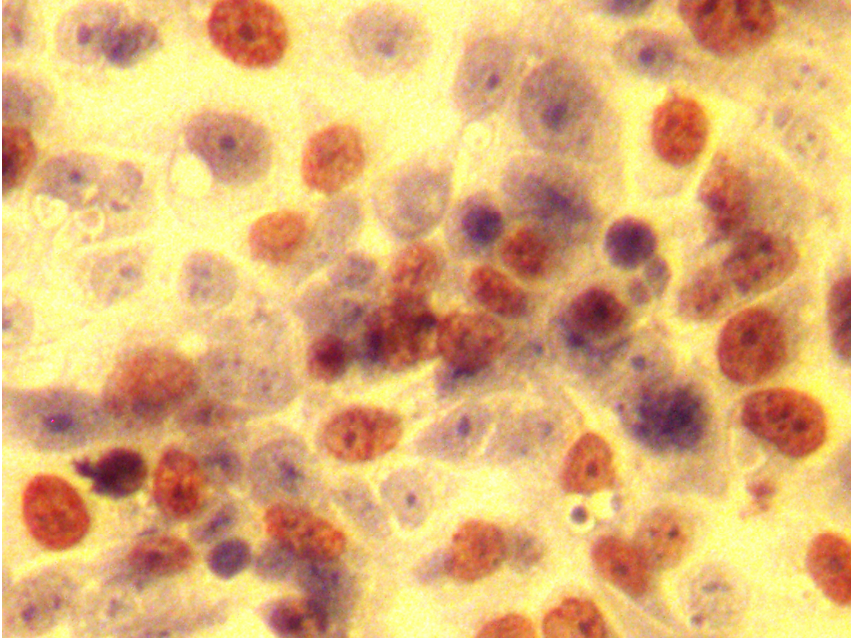
%100 canlı 1×10^6 ishikawa hücrelerinden oluşturulan sferoidlerden çekilen kombinasyon (CAR + CIMP) grubu fotoğrafında; mikrovillus (m.v.) kaybının olduğu ve hücre içinde belirgin otofajik vakuol (o.v.) yapısının oluştuğu gözlemlendi. (X7500)



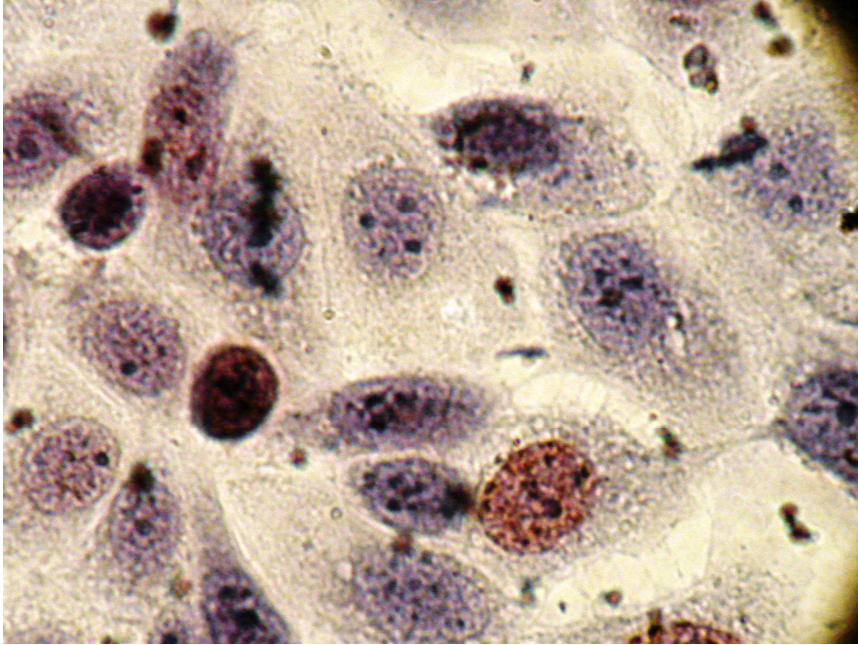
Şekil 4-12: Kontrol Grubu 24 Saat Ishikawa Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası (X120)



Şekil 4-13: CAR Grubu 24 Saat Ishikawa Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası (X120)

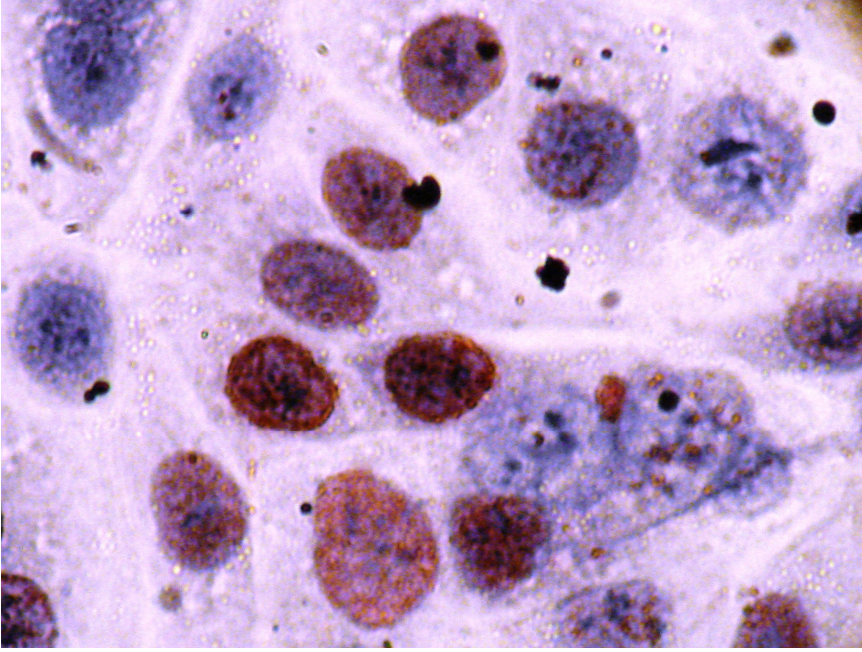


Şekil 4-14: CIMP Grubu 24 Saat Ishikawa Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası (X160)

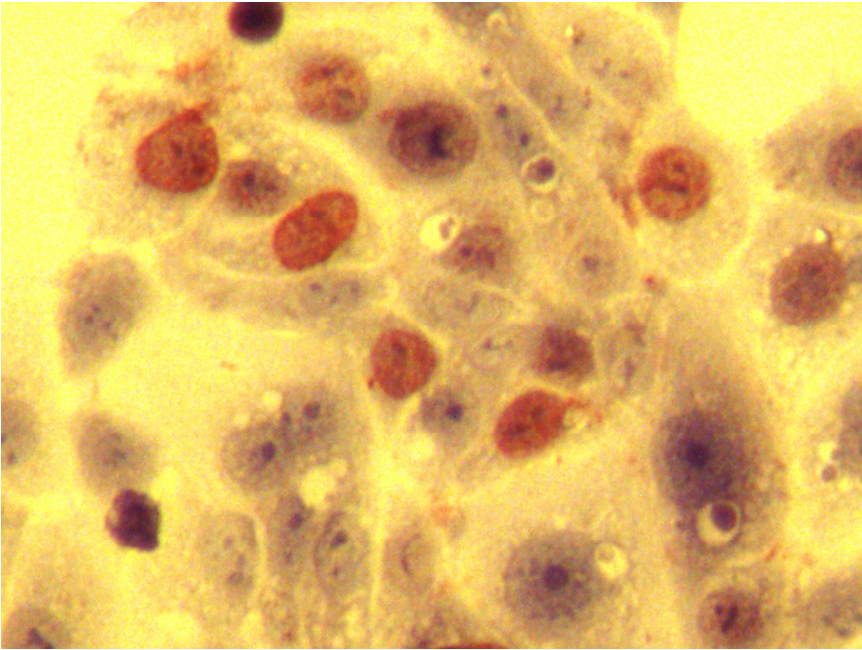


Şekil 4-15: Kombinasyon (CAR + CIMP) Grubu 24 Saat Ishikawa Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası

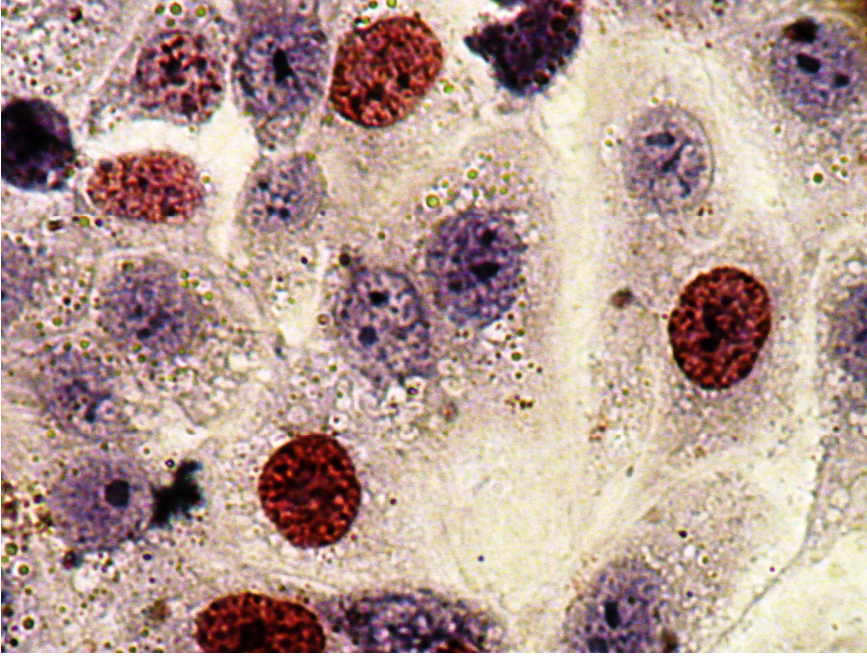
(X200)



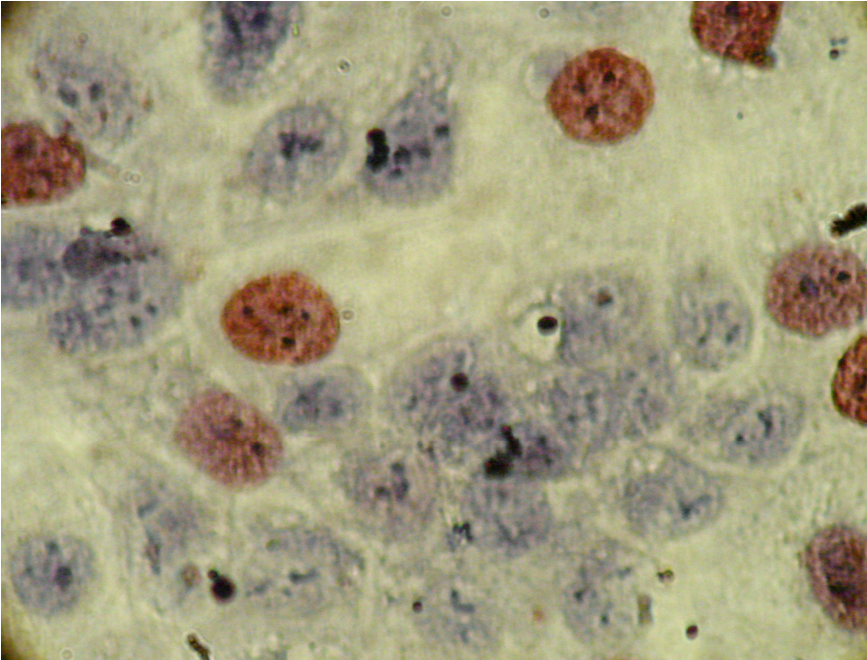
Şekil 4-16: Kontrol Grubu 72 Saat Ishikawa Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası (X200)



Şekil 4-17: CAR Grubu 72 Saat Ishikawa Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası (X200)

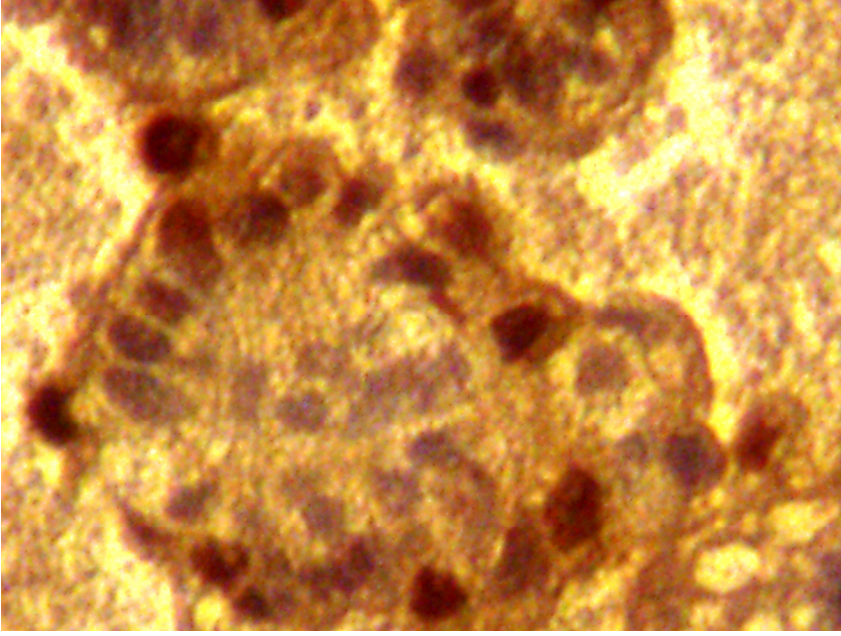


Şekil 4-18: CIMP Grubu 72 Saat Ishikawa Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası (X200)



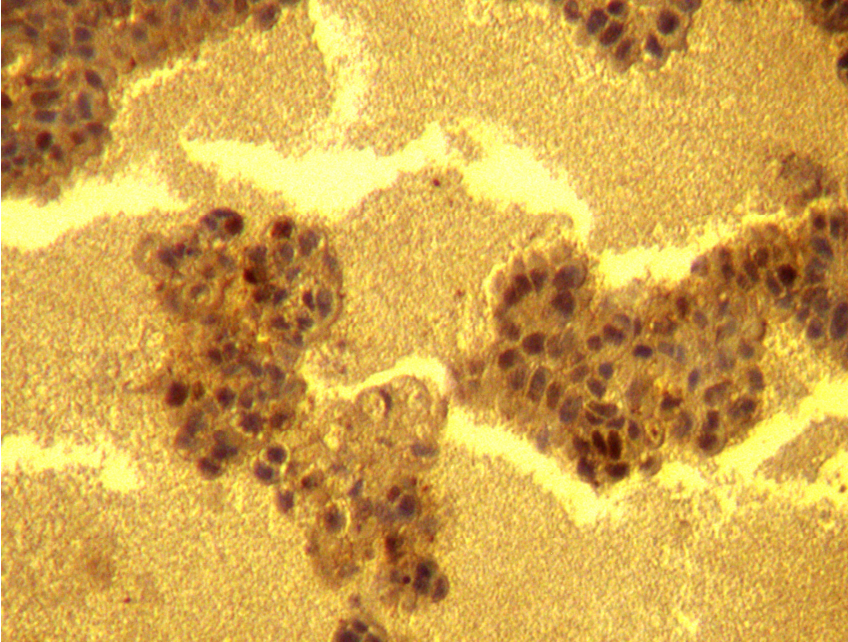
Şekil 4-19: Kombinasyon (CAR + CIMP) Grubu 72 Saat Ishikawa Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası

(X200)



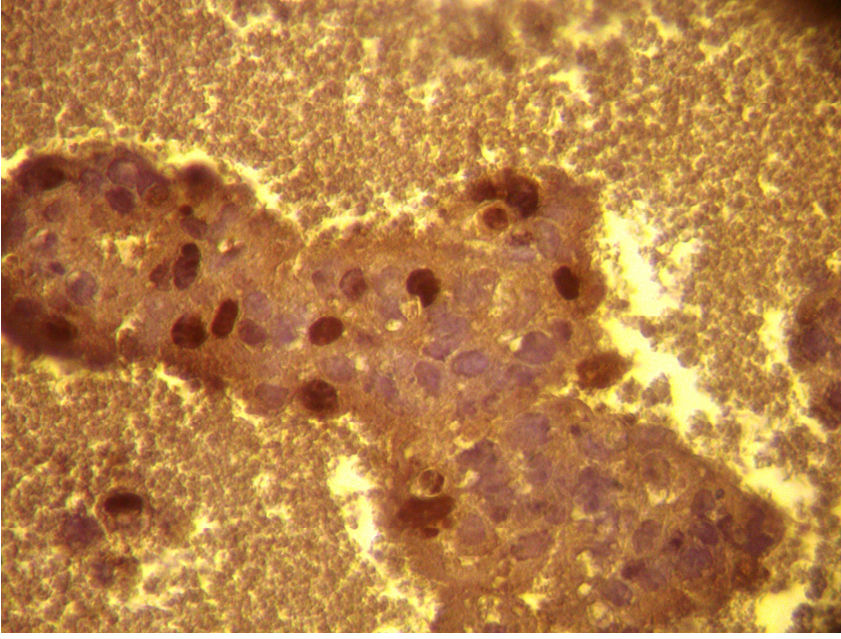
Şekil 4-20: Kontrol Grubu 24 Saat Ishikawa Üç Boyutlu (Sferoid) Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası

(X200)



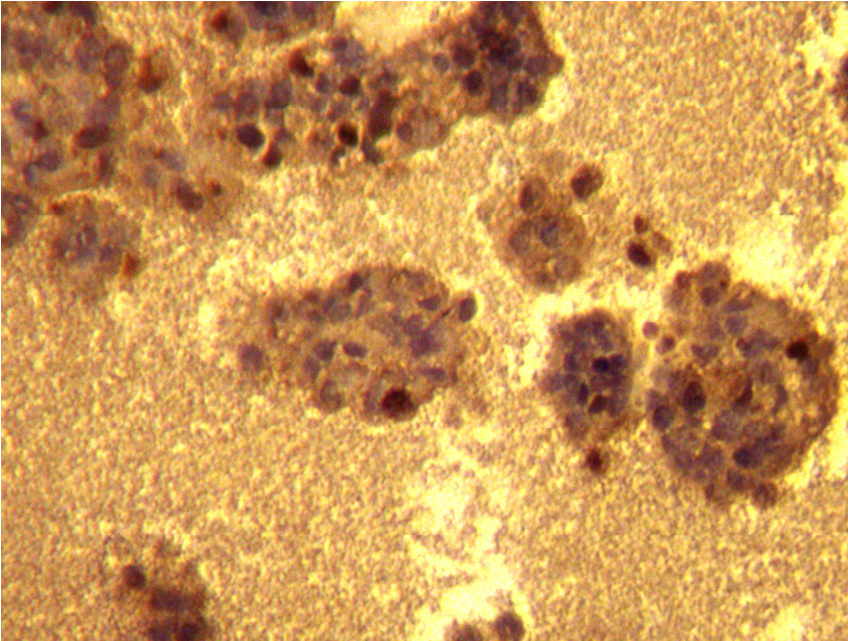
Şekil 4-21: CAR Grubu 24 Saat Ishikawa Üç Boyutlu (Sferoid) Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası

(X100)



Şekil 4-22: CIMP Grubu 24 Saat Ishikawa Üç Boyutlu (Sferoid) Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası

(X160)



Şekil 4-23: Kombinasyon (CAR + CIMP) Grubu 24 Saat Ishikawa Üç Boyutlu (Sferoid) Hücre Kültürlerinde BrdU İmmünohistokimyası

(X120)

5. TARTIŞMA

Endometriyum kanseri kadın genital kanserleri arasında ilk sırada bulunan (5) ve en yaygın görülen jinekolojik tümörlerden biridir (3,6,7). Endometriyum kanserinin alt tipi olan endometrioid adenokarsinoma (Tip I), hücrelerde meydana gelen β -catenin genindeki mutasyon sonucu infertiliteye yol açabilen bir kanser çeşididir(10).

Ishikawa hücre soyu; insan endometriyum epitelinden türeyen tip I adenokarsinom hücreleri olup östrojene bağımlılık göstermektedirler(1,2). Endometrium epitelinin östrojen ve diğer kemoterapotik ajanlara karşı yanıtlarının çalışılabileceği ideal bir hücre soyudur (1,2).

Karboplatin, endometriyal karsinom gibi çeşitli tümörlerin tedavisinde kullanılan platinyum içeren ikinci nesil antineoplastik alkilleyici bir ajandır (22,23,26,27). Karboplatinin, platinyum içeriğinden dolayı hücrelerde öncelikle DNA hasarına yol açtığı ve böylece tümör hücrelerinin vücuttaki gelişimlerini ve yayılmalarını yavaşlattığı gösterilmiştir (22,25,26).

Platinyum türevlerinin endometrial tümör hücrelerine karşı göstermiş oldukları sitotoksik etkilerin tayininde hücre canlılık oranlarının da içinde bulunduğu çeşitli metodlar kullanılmaktadır (22,25,27).

Klorimipramin, obsesyon tedavisinde sıklıkla kullanılan trisiklik bir antidepresandır (34). Klorimipramin'in neoplastik hücrelerde yarattığı en belirgin etki hücreleri apoptoza götürmesidir(31,32,33). Bunun yanı sıra hücrelerde DNA hasarınada yol açabilen özelliğe sahip bir antidepresandır (34).

Hücre kültürü çalışmaları, in vivo şartlarda mümkün olmayan, kısa zaman aralığında gerçekleştirilmesi istenen fiziksel ve kimyasal etkenlerin incelenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (14,15).

Antineoplastik ajanların in-vitro etkinlik düzeyinin saptanmasında çok farklı hücre kültürü parametre ve yöntemleri kullanılmaktadır. Bu parametrelerin başında hücrelerin farklı doz ve zaman aralığında ilaçlarla etkilendirilerek doz ve zaman etkileşim grafiklerinin saptanması bulunmaktadır ve bu parametrelerden elde edilen sonuçlar ile ilaçların etkileşimlerinin özgünlüğü belirlenebilmektedir.

Bizim çalışmamızda Ishikawa Endometrium hücre kültürlerinde, hücrelere değişen doz ve zaman aralıklarında; Karboplatin, Klorimipramin ayrı ayrı ve birlikte uygulandığında hücrelerin doza ve zamana bağlı olarak hücre sayılarında azalma

olmuştur(Tablo4.1., Şekil 4.1.). Bu azalma literatür bilgisiyle uyumlu (23,25,31,32) gözükmektedir ve istatistiksel olarak anlamlıdır($p<0,01$).

Kontrol grubu ishikawa hücreleri zamana bağlı olarak düzgün ivmeli bir artış göstermesine karşın, hem Karboplatin hemde klorimipramin grubu hücreleri anlamlı ($p<0,01$) düşüşler gösterdiği gözlemlendi(Tablo4.1., Grafik 4.1.). Kombinasyon grubu hücreleri kontrol, Karboplatin ve Kloripramin grubu ile karşılaştırıldığında hücre sayısında görülen düşüşlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p<0,01$).

İki boyutlu hücre kültürlerinde; BrdU işaretleme indeksleri açısından sonuçlar değerlendirildiğinde 24 ve 72. saatlerde kontrol grubu hücrelerinde işaretlenme indeksi değerleri %53 ve %65 arasında seyrederken, bu değerler Karboplatin grubunda zamana bağlı olarak azaldığı ve 72. saatte %11 seviyesine gerilediği saptandı. Benzer şekilde Klorimipramin grubu hücreleri de zamana bağlı olarak işaretlenme indeksinde azalma meydana geldiği gözlemlendi. Bu düşüş istatistiksel olarak anlamlıdır($p<0,01$) (Tablo 4.2., Şekil 4.2.) ve bu bulgu literatürlerle uyumludur (33). Kombinasyon grubu hücrelerinde ilerleyen saatlerde %1 gibi çok düşük bir BrdU işaretlenme indeksi saptandı. Bütün gruplar ve kombinasyon grubu hücrelerinin BrdU işaretlenme indeks değerleri kontrol gruplarından istatistiksel olarak az olduğu saptandı ve bu azalmanın anlamlı ($p<0,01$) (Tablo 4.2., Şekil 4.2.) ve literatürle uyumlu olduğu görüldü(33,36).

İlginç olan kombinasyon grubu BrdU işaretlenme indeksi değerinin 72. saatte belirgin bir şekilde hem Karboplatin hem de Klorimipramin grubuna oranla azaldığı görüldü . Bu düşüş; maddelerin, beraber kullanıldığında sentez fazı inhibisyonu açısından sinerjistik bir etki gösterdiklerinin kanıtı olarak gösterilebilir.

İlaç-hücre etkileşimi için iki boyutlu hücre kültür sonuçlarının tam olarak in-vivo korelasyon sağlayamaması sonucu yeni etkin ve güvenilir kültür metodları geliştirilmeye çalışılmıştır. Multiselüler sferoid hücre kültürleri tümör mikro çevresini ve doğasını en iyi şekilde yansıtan bir method olarak ortaya çıkmış ve sonuçları itibariyle yüksek in-vivo korelasyon gösterdiği çok sayıdaki literatürde belirtilmektedir (37,38,39,40).

Çalışmamızda likit-overlay teknik kullanılarak oluşturulan sferoidler kullanıldı ve bu ilaçların tek tek ve kombinasyon uygulamaları sonucu sferoid BrdU işaretlenme indeksleri üzerine etkileri tartışıldı. Sonuçlar değerlendirildiğinde kontrol grubu sferoidlerinde %68 seviyelerinde saptanan BrdU indeksinin hem Karboplatin hem Klorimipramin hem de kombinasyon grubunda azaldığı görüldü(Tablo 4.3., Şekil 4.3.).

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

Hücre proliferasyon ve canlılık oranlarının ve ilaçların etki düzeylerinin saptanmasında kullanılan güvenli metodlardan biri de akım sitometrik (FCM) analizlerinin değerlendirilmesidir. Çalışmamızda programlı hücre ölüm oranları kontrol grubu hücrelerinde 24 saatte %1, 72 saatte %3 iken (Tablo 4.4., Şekil 4.4.) Karboplatin grubunda özellikle 72. saatte bu oranın %32, Klorimipramin grubunda %22 ve kombinasyon grubunda ise %46 (Tablo 4.4., Şekil 4.4.) civarlarına yükseldiği saptandı. Bu sonuçlara bakıldığında hem Karboplatin hemde Klorimipramin'in ayrı ayrı, hücreleri zamana bağlı olarak programlı hücre ölümüne yönlendirmelerinin görülmesine karşılık kombinasyon grubu incelendiğinde ilaçların sinerjistik bir etki ile hücreleri programlı hücre ölümüne daha yüksek oranda yönlendirdiği gözükmektedir. Buradan her iki ilacın etki yollarının kısmen farklı olmasına rağmen inkübasyon sırasında birbirleriyle sinerjistik olarak etkileşimde bulunduğu görülmektedir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede kombinasyon grubu hücrelerinde Karboplatin grubuna oranla 24 saatte anlamlı bir fark kaydedilmezken ($p>0,05$) 72. saatte anlamlı bir artış ($p<0,01$) gözlemlendi. Karboplatin ve Klorimipramin grubu hücreleri kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırıldığında programlı hücre ölüm oranlarının anlamlı bir şekilde arttığı gösterildi ($p<0,01$) ve bu sonuçlar literatürle uyumluluk göstermektedir (36,37,38). Kombinasyon grubu ile karşılaştırıldığında 24. ve 72. saatlerde saptanan fark anlamlı bulunmuştur.

FCM sonuçları da incelendiğinde; hücrelerin programlı hücre ölümüne gitme oranlarının; ilaçların tek tek uygulandığı gruplara oranla kombinasyon grubunda daha yüksek oranda olduğu saptandı. Bunun sonucu olarakta her iki ilacında, hücreleri programlı hücre ölümüne yönlendirme sürecinde sinerjistik etki gösterdiği söylenebilmektedir.

Programlı hücre ölümünün hücrel düzeyde saptanmasında en güvenilir metodlardan biri elektron mikroskopik değerlendirmelerdir. Bizim çalışmamızda

kontrol grubu sferoidlerin elektron mikroskopik incelenmesinde; nukleus ve hücre membranlarının intakt olduğu, hücreler arası bağlantıların düzgün olduğu, sferoid bütünlüğünü sağlayan ve özellikle sferoidlerin proliferasyon bölgesi hücreleri arasında bol miktarda bulunan dezmozomların bulunduğu görülmektedir(Şekil 4.5.). Ek olarak hücrelerin düzgün morfoloji gösterdikleri gözlemlendi(Şekil 4.6.).

Karboplatin uygulanmış sferoidlerde; sferoid morfolojisinin bozulduğu ve hücrelerde belirgin otofajik vakuol yapısının oluştuğu gözlemlendi(Şekil 4.7.). Otofajik vakuol oluşumunda moleküler ve gen ekspresyonu düzeyi, özellikle Belcin-1 aktivasyonunun ölçülmesi elzem görülse de, morfolojik olarak hücresel düzeyde elektron mikroskopik gözlemlerle otofaji varlığının saptanması yeterlidir.

Klorimipramin uygulanmış sferoidlerde; apoptotik cisimciklerin oluştuğu gözlemlendi(Şekil 4.8.). Ayrıca hücrelerin içerisinde litik değişikliklerin meydana geldiği ve sayıca artmış otofajik vakuol oluşumunun varlığı gözlemlendi (Şekil 4.9.). Kombinasyon grubu sferoidlerde ise hücrelerde apoptotik cisimciklerin oluşumunun (Şekil 4.10.) yanında hücrelerin içerisinde Klorimipramin grubuna benzer şekilde otofajik vakuollerin yer aldığı ayrıca mikrovillus kaybının olduğu(Şekil 4.11.) gözlemlendi.

Çalışmamızın bulguları bütünlük içerisinde değerlendirildiğinde deneyin kurgulanışı bakımından Karboplatin ve Klorimipramin'in terapötik amaçlı birlikte kullanım mantığı hem iki boyutlu kültür modellerinde hem de sferoid modelde anlamlı bir sitotoksikite gösterdiği ve iki ve üç boyutlu kültürlerden elde edilen sonuçların çalışmamızda birbirlerini desteklediği görülmektedir. Üç boyutlu sferoidlerde yapısal ve moleküler işleyişin iki boyutlu kültürlerle oranla farklı olmasına rağmen ve bu iki maddenin hücresel etki yollarını farklı sinyal mekanizmalarıyla gerçekleştirdiği dikkate alındığında sonuçlar itibarı ile sinerjistik artmış inhibitör etkinin görülmesi tümörün geriletmesinde, büyümesinin azaltılmasında veya tamamen durdurulmasında etkin ve güvenilir yeni bir model oluşturabileceği görülmektedir.

Sonuçlar;

- 1- Karboplatin Ishikawa Endometrium hücrelerinde zamana bağlı olarak etkin bir sitotoksik etkiye sahiptir.
- 2- Klorimipramin Ishikawa hücrelerinde antineoplastik bir ajan olan Karboplatin kadar etkin bir sitotoksik etkiye sahiptir.

- 3- Her iki ilacın birlikte kullanımı hücreler üzerinde çok daha etkin sitotoksik etki göstermektedir.

Endometrial kanserlerin üzerine ilaç sitotoksitenin değerlendirilmesinde, popülasyon kinetik verilerinin önemli bir yer tutması kabul görülen morfolojik ve gen ekspresyonu gibi daha ileri düzeyde moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- 1) Nishida M. The Ishikawa cells from birth to the present. *Hum Cell*. 2002 Sep;**15**(3):104-17.
- 2) Naciff JM, Khambatta ZS, Thomason RG, Carr GJ, Tiesman JP, Singleton DW, Khan SA, Daston GP. The genomic response of a human uterine endometrial adenocarcinoma cell line to 17alpha-ethynyl estradiol. *Toxicol Sci*. 2009 Jan;**107**(1):40-55
- 3) Yardım T., Yüce M. A., Özyılmaz F., Yorulmaz F., Kurtul M., Sayın C. THE Prognostic Factors Effecting The Survive Of Patients With Endometrium Canser And Our Clinical Experiences. *Journal Of Gynecology and Obstetrics*. 1999; **9**:2
- 4) Park HM, Lee SS, Eom DW, Kang GH, Yi SW, Sohn WS. Endometrioid adenocarcinoma arising from endometriosis of the uterine cervix: a case report. *Korean Med Sci*. 2009 Aug;**24**(4):767-71
- 5) C. C. Boring, T.S. Squires, T. Tong and S. Montgomery-Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1994;**44**; 7-26
- 6) Pallares J, Llobet D, Santacana M, Eritja N, Velasco A, Cuevas D, Lopez S, Palomar-Asenjo V, Yeramian A, Dolcet X, Matias-Guiu X. CK2beta is expressed in endometrial carcinoma and has a role in apoptosis resistance and cell proliferation. *Am J Pathol*. 2009 Jan;**174**(1):287-96
- 7) Sophia Kounelis, M.D., Nikiforos Kapranos, M.D., Efi Kouri, M.D., Domenico Coppola, M.D., Helen Papadaki, M.D., Mirka W. Jones, M.D. Immunohistochemical profile of endometrial adenocarcinoma: a study of 61 cases and review of the literature. *Mod Pathol* 2000;**13**(4):379–388
- 8) Shing-Jyh Chang, Tao-Yeuan Wang, Chan-Yen Tsai, Tzu-Fang Hu, Margaret Dah-Tsyr Chang and Hsei-Wei Wang-Increased epithelial stem cell traits in advanced endometrial endometrioid carcinoma. *BMC Genomics* 2009, **10**:613
- 9) Arcangeli A, Noci I, Fortunato A, Scarselli GF. The LH/hCG Axis in Endometrial Cancer: A New Target in the Treatment of Recurrent or Metastatic Disease. *Obstet Gynecol Int*. 2010;2010. pii: 486164.

- 10) Jeong JW, Lee HS, Franco HL, Broaddus RR, Taketo MM, Tsai SY, Lydon JP, DeMayo FJ. beta-catenin mediates glandular formation and dysregulation of beta-catenin induces hyperplasia formation in the murine uterus. *Oncogene*. 2009 Jan 8;**28**(1):31-40
- 11) Albitar L, Pickett G, Morgan M, Wilken JA, Maihle NJ, Leslie KK. EGFR isoforms and gene regulation in human endometrial cancer cells. *Mol Cancer*. 2010 Jun 25;**9**:166
- 12) Wallace AE, Gibson DA, Saunders PT, Jabbour HN. Inflammatory events in endometrial adenocarcinoma. *J Endocrinol*. 2010 Aug;**206**(2):141-57
- 13) Chaudry A. Eriřim 17.05.2011 Cell Culture.2004. <http://www.scq.ubc.ca/cell-culture/>
- 14) Anıl Y.D. *Doku Ve Hücre Kültürlerine Genel Bakış*. İstanbul. Beta Basım Yayım Dağıtım A.ř. 1986 s.470-481
- 15) Bilir A. ,Ergüven M. Uygulamalı Hücre Kültürü Kursu. 2010. İstanbul.
- 16) Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge? *Int J Radiat Biol*. 2007 Nov-Dec;**83**(11-12):849-71.
- 17) Pickl M, Ries CH. Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. *Oncogene*. 2009 Jan 22;**28**(3):461-8
- 18) Oktem G, Bilir A, Ayla S, Yavasoglu A, Goksel G, Saydam G, Uysal A. Role of intercellular communications in breast cancer multicellular tumor spheroids after chemotherapy. *Oncol Res*. 2006;**16**(5):225-33.
- 19) Demir R. *Histolojik Boyama Teknikleri*. Ankara. Palme Yayıncılık. 2001
- 20) Babich H, Reisbaum AG, Zuckerbraun HL. In vitro response of human gingival epithelial S-G cells to resveratrol. *Toxicol Lett*. 2000 Apr 3;**114**(1-3):143-53.
- 21) Dođanay O. *Rekürren Epitelyal Over Kanserinde Topotecan Kemoterapisinin Etkinliği Ve Güvenilirliđi*. Adana. 2005
- 22) Hsi-Hsien Chen, Tzen-Wen Chen, Heng Lin.Pravastatin Attenuates Carboplatin-Induced Nephrotoxicity in Rodents via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha–Regulated Heme Oxygenase-1. *Molecular Pharmacology*, 2010 Page 1.

- 23) Yuh YJ, Lee HR, Kim SR. Gemcitabine and carboplatin combination chemotherapy for elderly patients with advanced Non-Small Cell Lung Cancer: a feasibility study. *Cancer Res Treat.* 2008 Sep;**40**(3):116-20
- 24) Zagouri F, Bozas G, Kafantari E, Tsiatas M, Nikitas N, Dimopoulos MA, Papadimitriou CA. Endometrial cancer: what is new in adjuvant and molecularly targeted therapy?. *Obstet Gynecol Int.* 2010;2010:749579
- 25) Florian T Unger, Hermann A Klasen, Garri Tchatchian, Rudy L de Wilde and Irene Witte. DNA damage induced by cis- and carboplatin as indicator for in vitro sensitivity of ovarian carcinoma cells. *BMC Cancer* 2009, **9**:359
- 26) Qing He, Cynthia H. Liang, and Stephen J. Lippard. Steroid hormones induce HMG1 overexpression and sensitize breast cancer cells to cisplatin and carboplatin. *PNAS*, 2000 vol. **97**:11
- 27) Abe A, Ikawa H, Ikawa S. Desensitization treatment with cisplatin after carboplatin hypersensitivity reaction in gynecologic cancer. *J Med Invest.* 2010 Feb;**57**(1-2):163-7
- 28) Calvert AH, Newell DR, Gumbrell LA, O'Reilly S, Burnell M, Boxall FE, Siddik ZH, Judson IR, Gore ME, Wiltshaw E. Carboplatin dosage: prospective evaluation of a simple formula based on renal function. *J Clin Oncol.* 1989 Nov;**7**(11):1748-56.
- 29) Özbek H., Kösem M., Erdoğan E., Bayram I., Durmuş A., Dilek I. The Effect Of Pentoxifylline, Vitamine C And Vitamine E On The Organ Toxicity Of Carboplatin. *Ege Tıp Dergisi.* 2003,**42**(3):143-148
- 30) Panagiotis A Konstantinopoulos, Elena Fountzilias, Kamana Pillay, Luiz F Zerbini, Towia A Libermann, Stephen A Cannistra and Dimitrios Spentzos. Carboplatin-induced gene expression changes in vitro are prognostic of survival in epithelial ovarian cancer. *MC Medical Genomics* 2008, **1**:59
- 31) Ayhan Bilir, M. Erguven, N. Yazıhan, E. Aktas, G. Oktem, A. Sabancı. Enhancement of vinorelbine-induced cytotoxicity and apoptosis by clomipramine and lithium chloride in human neuroblastoma cancer cell line SH-SY5Y. *J Neurooncol.* 2010 Dec;**100**(3):385-95
- 32) Daley E, Wilkie D, Loesch A, Hargreaves IP, Kendall DA, Pilkington GJ, Bates TE. Chlorimipramine: a novel anticancer agent with a mitochondrial target. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 ;**328**(2):623-32.

- 33) Ayhan Bilir, M. Erguven, G. Oktem, A. Ozdemir, A. Uslu, E. Aktas, B. Bonavida. Potentiation of cytotoxicity by combination of imatinib and chlorimipramine in glioma. *Int J Oncol.* 2008;**32**(4):829-39.
- 34) Rooprai HK, Christidou M, Pilkington GJ. The potential for strategies using micronutrients and heterocyclic drugs to treat invasive gliomas. *Acta Neurochir (Wien).* 2003 Aug;**145**(8):683-90.
- 35) Balant-Gorgia AE, Gex-Fabry M, Balant LP. Clinical pharmacokinetics of clomipramine. *Clin Pharmacokinet.* 1991 Jun;**20**(6):447-62.
- 36) Lang DS, Droemann D, Schultz H, Branscheid D, Martin C, Ressemeyer AR, Zabel P, Vollmer E, Goldmann T. A novel human ex vivo model for the analysis of molecular events during lung cancer chemotherapy. *Respir Res.* 2007 Jun 14;**8**:43
- 37) Wartenberg M, Acker H. Induction of cell death by Doxorubicin in multicellular spheroids as studied by confocal laser scanning microscopy. *Anticancer Res.* 1996 Mar-Apr;**16**(2):573-9
- 38) Monazzam A, Razifar P, Lindhe O, Josephsson R, Långström B, Bergström M. A new, fast and semi-automated size determination method (SASDM) for studying multicellular tumor spheroids. *Cancer Cell Int.* 2005 Nov **14**:5:32
- 39) Santini MT, Rainaldi G. Three-Dimensional Spheroid Model in Tumor Biology. *Pathobiology.* 1999; **67**:3
- 40) Karlsson H, Gu Y, DePierre J, Nässberger L. Induction of apoptosis in proliferating lymphocytes by tricyclic antidepressants. *Apoptosis.* 1998 Sep;**3**(4):255-60
- 41) Xia Z, Bergstrand A, DePierre JW, Nässberger L. The antidepressants imipramine, clomipramine, and citalopram induce apoptosis in human acute myeloid leukemia HL-60 cells via caspase-3 activation. *J Biochem Mol Toxicol.* 1999;**13**(6):338-47

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Mine	Soyadı	Şencan
Doğ. Yeri	Zile/TOKAT	Doğ. Tar.	07/05/1987
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	37066951984
Email	mine_sencan87@hotmail.com	Tel	05376113862

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi (Biyoloji Bölümü)	2009
Lise	Beykent Koleji	2005

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	60	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	79.000	77.512	74.917
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS office	İyi
İnternet	İyi

Yayımları

Bilir A., Erguven M. , Ermis E., Sencan M., Yazihan N. Combination of imatinib mesylate with lithium chloride and medroxyprogesterone acetate is highly active in Ishikawa endometrial carcinoma in vitro. *J. Gynecologic Oncology* 2011

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Voleybol oynamak, yüzmek, kitap okumak.