

SELAME NURAY ATILMIŞ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2008

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ASETAMİNOFEN VE LİTYUM KLORÜR'ÜN MDAH 2774
İNSAN OVARYUM TÜMÖR HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE
VINORALBİN SİTOTOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

SELAME NURAY ATILMIŞ

**DANIŞMAN
PROF. DR. AYHAN BİLİR**

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

İSTANBUL-2008

TEZ ONAYI

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

08 / 07 / 2008

Prof. Dr. Mehmet GÜRTEKİN

Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Histoloji ve Embriyoloji
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Tez Sahibi : S.Nuray ATILMIŞ
Tez Başlığı : Asetaminofen ve Lityum Klorür'ün MDAH 2774 İnsan Ovaryum Tümör Hücre Kültürlerinde Vinorelbin Sitotoksitesi Üzerine Etkileri
Sınav Yeri : İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 01 / 07 / 2008

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

- 1.Prof.Dr.Ayhan BİLİR (Tez Danışmanı) İstanbul Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji ABD
- 2.Prof.Dr.Yurdağül CANBERK İstanbul Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji ABD
- 3.Prof.Dr.Suzan DAĞLIOĞLU Veteriner Fak. Histoloji ve Embriyoloji ABD
- 4.Prof.Dr.Seyhun SOLAKOĞLU İstanbul Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji ABD
- 5.Doç.Dr.Meral KOYUTÜRK İst.Bilim Ün.Tıp Fak Histoloji ve Embriyoloji ABD

BEYAN**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 olmadığı beyan ederim.

Selame Nuray Atılmış



İTHAF

Kızım Bade Nisa'ya ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Lisans üstü eğitimim aşamasında gerek akademik gerekse hayat bilgilerini bizimle paylaşarak geleceğimize temel oluşturan, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, birlikte çalışmaktan tarifsiz onur duyduğum mesleğinin duayeni danışman hocam İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Ayhan BİLİR'e,

Şefkat ve sevgilerini bizlerden esirgemeyen değerli hocam İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Yurdagül CANBERK'e,

Bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaşmaktan kaçınmayan ve hiçbir zaman bizi geri çevirmeyen değerli hocamız İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU'na,

Her zaman ve her konuda yanımda olan, desteklerini esirgemeyen ve varlıklarıyla güç veren asistan arkadaşlarım Sayın Neslihan Funda ABAY, Seçnur DENİR'e ve diğer tüm asistan arkadaşlarıma,

Tez çalışmamın hazırlanması sürecinde yardımlarını ve manevi desteklerini esirgemeyen Sayın Fusun ÖNCÜ, Selahattin ÜNAL ve Sibel DOĞAN'a,

Tez yazımı aşamasında yardımcı olan İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda görevli Arş. Gör. Mine ERGÜVEN'e,

Bana her zaman destek olan ve her konuda yanımda olan sevgili annelerim Sayın Emel EREN ve Ayten ATILMIŞ'a ve sevgili babalarım Atilla EREN ve Zülfü ATILMIŞ'a,

Çok sevdiğim sevgili kardeşlerime,

Sevgisi, ilgisi, manevi desteği ve varlığıyla bana güç veren ruhumun diğer yarıyı sevgili eşim Murat ATILMIŞ'a

Çalışmam süresince her zaman varlığını hissettiğim hayatımıza yeni bir anlam katan biricik kızım Bade Nisa'ya en içten, sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: **T-50/05122006**.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	İX
ÖZET	X
ABSTRACT.....	Xİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. MDAH-2774	2
2.2. OVARYUM KANSERİ.....	2
2.3. HÜCRE VE DOKU KÜLTÜRÜ HAKKINDA GENEL BİLGİLER	3
2.3.1. Hücre Kültürü	3
2.3.2. Sferoid.....	5
2.3.3. Hücre Siklusu	5
2.3.4. Hücre Siklusunun Kantitatif Analizi	7
2.3.5. İmmünohistokimya	8
2.3.6. BrdU.....	9
2.4. PROJEDE KULLANILAN İLAÇLAR	10
2.4.1. Vinorelbin (Navelbine)	10
2.4.2. Asetaminofen	11
2.4.3. Lityum Klorür	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1. KULLANILAN MADDELER	16
3.1.1. Kimyasal Maddeler	16
3.1.2. Enzimler	16
3.1.3. İlaçlar	16
3.1.4. Kitler	16

3.1.5. Diğer Maddeler	16
3.2. KULLANILAN GEREÇLER	17
3.3. KULLANILAN ÇÖZELTİLER	17
3.3.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler	17
3.3.2. İmmünohistokimya'da Kullanılan Çözeltiler	18
3.4. KULLANILAN YÖNTEMLER	19
3.4.1. Hücre Kültürü	19
3.4.2. Doz Belirleme Deneyi	19
3.4.3. Tutunma (Proliferasyon) Deneyi ve Canlılık Tayini	20
3.4.4. İki Boyutlu Kültürlerde Bromodeoksiüridin ile İmmünohistokimyasal İşaretleme	21
3.4.5. Sferoid Ekimi	21
3.4.6. Sferoidlerin Işık Mikroskobu Takibi	22
3.4.7. Üç Boyutlu Kültürlerde Bromodeoksiüridin ile İmmünohistokimyasal İşaretleme	22
3.5. İSTATİKSEL YÖNTEM	23
4. BULGULAR	24
4.1. Hücre Proliferasyonunun Kinetik Deneylerinin Bulguları	24
4.2. İki boyutlu Kültürlerde BrdU İşaretlenme Değerleri	26
4.3. Üç Boyutlu Kültürlerde BrdU İşaretlenme Değerleri	27
4.4. Sitotoksikite Verileri	29
5. TARTIŞMA	41
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4-1: Zamana Bağlı Hücre Çoğalma Verileri.....	25
Şekil 4-2: Vinoralbin'in Doz İnaktivasyon Grafiği	25
Şekil 4-3: İki Boyutlu Kültürlerde BrdU İle İşaretlenme Grafiği.....	26
Şekil 4-4: Üç Boyutlu Kültürlerde BrdU İle İşaretlenme Grafiği	28
Şekil 4-5: Zamana Bağlı Hücre Sitotoksosite Verileri	29
Şekil 4-6: 24. saat Kontrol grubu X 500	30
Şekil 4-7: 72. saat Kontrol grubu X 500.....	30
Şekil 4-8: 24. saat Vinoralbin grubu X 2000	31
Şekil 4-9: 72. saat Vinoralbin grubu X 500.....	31
Şekil 4-10: 24. saat Lityum grubu X 500.....	32
Şekil 4-11: 72. saat Lityum grubu X 2000.....	32
Şekil 4-12: 24. saat Asetaminofen grubu X 500.....	33
Şekil 4-13: 72. saat Asetaminofen grubu X 2000	33
Şekil 4-14: 24. saat V+L grubu X 2000.....	34
Şekil 4-15: 72 saat V+L grubu X 2000.....	34
Şekil 4-16: 24. saat V+A grubu X 500.....	35
Şekil 4-17: 72. saat V+A grubu X 500.....	35
Şekil 4-18: Kontrol sferoid X 2000.....	36
Şekil 4-19: Vinoralbin X 2000.....	36
Şekil 4-20: Lityum grubu X 2000.....	37
Şekil 4-21: Asetaminofen grubu X 2000.....	37
Şekil 4-22: Kontrol grubu X 2000.....	38
Şekil 4-23: Vinoralbin grubu X 500.....	38
Şekil 4-24: Asetaminofen grubu X 500.....	39
Şekil 4-25: V+A grubu X 2000.....	39
Şekil 4-26: V+L grubu X 500.....	40

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

BrdU	: Bromodeoksiüridin
BrdU-LI	: Bromodeoksiüridin-labeling indeks
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CMF-PBS	: Kalsiyumsuz magnezyumsuz fosfat tampon solüsyonu
COX	: Siklooksijenaz
DAG	: Diaçilgliserol
DNA	: Deoksiribonükleik asid
ELISA	: ELIZA (Enzyme-linked immunosorbent assay)
FCS	: Fötal sığır serumu
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
GSK-3 β	: Glikojen sentetaz kinaz-3 β
LiCl	: Lityum Klorür
MTS	: Multiselüler tümör sferoid
NSAII	: Steroid olmayan inflamatuvar ilaç
NF-KB	: Nükleer Faktör Kappa B
PLC	: Fosfolipaz C
PBS	: Fosfat tamponu içeren %0,9 NaCl

ÖZET

Atılmış, SN. (2008) Asetaminofen Ve Lityum Klorür'ün MDAH 2774 İnsan Ovaryum Tümör Hücre Kültürlerinde Vinoralbin Sitotoksitesi Üzerine Etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji AD. Yüksek Lisans Tezi

Çalışmamızda, mikrotübül inhibitörü olan Vinoralbin, duygu durum düzenleyici Lityum Klorür ve para-aminofenol türevi Parasetamol'un ayrı ayrı ve bir arada kullanıldıklarında MDAH-2774 ovaryum tümörü hücre soyu üzerine etkileri iki ve üç boyutlu tümör hücre kültürü modelleri kullanılarak incelendi. Kültürde üç ilacın etkileri 24, 48, 72. saatlerde hücre çoğalması, hücre sitotoksitesi, hücre siklusu sentez fazı açısından değerlendirildi.

Vinoralbin, iki ve üç boyutlu kültürlerde hücre çoğalmasını azaltıcı etki gösterdi ve hücre siklusu sentez fazı işaretlenmesinde azalma meydana getirdi.

Lityum klorür, iki ve üç boyutlu kültürlerde hücre çoğalmasını azaltıcı etki gösterdi ve hücre siklusu sentez fazı işaretlenmesinde azalma meydana getirdi.

Asetaminofen, iki ve üç boyutlu kültürlerde hücre çoğalmasını kontrol grubuna göre daha azaltıcı etki gösterse de diğer ilaç gruplarına göre arttırdı. Hücre siklusu sentez fazı işaretlenmesinde ise kontrol grubu ile asetaminofen arasında benzer etkiler görüldü.

Kombinasyon gruplarında, ilaçların tek tek uygulamaları ile elde edilen bulgulardan çok farklı değildi.

Sonuç olarak; vinoralbin, lityum klorür ve asetaminofen'in tek tek ve kombinasyonlarının MDAH-2774 ovaryum tümörü hücreleri üzerine etkileri iki ve üç boyutlu kültür modellerinde incelendiğinde, bu maddelerin hücre siklusunda, sentez fazındaki hücrelerin sayısını azalttığı, hücre proliferasyonunu önlediği gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: MDAH 2774, Asetaminofen, Lityum klorür, Vinoralbin, hücre kültürü.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-50/05122006.

ABSTRACT

Atılmış, S.N. (2008). The effects of Lithium Chloride and Acetaminophen on Vinorelbine cytotoxicity in MDAH-2774 Human Ovarian Cancer Cell Line. İstanbul University, Institute of Health Science, Histology and Embryology Department. Master Thesis. İstanbul.

In this study, effects of Vinorelbine as a microtubule inhibitory, LiCl as a mood stabilizing agent and para aminophenol derivated acetaminophen were investigated single and combined applications in monolayer and spheroid models with MDAH-2774 human ovarian cancer cell line. Drugs were evaluated in cell culture with respect to cell proliferation, cell cytotoxicity, synthesis phase of cell cycle in 24., 48., 72.h.

Vinorelbine has diminished both cell proliferation and cell cycle synthesis phase indication in monolayer and spheroid cell cultures.

Lithium chloride has diminished both cell proliferation and cell cycle synthesis phase indication in monolayer and spheroid cell cultures.

Even acetaminophen has shown a decreasing effect in cell proliferation compared to control group in monolayer and spheroid cell cultures, this effect increased with respect to other drugs. Similar effects were observed in both control and acetaminophen groups in cell cycle synthesis phase indication.

All combination groups wasn't different from single usage in monolayer and spheroid cell cultures.

As a result, the effects of vinorelbine, lithium chloride and acetaminophen were investigated in monolayer and spheroid MDAH-2774 human ovarian cancer cell line and a decrease in cell number in cell cycle synthesis phase, prevention of cell proliferation.

Key Words: MDAH-2774, Acetaminophen, Lithium chlorur, Vinorelbine, Cell culture.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: **T-50/05122006**.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tümör tedavisinde kullanılan ilaçların hücre düzeyindeki etkileri çok değişik metodlar kullanılarak araştırılmaktadır. Hücre kültürü çalışmalarının büyük çoğunluğu 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 model olarak multiselüler sferoidler gözükmektedir.

Vinoralbin (navelbine); vinblastinden türeyen yarı sentetik bir vinka alkaloid olup mitotik mikrotübüllerin alt birimleri olan tübülinlere bağlanarak tübülin polimerizasyonunu engelleyip hücre büyümesini durdurur (Gregory ve Smith 2000; Glaxo; Oktay 1998 pp 373-398).

Vinoralbin'in MDAH 2774 insan ovaryum tümör hücre kültürlerindeki etkisi ve bu etkiye, etkisini kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonu üzerinden gerçekleştiren ve antineoplastik etkileri yeni yeni ortaya çıkan, ve bir duygudurum düzenleyici ilaç olarak kullanılan LiCl ile kolon ve meme kanserlerinde koruyucu etkisi bilenen ve COX-2 (siklooksijenaz 2) inhibitörü olan asetaminofenin, MDAH 2774 insan ovaryum tümörü hücre soyunda özellikle üç boyutlu tümör hücre kültürlerindeki etkilerini karşılaştırmalı olarak gösteren çalışmalar yok denecek kadar azdır (Chandrasekharan ve ark. 2002; Warner ve Mitchell 2002; Zhang ve ark. 2002; Tang ve He 2003). Bu nedenle araştırmamızda iki boyutlu hücre kültürlerinin kullanılmasının yanısıra, in vivo korelasyon sağlayan en iyi in vitro model olarak bilinen üç boyutlu multiselüler sferoidlerin kullanılması sonucu elde edilecek olan bilimsel verilerin tedaviye yeni bir yaklaşım ortaya çıkarması olasıdır.

Vinoralbin'in bilinen etkilerine karşın özellikle meme ve kolon kanserlerine karşı koruyucu etkileri saptanan asetaminofen ve hücre düzeyinde etkileri değişkenlik gösteren LiCl ile ovaryum tümör hücre kültürlerinde nasıl etkileşeceği, tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle araştırmamızda asetaminofen ve LiCl'ün ayrı ayrı veya vinoralbin ile kombinasyonlarının MDAH 2774 insan ovaryum tümör hücre kültürlerinde hücre çoğalması üzerine etkilerini doza ve zamana bağlı olarak araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MDAH-2774

MDAH-2774 insan ovaryum tümör hücre hattı genom zararına karşı apoptozu indükleyici genlerin anahtarı olan p-53 ve MSH-2 (mut homolog 2) proteinlerini yitirmiş bir hücre hattıdır (Bilir ve ark. 2002).

MDAH-2774 hücre hattı radyasyon veya kemoterapi görmemiş endometroid ovaryum karsinomalı bir hastanın asit sıvısından türetilmiştir. Freedman ve ark. Tarafından MD Anderson Hospital and Tumor Institute, Houston, TX'de 1978'de karakterize edildi (Gilloteaux ve ark. 2003).

2.2. OVARYUM KANSERİ

Ovaryum kanseri jinekolojik kanserler arasında en ölümcül olanıdır (Askar ve ark. 2006). En fazla malignant tip ovaryum tümörü epitelyal karsinomadır. Epitelyal karsinoma ovaryum yüzey epiteliinden veya endometriyozisi de içeren sekonder Müller sistemden oluşmaktadır (Rong ve ark. 2001).

Hastaların çoğu, tekrarlayan tümörlerin barsak epiteline yapışması sonucu gelişen tıkanıklık ve beslenme bozukluğu sonucu ölmektedir (Disaia ve Creasman 2003 pp 259-351). Uzun zamandan beri ovaryum kanserine ailevi yatkınlık bilinmektedir. Ailevi ovaryum kanserlerinin % 90'ının BRCA1 (meme kanseri geni 1) ve BRCA2 (meme kanseri geni 2) gen mutasyonlarıyla ilgili olduğu saptanmıştır. BRCA1/2 genlerinde mutasyon taşıyan kadınlarda ovaryum kanseri daha erken yaşlarda başlamaktadır (Hudelist ve ark. 2007). Doğum kontrol hapı kullanımının ovaryum kanseri geliştirme riskini azalttığı gösterilmiştir. BRCA1/2 genlerinde mutasyon taşıyan kadınlarda oral kontraseptif kullanımı ile ovaryum kanseri riskinin anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (Partridge ve Barnes 1999). Oral kontraseptifler ile endometriyumdaki Cox-2 ekspresyonunun ve aromatazın inhibisyonu bu patolojilerin sebep olduğu acıyı ve aşırı uterin kanamayı kontrol etmede etkilerini açıklamaktadır (Maia ve Casoy 2007). Klinik ve moleküler bulgular ovaryum kanserinin 4 major histolojik alt tipini tanımlamışlardır:

Seröz, Müsinöz, Endometrioid, Berrak hücreli

Ovaryum endometrioid adenokarsinomalar wnt sinyalleşme yolunda rol oynayan β -katenini kodlayan CTNNB-1 geninde mutasyon taşırlar (Rong ve ark. 2001).

Ovaryum kanserlerinin taranmasında tümör belirteçleri ve ultrasonagrafi yaygın olarak kullanılmaktadır.

Ca (kanseri antijeni) 12.5 ovaryum kanserinde kullanılan tümör belirteçlerinden biridir (Olt ve ark. 1990). Asıl kullanım alanı tansı konulmuş tümörün takibi ve tedaviye yanıtının değerlendirilmesi şeklindedir (Montag 1990). Kemoterapiye en duyarlı tümör tiplerinden biri olmasına rağmen, ovaryum kanserinde ölüm oranı halen yüksektir. Radyoterapi, immünoterapi ve hormon tedavisi, cerrahi ve kemoterapi sonrası uygulanabilen tedaviler arasındadır (Disaia ve Creasman 2003 pp 259-351).

2.3. HÜCRE VE DOKU KÜLTÜRÜ HAKKINDA GENEL BİLGİLER

2.3.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürleri hücrelerin tek hücreyi kapsayacak şekilde, doku olarak düzenlenmede in vitro çoğalmasdır. Organizmadan doğrudan doğruya alınan organ, doku veya hücrelerden üretilen kültürlere primer kültürler adı verilir. Primer kültürler, bulundukları yerde çoğalıp başka bir yere bölünerek aktarıldıktan (hücre pasajı) sonra hücre soyu (cell line) adını alırlar.

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

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

Günümüzde, hücre kültürleri esas olarak iki yolla üretilmektedir: Tek tabaka hücre kültürleri ve süspansiyon halinde hücre kültürleri. Tek tabaka hücre kültürleri, cam veya plastik zemin üzerine tutunarak yaşayan, işlevlerini sürdüren ve üreyen hücrelerdir. Süspansiyon halindeki hücre kültürlerinde, hücreler hayatsal işlev ve

üremelerini süspansiyon halinde bulundukları ortamda sürdürebilir. Doku kültürü ve yöntemleri kullanarak, 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.

Hücre Kültürlerinin Kullanım Alanları

Bugün için moleküler tanı ve tedavi amaçlı başta olmak üzere çok sayıda özellikle araştırma amaçlı olmak üzere doku ve hücre kültürlerinden yararlanılmaktadır. Doku ve hücre kültürlerinin sağladığı avantajlar şöyledir:

- Aşı üretimi
- Antikor üretimi
- İlaçların sitotoksik ve sitotaktik etkilerinin ölçülmesi
- Hücre içi metabolizma olaylarının araştırılması
- Hormonların hücresel düzeyde etkilerinin araştırılması
- Kalıtım maddesi ve protein sentezi ile yapılan araştırmalar
- Hücre içi enerji metabolizması ile yapılan araştırmalar
- Hücre yüzey reseptörlerinin çalışılması
- Hücre sinyal mekanizmalarının çalışılması
- Hücrelerin beslenme özelliklerinin çalışılması
- Enfeksiyonun hücresel düzeyde etkilerinin çalışılması
- Hücresel farklılaşma ve yaşlanma ile ilgili araştırmalar
- Programlı hücre ölüm mekanizmaları ve bunlara hormonların, ilaçların çeşitli değişkenlerin etkilerinin araştırılması.
- Tümör hücrelerinin ilaç duyarlılığının saptanması ile ilgili araştırmalar.
- Radyoterapinin hücresel düzeydeki etkileri.
- Embriyonik araştırmaları üreme tekniklerinin geliştirilmesi ve pratikte kullanımı

- Hücre populasyon kinetiği ile ilgili yapılan araştırmalar
- Sitolojik, sitogenetik analizler ve genetik uygulamaların yapılması
- Gen aktarımı ile yapılan araştırmalar
- Hücre tutunma moleküllerinin çalışılması
- Hücresel düzeyde madde taşınmasının moleküler mekanizmaları
- Kök hücre araştırmaları
- Hücre ve doku mühendisliği ile ilgili yapılan araştırmalar ve uygulamalar.

Bugün için artık tek tabakalı ve süspansiyon hücre kültürlerinin ele alarak klinik faydalarını en üst düzeye çıkarmak üzere orijinal doku mikro çevre özelliklerinin yansıtan üç boyutlu kültür metotları geliştirilmiştir. Bu metotların içinde yumuşak agarda koloni oluşturma yöntemi ve multiselüler tümör sferoid yöntemleri gibi metotlar gelmektedir. Bu metotların en önemli avantajları arasında orijinal doku özelliklerini yansıtma sayılabilir (Bilir ve ark. 2004).

2.3.2. Sferoid

Multiselüler tümör sferoid (MTS) modeli laboratuvar koşullarında tümörlerin üç boyutlu yapısını yansıtır (Öktem ve ark. 2006). MTS modeli in vitro monolayer hücre kültürleri ve solid tümörler için model oluşturarak in vivo tümörler ve monolayer kültürler arasında bağlantı kurulmasına yardımcı olurlar (Öktem ve ark. 2006; Santini ve Rainaldi 1999). Sferoid kültürleri hem üç boyutlu organizasyonu hem de intakt dokuların farklılaşmış fonksiyonlarını monolayer kültürlerden daha iyi yansıtır.

3-D 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 (Öktem ve ark. 2006).

2.3.3. Hücre Siklusu

İki yavru hücre ortaya çıkarmak üzere birbirini izleyen iki mitoz bölünme arasındaki aralık hücre döngüsü (siklusu) olarak tanımlanır. Bu süreç iki aşamaya ayrılır:

1. İnterfaz
2. Mitoz (M Fazı) (Kierszenbaum 2002 pp 40-42).

İnterfaz da 3 evreye ayrılır:

1. G1 (Sentez öncesi)
2. S (DNA sentezi)
3. G2 (DNA eşlenmesi sonrası)

S evresi, DNA sentezi ve sentrozom eşlenmesinin başlamasıyla özellik kazanır. G1 evresi RNA ve protein sentezinin olduğu evredir. Sentezlenen bu proteinlerden bazılarının görevi; hücre döngüsünü kontrol etmek, hücre hacmini mitozdan sonra yarıya indirerek normal büyüklüğüne ulaştırmaktır (Aytekin ve Solakoglu 2006 pp 62-64).

G1 evresindeki hücreler ya DNA çoğalması için S fazına girerler ya da girmezler. S fazına girmeyen hücre G0 (G sıfır) fazı denen dinlenme dönemine girer. Hücreler bu evrede döngüye girmeden önce günlerce, aylarca, hatta yıllarca kalabilir (Kierszenbaum 2002 pp 40-42).

Sürekli bölünmeyen hücrelerde, hücre döngüsü faaliyetleri geçici veya kalıcı olarak durur. Kas ve sinir hücrelerini örnek olarak gösterebileceğimiz bu hücreler G0 evresinde kabul edilirler.

Hücre kültüründe, kültür ortamı serumdan yoksun bırakılırsa, hücreler çoğalmayı durdurup G0 evresine girerler. Serumun besi ortamına kattığı temel bileşen “büyüme faktörü” denilen özelleşmiş bir proteindir. Hücre S fazına girmeden önce G1 kontrol noktasında durdurulur. Eğer DNA hasarı meydana gelmişse hasar tamir edilir. Memeli hücrelerinde G1 kontrol noktasında durdurma, “p53” denilen protein aracılığıyla gerçekleşir. P53 proteinini kodlayan gen insan kanserlerinde mutasyona uğramıştır. Bunun sonucunda hücrenin hasarlı DNA’yı tamir etme yeteneği azalır. Hasarlı DNA’nın kalıtımla yavru hücrelere geçmesi, değişimlerin hızla çoğalmasına ve genomun kararsızlığına; bu da, kanser gelişmesine neden olur (Aytekin ve Solakoglu 2006 pp 62-64).

Hücre çoğalmasında önemli rolü olan hücre siklusunun en önemli olayı DNA kopyalanmasıdır (replikasyon). İnterfazın bu en belirgin olayı S fazında gerçekleşir.

Burada çekirdekdeki DNA iki katına çıkar (Kierszenbaum 2002 pp 40-42; Aytekin ve Solakoglu 2006 pp 60-64). G2 fazında, mitozda kullanılacak enerji biriktirilir, mitotik mikrotübüllere katılacak tübülünler ve kromozomal histon olmayan proteinler sentezlenir.

G2 fazında da kontrol noktası vardır. Hücre, bu noktada hatalı sentezlenmiş olan tüm DNA'ları düzeltilene kadar bekler. G2 fazında “MPF” (olgunlaşma başlatan faktör) adlı bir protein bileşiği birikmeye başlar. Bu bileşik, mitozun başlamasına, kromozomların yoğunlaşmasına, çekirdek kılıfının yırtılmasına ve mitozla ilgili tüm diğer olayların gerçekleşmesine neden olur (Aytekin ve Solakoglu 2006 pp 60-64).

2.3.4. Hücre Siklusunun Kantitatif Analizi

Bir hücre popülasyonundaki aynı cins hücrelerin hücre siklus süreleri tam olarak aynı değildir. Hücre siklusları ile ilgili kantitatif verilerin elde edilmesi amacıyla, iki ölçüm yapılır.

Bu ölçümlerden birincisi, popülasyonda mitoz bölünme yapan hücre sayısının tüm hücre sayısına oranının hesaplanmasıdır. Bu değere “Mitotik İndeks” (Mi) adı verilir. Eğer popülasyondaki tüm hücrelerin bölündüğü, hepsinin aynı hücre siklus süresine sahip olduğu ve bütün hücrelerin hücre siklusunun çeşitli fazlarına homojen olarak dağıldığı düşünülürse, mitotik indeks değerinden aşağıdaki eşitlik çıkabilir:

$$\text{Mitotik İndeks (Mi)} = T_m / T_c$$

T_m , mitoz fazının süresini, T_c ise hücre siklusunun toplam süresini belirtmektedir.

İkinci basit ölçüm ise, işaretlenmiş yani S fazındaki hücrelerin sayılarak bunların tüm hücrelere oranının saptanmasıdır. Bu değere de “Labeling İndeks” (LI) ya da “İşaretlenme İndeksi” denir.

$$\text{Labeling İndeks (LI)} = T_b / T_c$$

T_b , S fazı süresini, T_c ise toplam hücre siklus süresini göstermektedir.

Uygulamada bu iki yöntemle küçük miktarda ve tek bir örnekte mitotik indeks ve işaretlenme indeksi saptanarak hücre siklusuna kantitatif yaklaşımda bulunmak mümkündür. Bu olay özellikle insan dokuları ile yapılan çalışmalarda çok önemlidir (Özalpan 2001 pp 91-97).

2.3.5. İmmünohistokimya

İşaretlenmiş antikorlar kullanılarak hücre ve dokulardaki spesifik makromoleküllerin varlığını ve lokalizasyonunu saptamada kullanılan bir yöntemdir. Antijen-antikor reaksiyonu temeline dayanır. Organizmaya girdiğinde reaktif immün yanıt oluşturabilen maddelere immünojen; bu immünojenlerden kendilerine karşı spesifik antikor oluşturabilenlere ise antijen denir.

Antikor = İmmünoglobulin

Antijenik determinant/epitop

Antijen içeren doku kesiti + İşaretlenmiş antikor

(antijen) Aj + (antikor) Ak → Işık ve elektron mikroskopunda görünür.

İmmünohistokimya kullanılan antikorlar ikiye ayrılır:

- 1) Poliklonal antikor
- 2) Monoklonal antikor

Antikorların işaretlenmesinde 4 yöntem:

- Floresan bileşikle işaretleme

Dondurulmuş doku kesitleri, yaymalar ve hücre kültürlerinde tercih edilir.

Sekonder antikor uygulaması ve sonraki işlemler karanlıkta yapılır.

İmmünfloresan mikroskopla değerlendirilir. Diğerlerinden üstün tarafı sadece işaretlenen moleküller görülür, diğer kısımlar karanlıkta kalır.

- Enzimle işaretleme
 - Peroksidaz
 - Alkalen fosfataz
 - Glukoz oksidaz
- Elektron yoğun bileşikle işaretleme
 - Altın partikülü
 - Ferritin
- Biotinle işaretleme

Avidinin biyotine çok yüksek affinitesinden yararlanılır.

Streptavidin peroksidaz en sık kullanılır.

İmmunhistokimya yöntemi gerek ışık gerekse elektron mikroskopide; tek aşamalı (direkt) veya iki aşamalı (indirekt) yöntem olmak üzere iki şekilde uygulanabilir.

- Direkt yöntem

- Gösterilmek istenen antijene özgü antikor yöntemlerden herhangi biri ile işaretlenir. İşaretli antikoru dokudaki antijenle reaksiyona girmesi sağlanır.
- Tek basamaklı olduğundan hızlı yapılır. Ancak primer antikor işaretlendiği için antikoru reaksiyon gücünde azalma olabilmektedir.
- Özgül olmayan reaksiyonlar azdır.
- Hassasiyeti düşüktür. Bu nedenle nadiren kullanılır. Yerini iki aşamalı yönteme bırakmıştır (Demir 2001).

- İndirekt yöntem

- Primer antikorların yanı sıra sekonder antikorlar da kullanılır.
- Primer antikor değil sekonder antikor işaretlenir.
- Birinci aşamada işaretsiz primer antikor antijene bağlanır.
- İkinci aşamada işaretli sekonder antikor primer antikoru tutucu bölgesi ile reaksiyona girer, böylece antijen iki aşamada işaretlenmiş olur.
- Önemli olan, antikorlar farklı hayvanlarda geliştirilmiş olmalıdır.
- Daha hassas ve güvenilirdir. Primer antikor ile birden fazla sekonder antikor bulunabilir ve daha güçlü bir işaretlenme elde edilebilir (Demir 2001)

2.3.6. BrdU

5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU); timindeki metil grubu yerine bromin atomu içerir. DNA sentezini tayin etmek için timidin protokolüne eşdeğer bir protokoldür. BrdU DNA içine girer ve anti- BrdU monoklonal antikoru ile boyanarak sayım yapılabilir veya ELISA ile ölçülebilir (Babich ve ark 2000).

2.4. PROJEDE KULLANILAN İLAÇLAR

2.4.1. Vinoralbin (Navelbine)

Navelbine; 50 mg. Vinoralbine eşdeğer Vinoralbin Ditartarat içerir.

Vinoralbin vinka alkaloid olan vinblastin'in semi sentetik bir türevidir.

Mikrotübüller hücre iskeletinin dinamik elemanıdır. Hücre şeklinin korunması, hücre sinyalleşmesi, kromozom göçüyle meydana gelen mitoz, veskül ve organel taşıma mekanizması gibi birçok hücresel fonksiyonda önemli rol oynarlar. Bu nedenle mikrotübüller anti kanser ilaç ailesinden anti tübülün ajanlarının hedefidirler.

(Carré ve ark. 2002).

Vinka alkaloidler özellikle tübülünlere bağlanarak onları depolimerize ederler. Böylece hücre devrinin G2/M fazında tutulu kalmasına sebep olurlar (Hanley ve ark. 1998; Türkölmez ve ark. 2003; Okouneva ve ark. 2003). Tübülünler mikrotübül yapısını oluşturan polimerlerdir. Mikrotübüller, hücre şeklinin, hareketinin, adhezyonunun, ve interselüler integritenin sürdürülmesinde proliferasyon sırasında mitotik iplik oluşumunda rol alarak katkıda bulunurlar.

Vinka alkaloidler tübülünde lokalize olan mitokondriyal membranlara bağlanan ilaçlardır (Carré ve ark. 2002). Yani mitotik iplik oluşumunu inhibe ederek hücre devrinin tutulu kalmasına ve apoptoza neden olurlar. Mitokondriyal membranların yıkılması ve sitokrom c'nin salınımı apoptoza neden olur (Gidding ve ark. 1999; El Hafny ve ark. 1997).

Mitotik mikrotübüllerin tübülünlerine bağlanarak hücre büyümesini durdurur. Kanser hücrelerinde apoptozu ilerletir.

Diğer vinka alkaloidlere göre daha az nörotoksisiteye sahiptir. Vinoralbinin ilk dozundan sonra yaklaşık 30 dakika içinde tümör bölgesinde akut ağrı sendromu meydana gelebilir. Vinoralbin nöraljik ağrıya sebep olur. Ağrı non-steroid anti-inflamatuar ilaçlar veya kortikosteroidlerle geçebilir .

Vinoralbin meme kanserini, lösemileri, lenfomaları, akciğer kanserlerini içeren çeşitli kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Cragg ve Newman 2005).

2.4.2. Asetaminofen

Para-aminofenol türevi non-steroid antiinflamatuvar (NSAI) veya narkotik olmayan analjeziklerdendir. Ağrı kesici (analjezik) ve ateş düşürücü (antipiretik) etkisi yüksek olan ancak antiinflamatuvar etkinliği yok denecek kadar düşük olan bir ilaçtır (Oulet ve Percival 2001). Asetaminofen antiinflamatuvar ilaçların analjezik etkisini arttırmak için onlarla birlikte kullanılabilir. Antitombositik etkinliği zayıftır; kanama süresini değiştirmez. Asetaminofen, diğer analjeziklerden farklı olarak, hipotalamus ve omurilik gibi peroksitlerden az ortamda prostaglandin sentezini inhibe edebilir; antipiretik ve analjezik etkilerini hipotalamus ve omuriliğin arka boynuzunda prostaglandin sentezini inhibe ederek gösterir (Kayaalp 2000).

Çabuk absorbe edilir ve etkisini erken gösterir. Plazma düzeyi ½-1 saatte en yüksek seviyeye ulaşır.

Hayvan çalışmalarında asetaminofenin antigonadotropik etkilerinin varolduğuna dair ilginç bir kanıt vardır. Asetaminofen östradiol benzer şekilde bir fenol halkası içerir ve progesterona benzer olarak da asetil grubu içerir (Cramer 1998).

Hızlı bir şekilde mide ve ince barsaktan absorbe edilir ve karaciğerde toksik olmayan bileşiklere konjugasyonla metabolize olur.

Özellikle asetaminofen glutatyon reaksiyonu için gerekli olan sülfat veya glukoronide bağlanarak karaciğerde metabolize edilir (Pasha ve Vijayan 1989). Çünkü glutatyon hem FSH salınımında hem de onun reseptöre bağlanmasında gereklidir, asetaminofen metabolizmasından glutatyon yokluğunda FSH'ın etkili konsantrasyonunu azaltmıştır. FSH değerlerinde yükselmeye birlikte oluşan ovaryum fonksiyonunun kaybı tümör anjiogenezini ilerletir (Schiffenbauer ve ark. 1997).

Epidemiyolojik çalışmalar NSAII kullanan insanlarda kolorektal kanserinden mortalitede % 40-50 düşüş olduğunu göstermiştir.

Epitel hücrelerindeki COX enzimlerinin fazla eksprese edilmesi apoptozu inhibe edebilir ve tumor hücrelerinin invazyonunu arttırabilir (Rodríguez-Burford ve ark. 2002).

NSAII'ler COX inhibitörüdürler. Siklooksijenazlar araşidonik asidin çeşitli prostoglandinlere ve tromboksanlara dönüşümünü katalizleyen enzimlerdir (Tseng ve ark. 2002). Siklooksijenazın iki izoformu vardır:

Siklooksijenaz-1 (COX-1): 66 kilodalton (kD) ağırlığında bir proteindir ve normal dokularda eksprese edilir.

Siklooksijenaz-2 (COX-2): 70 kD ağırlığında bir proteindir. Normal dokularda çok düşük düzeyde eksprese edilir veya hiç eksprese edilmez (Castilla ve ark. 2003). İmmun hücrelerde ve bazı malign tümörlerde aşırı eksprese edilir (Vona-Davis ve ark. 2004).

Son yıllarda NSAII'ler tarafından module edilen farklı yollar aydınlatıldı, ki bunlar onların anti-inflamatuar ve anti-tümör etkilerini açıklıyor. Major transkripsiyon faktörü NF-kB'nin süpresyonu, NSAII'lerin hem anti-tümör hem de anti-inflamatuar etkilerini göstermede dominant hedefleri olduğunu açığa çıkardı .

Epitelyal ovaryum kanserleri boyunca COX-1 aşırı ekspresyonu meydana gelir ve COX-1 bu tümörlerin anjiogenesisine aracılık eder. Asetaminofen zayıf COX inhibitörüdür.

Ovaryum kanserleri tümör ilerlemesine katkıda bulunan inflammatuar mekanizmalarının hatalı kullanımının söz konusu olduğu tümör tiplerindendir.

Ovaryum kanserinin ilerlemesi COX-2 ekspresyonunun artması, inflammatuar prostoglandinlerin sentezinin artması ve prostometastatik tromboksan A2 varlığı ile birlikte olur.

Asetaminofen'in ovaryum karsinogenesisini inhibe etme aktivitesi COX-2 aktivitesini azaltma gücü ile ilgilidir. (Bardos 2005 pp 97-133).

NF-KB (Nükleer Faktör kappa B) hücre stresinde apoptozise karşı koyan, hücre çoğalmasını hızlandıran ve hormona duyarsız tümörlerde örneğin prostat kanserlerinde yapısal olarak yüksek düzeylerde aktif olan bir transkripsiyon faktörüdür (Sharma ve Narayanan 1996).

Bu aktivasyonun sebebi de onu kontrol eden proteinin (IkappaB: Nükleer faktör kappa b inhibitörü) parçalanmasına yol açan IkappaB kinaz (IKK)'lardır NSAII'lerin de bir başka önemli hedefi de IKK'lardır (Struewing ve ark. 2007).

2.4.3. Lityum Klorür

Lityum klorür bipolar hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan terapötik bir ajandır (Struewing ve ark. 2007). Temel hedefi “glikojen sentetaz kinaz-3β

(GSK-3 β)’dır”. GSK-3 β , protein sentezi, hücre proliferasyonu, farklılaşması, hareketi ve apoptozu kontrol eden çeşitli sinyalleşme yollarında önemli rolü olan bir serin/treonin kinazdır. (Lin ve ark. 2007; Zaragosi ve ark. 2008). GSK-3 β wnt sinyal yolunda rol alır. β katenini defosforile ederek nüklear birikimine neden olur (Zaragosi ve ark. 2008).

Lityum, inositol monofosfataz enzimini inhibe ederek inositolun fosfoinositid siklusundaki dönüşümlü kullanımını bozar, inositolün ve ona bağlı olarak da fosfoinositidlerin ve ikincil habercilerin eksikliğine yol açar (Berridge ve Irvine 1989). Asetilkolin, norepinefrin, serotonin ve glutamat gibi agonistler G proteinleri ile bağlantısı olan özel hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanırlar. Bu proteinler de fosfolipaz C (PLC) enziminin belli izoformlarını uyarırlar. Aktive edilmiş PLC ise fosfatidil inositol 4,5-bifosfat’ın (PIP₂), inositol 1,4,5 trifosfat (IP₃) ve diaçilgliserol (DAG) olmak üzere iki ikincil haberciye çevrilmesini katalize eder. IP₃, hücre içi kalsiyumunun mobilizasyonunu sağlarken, DAG, protein kinaz C’yi aktive eder. IP₃, fosfatlanabilir veya defosfatlanabilir; böylelikle diğer inositol fosfat moleküllerini veya inositolu oluşturabilir. Oluşan serbest inositol ise basamaklı bir biçimde fosfatlanarak fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositolfosfat (PIP), PIP₂’ı oluşturup dönüşümlü bir biçimde yeniden kullanılır (Manji ve ark. 1999).

Beyinde myo-inositol primer olarak inositol fosfatların dönüşümlü kullanılmalarından elde edildiği için, bir hücrenin yeterli myo-inositol depolarını koruyabilmesi, fosfoinositidlerin yeniden sentezlenebilmesi ve etkin sinyal iletimi için zorunludur (Manji ve ark. 1999).

Lityum tedavi edici yoğunluklarında inositol monofosfataz enzimini inhibe eder ve böylece inositol monofosfat düzeylerini arttırırken, serbest inositol düzeylerinde bir azalma meydana getirir. Ayrıca lityum inositol fosfatların serbest inositola dönüştürülmesinde rol oynayan inositol polifosfat 1-fosfataz (IPP) enzimini de inhibe eder (Manji ve ark. 1999; Renshaw ve ark. 1986). Bu yüzden, lityumun beyinde yarattığı fizyolojik etki, beyinde serbest myo-inositol düzeylerinin azalmasına ve fosfoinositid döngüsünün etkinliğini kaybetmesine, sonuç olarak reseptör uyarısına yanıt olarak salgılanan nörotransmitter düzeylerinin düşmesine bağlanmıştır. Ayrıca bu etkinin en aktif nöronlarda daha belirgin olmasının bekleneceği ve bunun da lityumun hem manik, hem de depresif episodtaki etkinliğini açıklayabileceği öne sürülmüştür

(Nahorski ve ark. 1991). Fosfoinositid sistemi dışında lityum tarafından etkilenen bir başka ikincil haberci sistemi siklik adenozin monofosfat (cAMP) oluşumunu katalize eden adenil siklaz enzim sistemidir. Her iki sistem de hücre yüzeyi reseptörleriyle doğrudan bağlantılıdır. Lityum bu sistemler üzerindeki etkilerini hücre yüzeyi reseptör yoğunluklarında herhangi bir değişiklik yapmadan oluşturduğundan, lityumun fizyolojik etkilerinin reseptörlerle doğrudan ilişkileri bulunan G proteinleri üzerinden olabileceği düşünülmüştür.

G proteinleri hücre zarı içinde yer alan, reseptör ile sinyal ileti sistemleri arasında bağlantı kuran ve küçük protein ünitelerinden oluşan protein kompleksleridir. (Manji ve ark. 1999; Lenox ve ark. 1998).

Protein kinaz C ailesi insan beyinde farklı oranlarda dağılım gösteren ve fosforilasyon yapan en az 12 adet izoenzimden oluşur. Herbir izoenzimin, ikincil haberci uyarıcıları, substrat afiniteleri (enzim tarafından katalize edilen tepkimelerdeki öncül madde duyarlılıkları) farklı olup, farklı hücresel işlevlerde rol oynarlar (Huang 1989; Nishizuka 1992; Tanaka ve Nishizuka 1994). Kronik lityum uygulamasının sıçan beyni hipokampusunda ve insan hücre kültürlerinde, membranla ilişkili protein kinaz

C-a ve -e izoformlarında anlamlı bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Manji ve ark. 1996; Manji ve ark. 1993). Lityum klorür protein kinaz C- α 'nın miktarını düşürür. PKC'nin nöral sinyal iletiminin düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğu düşünülürse, bu etkiler LiCl'ün ruh halini stabilize etme etkisinde önemli bir rolü olduğunu gösterebilir (Bitran ve ark. 1995). Li östradiol ile uyarılmış çoğalmayı ve uterustaki morfogenezin değişimleri artırır. Bu etki, uterustaki GSK-3 β 'nin, östrojen reseptörü α 'nın, β kateninin ekspresyonunun azalmasıyla ilgilidir (Gunin ve ark. 2004; Yıldız ve Tunca 2001).

P53 stabilizasyonunu uyarır. P53'ün stabilizasyonu ve p21'in uyarılması hücre devrinin G1/S veya G2/M noktalarında tutulu kalmasını sağlar (Mao ve ark. 2001).

Lenox ve arkadaşları (1992), kronik lityum tedavisinin sıçan hipokampusunda miristollenmiş (myristoylated) alenin-zengin C kinaz substratı (MARCKS) proteininde azalmaya yol açtığını bulmuşlardır. MARCKS beyinde protein kinaz C substratıdır ve fosforilasyon yolu ile protein kinaz C'nin hücresel yerini ve etkinliğini düzenler. MARCKS kalsiyuma bağımlı olarak kalmodulin ile bağlanır ve filamentöz aktinin çapraz bağlantılarının oluşmasında rol oynar. Böylece hücre iskeletinin yeniden

yapılanmasına ve nöroplastisitenin (sinyal iletimi ve nörotransmitter salınımı gibi işlevlerde) sağlanmasına katkıda bulunur (Lenox ve ark. 1996; Yıldız ve Tunca 2001). GSK-3 β ovaryum kanser hücre çoğalmasında önemli bir rol oynamaktadır (NF-kB aracılı). Bu nedenle, geleneksel kemoterapinin ve GSK-3 β inhibitörünün kombinasyonu ovaryum kanser hastalarının sağ kalımı için faydalı olabilir (Qui ve ark. 2006).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN MADDELER

3.1.1. Kimyasal Maddeler

NaOH (Merck 106495), NaCl (Merck 106406), Na₂HPO₄ (Merck 106586), NaH₂PO₄ (Merck 106346), Absolü etanol (Merck 100983), HCl (Merck 113386), Metanol (Merck 106008), H₂O₂ (Merck 108597), Toluol (Riedel-de Haen), Phenol red (Merck 107241), Trypan blue (Fluka GA 11761), KCl (Merck 104934), Poly-l-lysine solusyonu (Sigma P8920), KH₂PO₄ (Merck 105108), KCl (Merck 104934), Formaldehit (Riedel-de Haen), NaHCO₃ (Merck 3011729), Agar (Gibco 00391M), Parafin wax (Kimetsan KIM-PNB/O1CP/040220), CaCl₂ (Merck 2380).

3.1.2. Enzimler

Trypsin (Sigma T4799)

3.1.3. İlaçlar

Navelbine (Pierre Fabre Medicament)

LiCl (Sigma-Aldrich L4408)

Acetaminophen (Bristol Myers Squibb 500 mg.)

3.1.4. Kitler

BrdU (Sigma T4799)

Ultra V block (Lab Vision TA-060-UB)

NCL-BrdU Mouse Monoclonal (NeoMarker MF-1848-PO)

Ultra Vision Detection System Anti- Mouse HRP (Lab Vision TM-060-HL)

Large Volume AEC Substrate System (Lab Vision TA-125-HA)

Ultramount (Lab Vision TA-060-UM)

3.1.5. Diğer Maddeler

Fötal Sığır Serum (Sigma SF-7524)

RPMI-1640 (Biological Industries)

3.2. KULLANILAN GEREÇLER

1. İnkübatör (Sanyo)
2. Laminar Akım Kabini (Tezsan)
3. Su Banyosu (Nüve)
4. Etüv (Hereaus)
5. Otoklav (Victor Recker)
6. İnvirt Mikroskop (Leitz)
7. Manyetik Karıştırıcı (RÜHROMAG)
8. Mikrotom (Leica)
9. Santrifüj (Sigma 2-16K)
10. Pipet Aid (Drummond)
11. Derin Dondurucu (Arçelik)
12. Buzdolabı (Bosch)

3.3. KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.3.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler

CMF-PBS

8 gr NaCl

0.25 gr KCL

0.25 gr KH_2PO_4

1.44 gr Na_2HPO_4

0.01 gr Phenol red tartılarak 1 lt bidistile su içine konarak karıştırıldı.

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

NaHCO₃

8,8 gr NaHCO_3 ve 0,01 gr Phenol red tartılarak 200 ml bidistile su içerisine kondu ve karıştırıldı. Otoklavda 121°C, 3 Atm basınçta 15 dk steril edildi.

TRIPSIN

3 gr tripsin 100 ml CMF-PBS içerisine kondu. Manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra milipor filtreden süzülerek steril edildi.

AGAR

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

TRİPAN MAVİSİ

100 ml PBS içerisine 100 mg tripan mavisi katıldı ve filtre kağıdından süzüldü.

3.3.2. İmmünohistokimya Kullarılan Çözeltiler

PBS

11,5 gr Na_2HPO_4 ; 2,96 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ ve 5,84 gr NaCl 1 lt distile suya kondu ve karıştırıldı. pH 7,6'ya ayarlandı.

H₂O₂

1,5 ml H₂O₂; 98,5 ml metanole konu.

Solüsyon taze hazırlandı.

HCl

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

Solüsyon taze hazırlandı.

$$\underline{\%5 \text{ CaCl}_2}$$

5 gr CaCl_2 100 ml distile suda çözündürüldü.

NaOH

1 gr NaOH 100 ml distile suda çözündürüldü.

TRIPSIN

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

3.4. 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 Dalında ışık mikroskobu ve hücre kültürü laboratuvar imkanları kullanılarak gerçekleştirildi.

Araştırmada Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu (ATCC) hücre bankasından sağlanan MDAH 2774 (CRL no: 10303) hücre soyu kullanıldı.

MDAH 2774 ovaryum tümör hücreleri için besi ortamı, inaktive edilmiş %10 FCS, 100 IU/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin içeren RPMI-1640 (Biological Industries) medyumunu kullanıldı.

Hücreler bu besi ortamını 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 (Victor Recker), stokların -20°C'de depolanması için derin dondurucu (Arçelik) kullanıldı.

3.4.2. Doz Belirleme Deneyi

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

Hücreler flasklardan 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve üzerlerine tripsinin etkisini ortadan kaldırmak için tripsinle eşit miktarda medyum eklendi. Hücreler 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi ve medyum-tripsin karışımı uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine medyum konarak süspansiyon haline getirildi ve hemasitometride sayıldı.

Deneylerde 6 kuyucuklu kültür kapları (six-well plate) kullanıldı. Pleytlerin her kuyucuğuna %100 canlı 500.000 MDAH-2774 hücresi 5 ml RPMI-1640 medyumunu içinde ekildi.

Vinoralbin, Lityum Klorür, Asetaminofen ilaçlarının herbiri için 1; 10; 100; 200 μ M konsantrasyonlarda olacak şekilde steril bidistile suda hazırlanmış taze çözeltileri 100'er μ l'lık eşit hacimlerde hücrelere verildi.

Her bir ilacın her bir dozu için 3'er kuyucuğa ekim yapıldı. Tüm gruplar için 24, 48 ve 72. saatler için ekildi ve 37°C'de %5 CO₂ hava karışımında rutubetli ortamda inkübe edildi.

24, 48, 72. saatlerin sonunda kuyucuklarda bulunan hücreler %5 tripsin ile ayrı ayrı toplanıp santrifüj edildi. Süpernatant kısımları atıldıktan sonra 1 ml medyum ile süspansiyon haline getirilip sayma kamerasıyla (hemasitometri) sayıldı. Toplam hücre sayıları kaydedildi.

ID50 (Inhibition dose %50) Vinoralbin için 10 μ M, Lityum Klorür ve Asetaminofen için 100 μ M olarak saptandı (Bilir ve ark. 2002).

3.4.3. Tutunma (Proliferasyon) Deneyi ve Canlılık Tayini

6'lı kültür kaplarının her bir kuyucuğuna 500.000 hücre 5 ml medyum içerisinde ekildi.

Gruplar şöyleydi:

Kontrol

Vinoralbin

Lityum Klorür

Asetaminofen

Vinoralbin + Lityum Klorür

Vinoralbin + Asetaminofen

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

%0,1'lik tripan mavisi boyasıyla, hücre solüsyonu 1/1 oranında hazırlandı ve lam lamel arasına konarak mikroskopta sayıldı. Böylece canlı hücre oranları saptandı (Bilir ve ark. 2002).

3.4.4. İki Boyutlu Kültürlerde Bromodeoksiüridin ile İmmünohistokimyasal İşaretleme

24 kuyucuklu kültür kaplarına yuvarlak lameller konularak kuyucuk başına 100.000 hücre lamel üzerine ekildi ve hücrelerin yapışması için 2 saat beklendi. Hücreler yapıştıktan sonra her bir kuyucuğa 1 ml medyum konuldu. Vinoralbin'in 10 μ M dozu, Lityum Klorür'ün 100 μ M dozu, Asetaminofen'in 100 μ M dozu kullanıldı. 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda hücreler 1 saat BrdU ile 37°C'de inkübe edildi. Üst medyum çekilip atıldıktan sonra PBS'TE 37°C etüvde 15 dakika bekletildi. PBS çekilip atıldıktan sonra %70 etanolde 30 dakika bekletilerek hücreler tespit edildi.

İmmünohistokimya için lameller PBS'te 10 dk bekletildikten sonra metanolde hazırlanmış %0.5 H₂O₂'de 20 dk karanlıkta tutuldu. 30 dk 4 N HCl'de bekletilip PBS ile 3 kez 5 dk yıkandı. 20 dk Ultra-V-block'un ardından 1 saat primer antikorda, (NCL-BrdU Mouse monoclonal) nemli ortamda oda ısısında tutuldu. 3 kez PBS ile 5'er dakika yıkandıktan sonra sekonder antikorda (Biotinylated Goat Anti-Mouse) 20 dk, tekrar yıkamadan sonra streptavidin peroksidazda yine 20 dk tutuldu. PBS ile yıkamanın ardından substrat-kromojende (AEC Substrate System) 15 dk karanlıkta bekletildi ve distile su ile yıkandı. Mayer Hematoksilen ile zemin boyası yapıldıktan sonra kesitler çeşme suyunda 20 dk morarmaya bırakıldı. Kapatıcı (Ultramount) ile kapatıldı. Işık mikroskopunda sayım yapılarak işaretleme oranları belirlendi.

3.4.5. Sferoid Ekimi

6'lı kültür kapları kullanıldı. Sıcak su içerisinde eritilmiş %3 Agar solusyonu (60°C) ve medyum (40°C) karışımı ¼ oranında hazırlandı ve kuyucuklara bu karışımdan 1 ml konarak tüm yüzeyinin kaplanması sağlandı. Agarın donması için kültür kapları 10 dakika buzdolabında +4°C'de bekletildi.

Hücreler doz inaktivasyon deneyinde bahsedilen hücre toplama tekniğiyle toplandı ve her bir kuyucuğa 1.000.000 hücre donmuş agar üzerine konan 3 ml medyum içerisinde ekildi. Her bir grup için 1 kuyucuğa ekim yapıldı.

Gruplar şöyleydi:

Kontrol

Vinoralbin

Lityum Klorür

Asetaminofen

Vinoralbin + Lityum Klorür

Vinoralbin + Asetaminofen

37°C’de %5 CO₂ hava karışımında rutubetli ortamda tutulan hücrelerin sferoid oluşturulması için 7 gün beklendi. 7 gün sonunda ilaçlar doz belirleme deneyinde belirlenen dozlara göre verildi. İlaçlar verildikten 24 saat sonra 1 saat BrdU ile 37°C’de inkübe edildi. Sferoidler santrifüj tüplerine dikkatlice alındı. Üst medyumunu pastör pipeti ile yavaşça çekilip atıldı.

5 dk PBS’te bekletildikten sonra tespit solusyonu %10’luk formaldehitte 30 dk oda ısısında bekletildi. 5 dk PBS konulduktan sonra üst sıvı çekilerek filtre kağıdından süzölmüş taze yumurta akı konuldu. 3000 rpm’de 15 dk santrifüj edildi ve yumurta akının fazlası çekildi ancak bir miktarının kalması sağlandı. Üzerine %70 etanol konarak 7 gün oda ısısında yumurta akının sertleşmesi için bekletildi. Tüplerin kesilmesiyle dikkatlice çıkarılan sferoidler ışık mikroskopi takibine alındı.

3.4.6. Sferoidlerin Işık Mikroskobu Takibi

%70 etanolde 30 dk (Oda ısısında)

%90 etanolde 30 dk (Oda ısısında)

%96 etanolde 30 dk (Oda ısısında)

%100 etanolde 30 dk (Oda ısısında)

%100 etanolde 30 dk (Oda ısısında)

Toluolde 30 dk (Etüvde (56°C))

Parafinde 45 dk (Etüvde (56°C))

Bekletildikten sonra gömülerek parafin bloklar hazırlandı. 4 µm kalınlığındaki kesitler Poly-l-Lysine ile kaplanmış lamlara alındı.

3.4.7. Üç Boyutlu Kültürlerde Bromodeoksiüridin ile İmmünohistokimyasal İşaretleme

Kesitler deparafinize edildi (Toluol: 30 dk x 2; %100 etanol: 5dk x 2; %96 etanol 5 dk x 2; %90 etanol 5 dk x 2; %70 etanol 5 dk x 2; saf su). PBS’te 20 dk bekletildi. Metanolde hazırlanmış %0.5 H₂O₂’de 20 dk karanlıkta bekletildi. PBS ile 3

kez yıkandı. Tripsinde 30 dk 37°C etüvde bekletildikten sonra 5 dk PBS'te ve 30 dk HCl'de yine 37°C etüvde bekletildi. 20 dk Ultra-V-Block'un ardından 1 saat primer antikorda nemli ortamda oda ısısında tutuldu. PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra sekonder antikorda 20 dk, PBS ile yıkamadan sonra streptavidin peroksidazda 20 dk, tekrar yıkamanın ardından substrat-kromojende (AEC Substrate System) 15 dk karanlıkta bekletildi ve distile su ile yıkandıktan sonra Mayer Hematoksilen ile zemin boyası yapıldı ve çeşme suyuna alındı. Çeşme suyunda morartılan kesitler kapatıcı ile kapatıldı.

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

3.5. İSTATİKSEL YÖNTEM

Yapılan deneylerden elde edilen verileri değerlendirmede SPSS 10.0 istatistik programı kullanıldı. Ölçüm değerleri homojen dağılım göstermediği için non-parametrik testlerle çalışıldı. Gruplar arası farkın anlamlılığını değerlendirmede Kruskal-Wallis Varyans analiz testi kullanıldı. Anlamlı bulunan varyans analiz sonuçları Mann-Whitney U ile sorgulandı. Anlamlılık sınırı $p < 0.005$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Proliferasyonunun Kinetik Deneylerinin Bulguları

Kontrol grubunda 24 ve 72. saatler arasındaki zaman dilimi boyunca hücre sayısında sağlıklı bir yükseliş gözlemlendi (şekil 4-1).

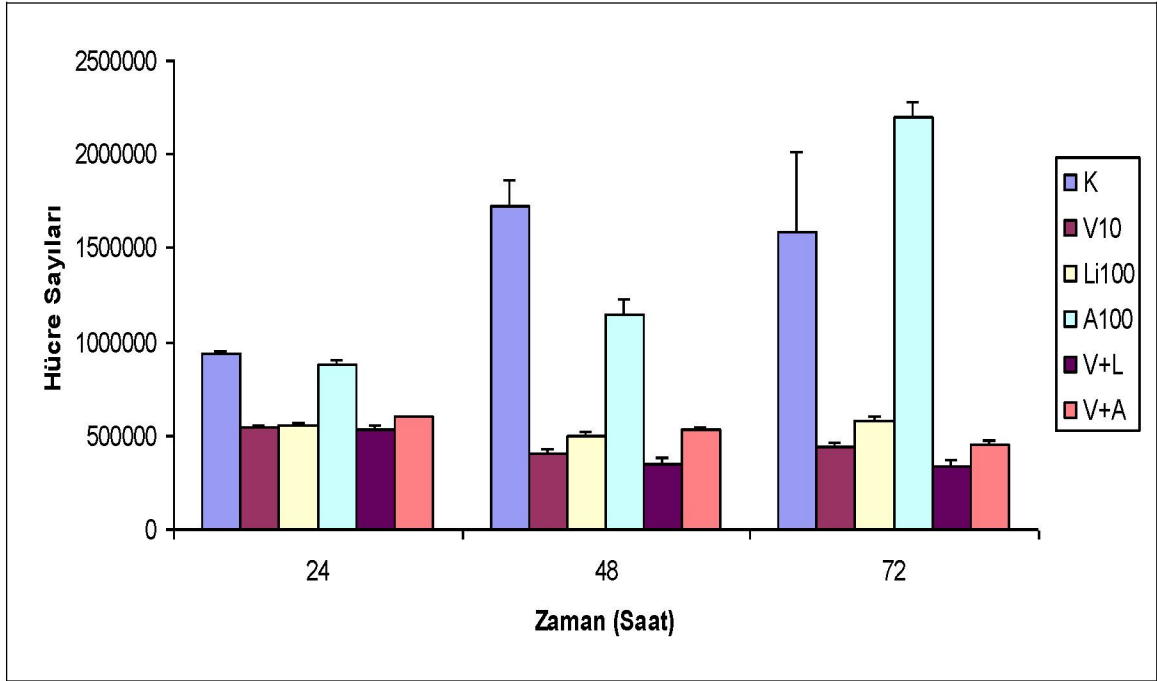
Vinoralbin grubu tüm saatler için hücre sayısını azaltmak üzerinde anlamlı bir etki gösterdi ($p < 0.05$). Vinoralbin'in hücre sayısını azaltmada doz-bağımlı etki gösterdiğini gördük (şekil 4-1, 4-2).

Lityum grubu 24. ve 48. saatler için kontrol grubuna göre anlamlı derecede ($p < 0.05$) hücre sayısında azalma gösterdi. 72. saatte de hücre sayısında azalma görüldü fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$), (şekil 4-1).

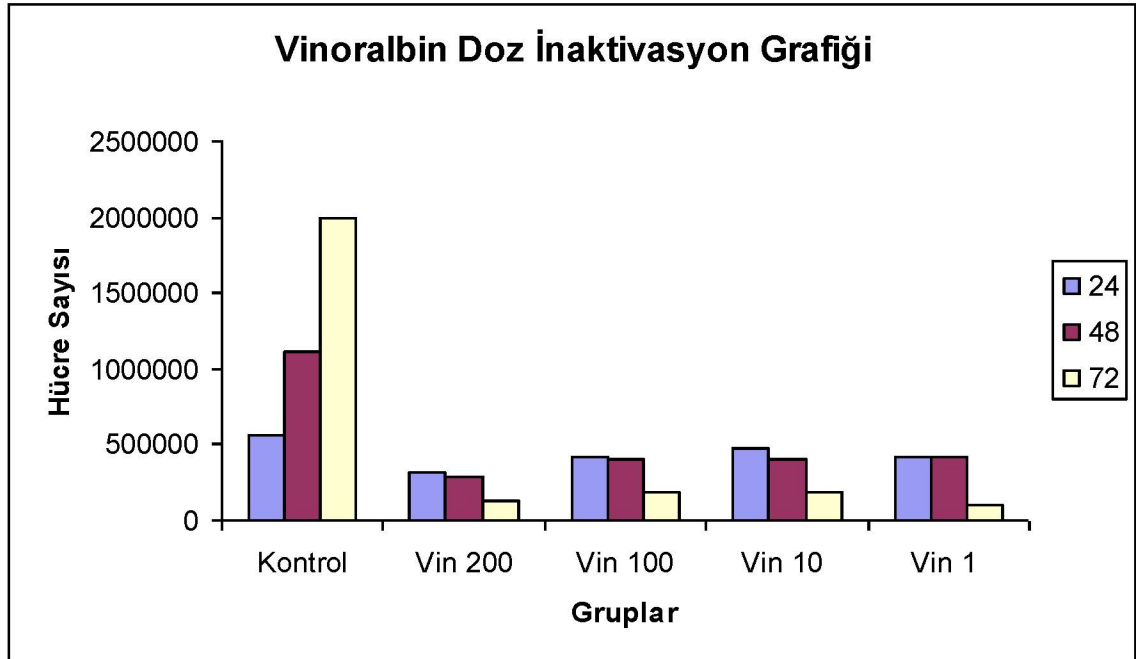
Asetaminofen grubu ilk 24 saat için hücre proliferasyonu üzerine etki etmedi ($p > 0.05$). Ancak 48. saat için anlamlı ölçüde hücre tutunmasını azalttı ($p < 0.05$). 72. saatte ise Asetaminofen grubu kontrol düzeyindedir ($p > 0.05$), (şekil 4-1).

Vinoralbin + Lityum, Vinoralbin + Asetaminofen kombinasyon gruplarında bu ilaçların birlikte kullanılması kontrole göre 24. ve 48. saatler için hücre sayısını önemli ölçüde azalttı ($p < 0.05$). 72. saatte de bu gruplarda hücre sayısında azalma gözlemlendi fakat bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$), (şekil 4-1).

Vinoralbin ile Asetaminofen kombinasyon grubuna baktığımızda ekstra editif veya sinerjistik etki göstermediğini gördük.



Şekil 4-1: Zamana Bağlı Hücre Çoğalma Verileri



Şekil 4-2: Vinoralbin'in Doz İnaktivasyon Grafiği

4.2. İki boyutlu Kültürlerde BrdU İşaretlenme Değerleri

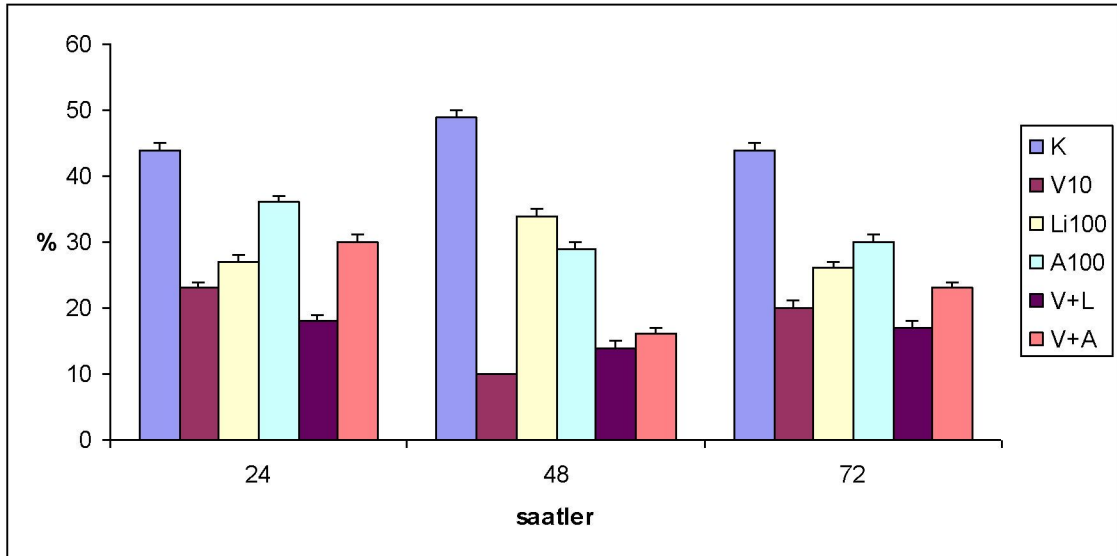
Kontrol grubunda çok sayıda sentez fazında hücre BrdU ile işaretlendi. İki boyutlu hücre kültürlerinde BrdU-LI sonuçlarımıza göre hücre yaşlanmasına ve kontakt inhibisyona bağlı olarak 72. saatte kontrol grubunda bir azalma gözlemlendi (Şekil 4-6, 4-7).

Vinoralbin grubundaki hücrelerde BrdU indeksi 24. ve 48. saatlerde azalmıştır, 72. saatte artmasına rağmen kontrole göre bu saatte de azalma göstermiştir (Şekil 4-8, 4-9).

Lityum grubundaki hücrelerde BrdU indeksi tüm saatlerde kontrol grubuna göre bir azalma göstermiştir (Şekil 4-10, 4-11).

Asetaminofen grubunda tüm saatlerde kontrol grubuna göre bir azalma göstermiştir (Şekil 4-12, 4-13).

İzlenen tüm saatlerde Lityum ve Asetaminofen'in ayrı ayrı Vinoralbin ile kombinasyonlarında vinoralbin sitotoksitesitesi üzerine tek tek meydana getirdikleri BrdU indeksindeki azalmaya ek olarak editif veya sinerjistik etki göstermemişlerdir (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: İki Boyutlu Kültürlerde BrdU İle İşaretlenme Grafiği

4.3. Üç Boyutlu Kültürlerde BrdU İşaretlenme Değerleri

Üç boyutlu hücre kültürlerinde BrdU-LI sonuçlarımıza göre kontrol grubunda çok sayıda hücre BrdU ile işaretlendi. Kontrol grubunda işaretlenme değeri %18,7 olarak belirlendi (Şekil 4-22).

Vinoralbin grubunda işaretlenme azdı. İşaretlenme değeri %7,8 olarak belirlendi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında Vinoralbin istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p < 0.05$) sentez fazı inhibisyonu yarattı (Şekil 4-23).

Lityum grubunda işaretlenme değeri %7 olarak belirlendi. Lityum etkisi kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$).

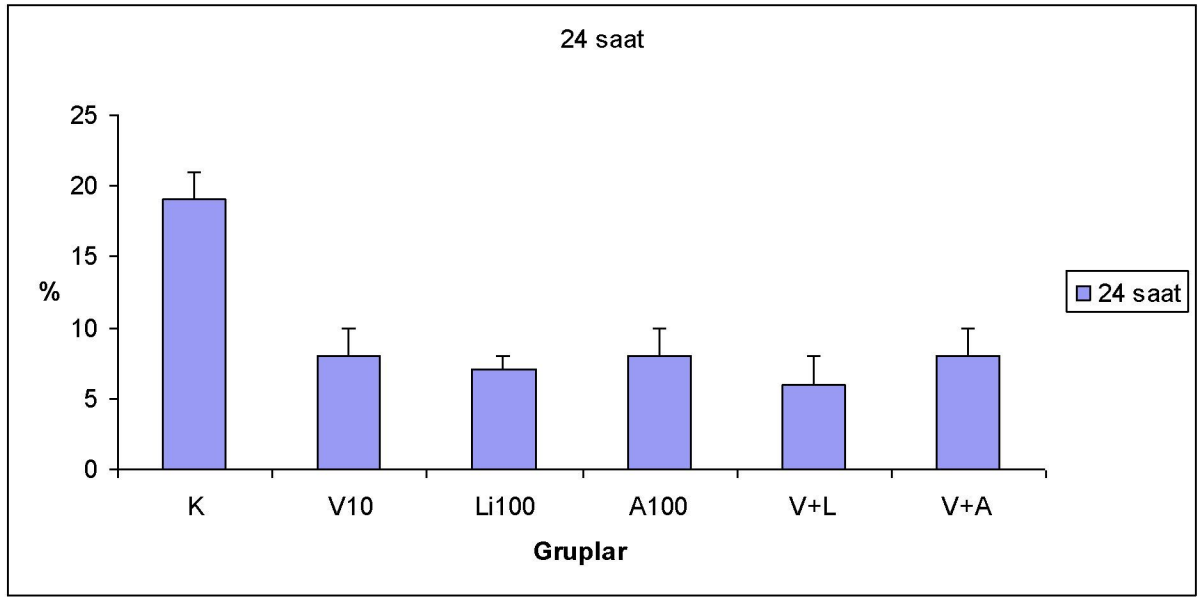
Asetaminofen grubunda ortalama işaretlenme değeri %8,6 bulundu ve kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$), (Şekil 4-24).

Vinoralbin ve lityum grubu sferoidlerinde ise ortalama işaretlenme değeri %7 olarak bulundu. Kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$). Tek başına vinoralbin ve lityum ile kıyaslandığında sinerjistik bir etki olmadığı bulundu (Şekil 4-26).

Vinoralbin + Asetaminofen grubu sferoidlerinde ortalama işaretlenme değeri %8 olarak belirlendi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$), (Şekil 4-25). Tek başına asetaminofen ile kıyaslandığında vinoralbin inhibisyonunu Asetaminofen'in etkilemediği saptandı.

Vinoralbin, lityum, asetaminofen ve lityum ve asetaminofen'in ayrı ayrı vinoralbin ile kombinasyon gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma gözlenmiştir ($p < 0.05$).

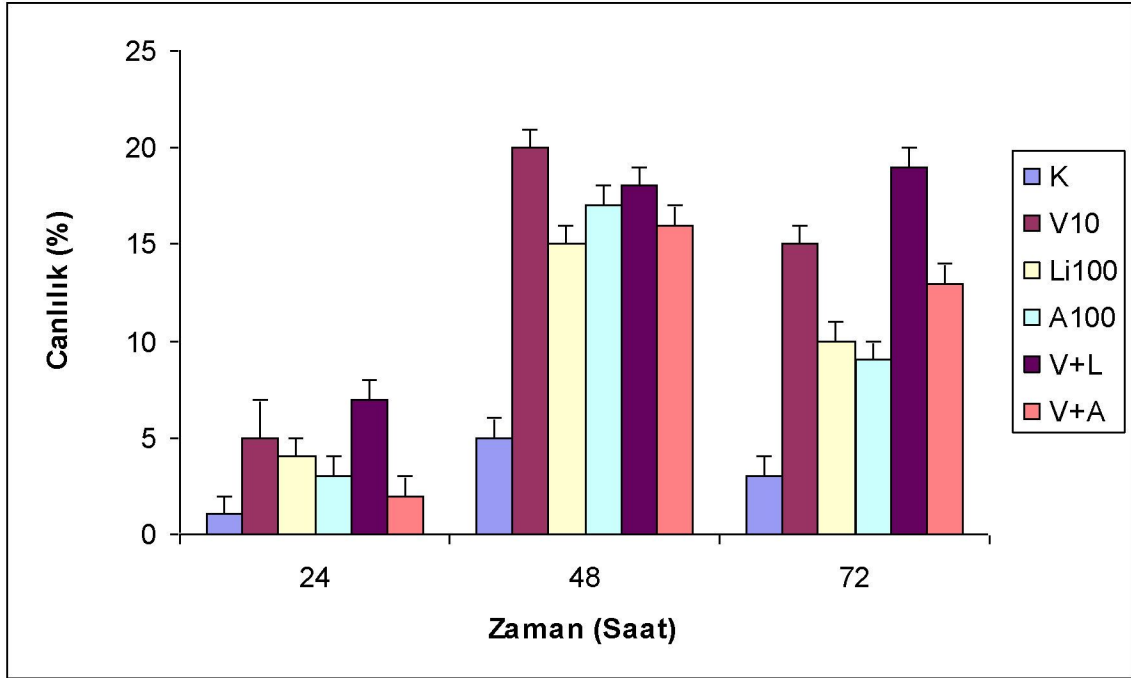
Ancak lityum ve asetaminofen'in ayrı ayrı vinoralbin ile olan kombinasyon gruplarında vinoralbin sitotoksitesi üzerine tek tek meydana getirdikleri BrdU indeksindeki azalmaya ek olarak editif veya sinerjistik etki göstermemişlerdir (Şekil 4-4).



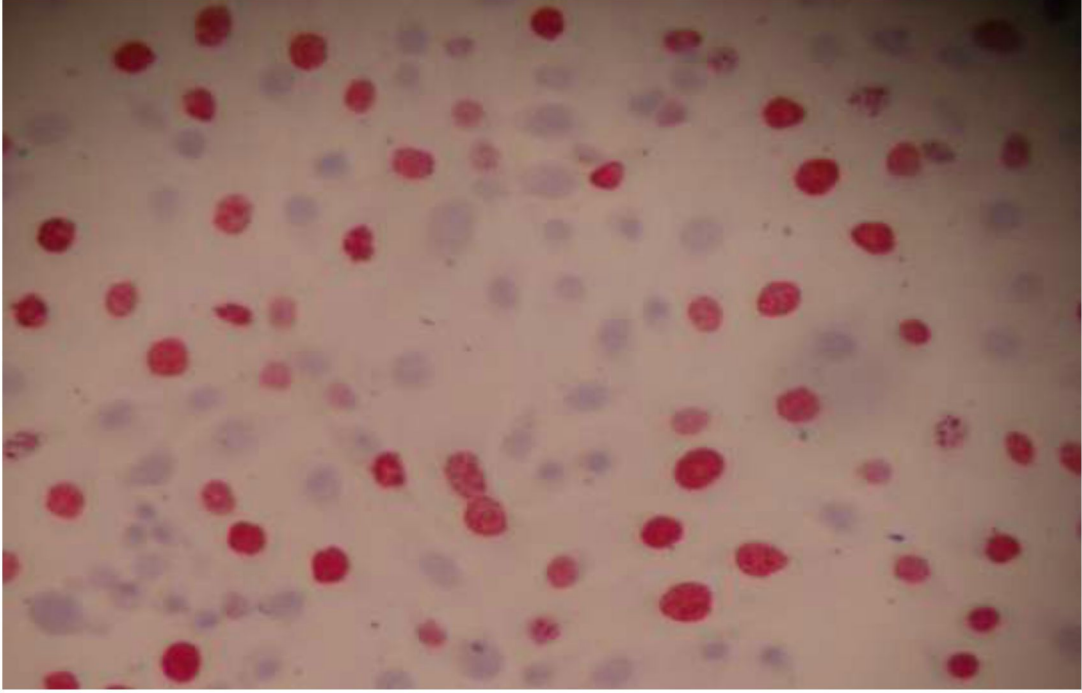
Şekil 4-4: Üç Boyutlu Kültürlerde BrdU İle İşaretlenme Grafiği

4.4. Sitotoksosite Verileri

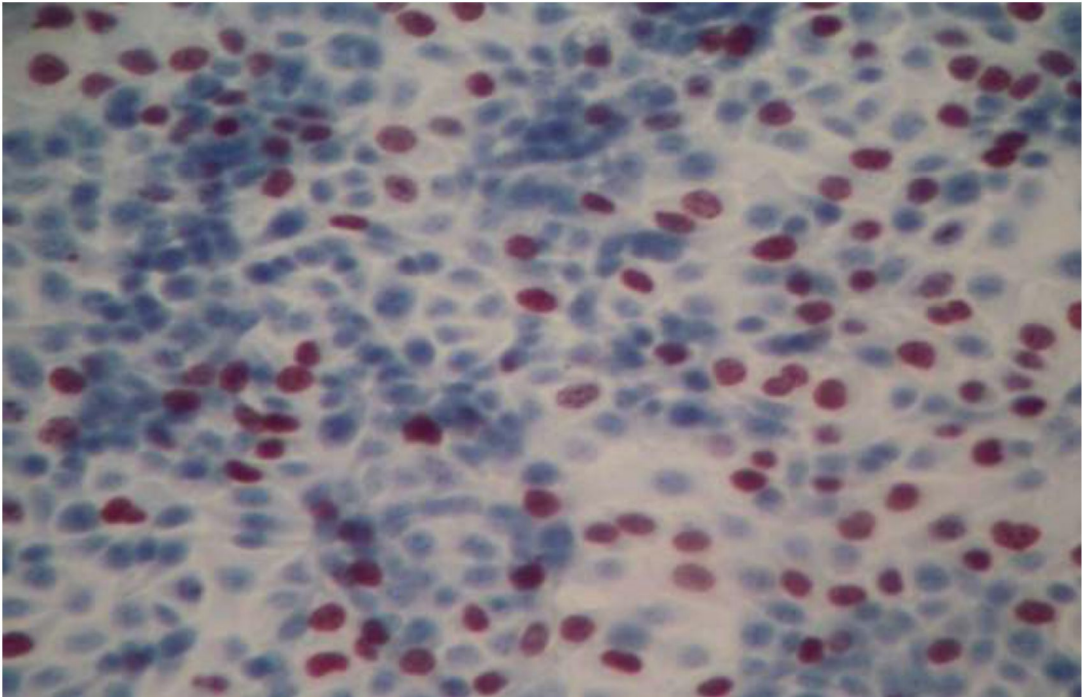
İlk 24 saat için ilaçların tek tek ve birlikte kullanılmaları ilaçlara bağlı hücre ölümü üzerinde anlamlı bir değişiklik meydana getirmemiştir. Diğer yandan 48 ve 72. saatlerde vinoralbin'in tek başına ve diğer ilaçlarla kombinasyon gruplarında anlamlı hücre ölümleri gözlenmiştir (Şekil 4-5).



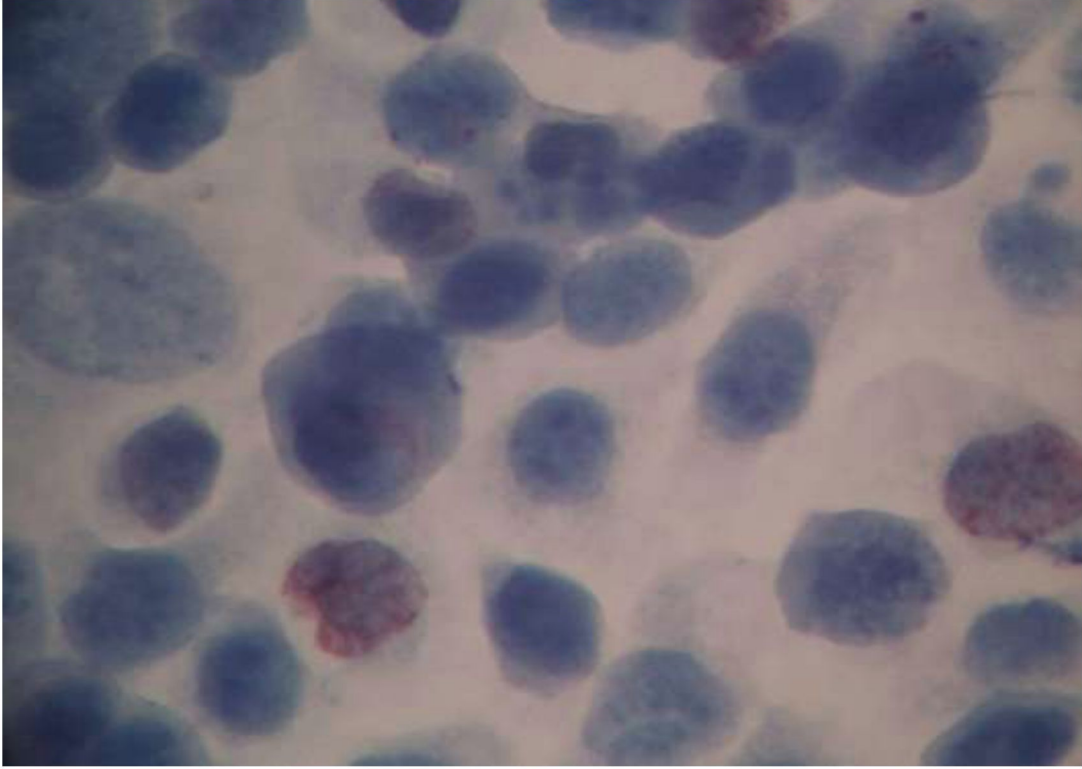
Şekil 4-5: Zamana Bağlı Hücre Sitotoksosite Verileri



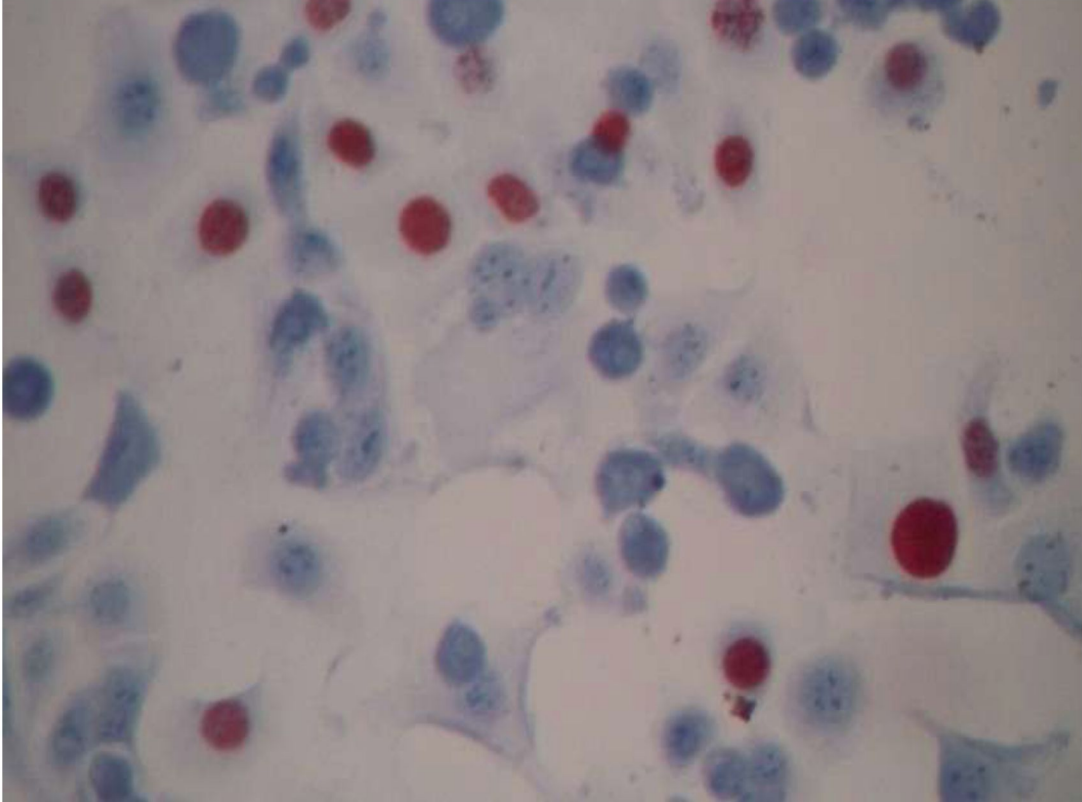
Şekil 4-6: 24. saat Kontrol grubu; iki boyutlu kültürlerde 24. saatte çok sayıda MDAH-2774 ovaryum tümör hücresi Brdu ile işaretlenmiş (kırmızı renkli) olarak gözlemlendi. (işaretlenmeyen hücreler mavi renkli) X 500



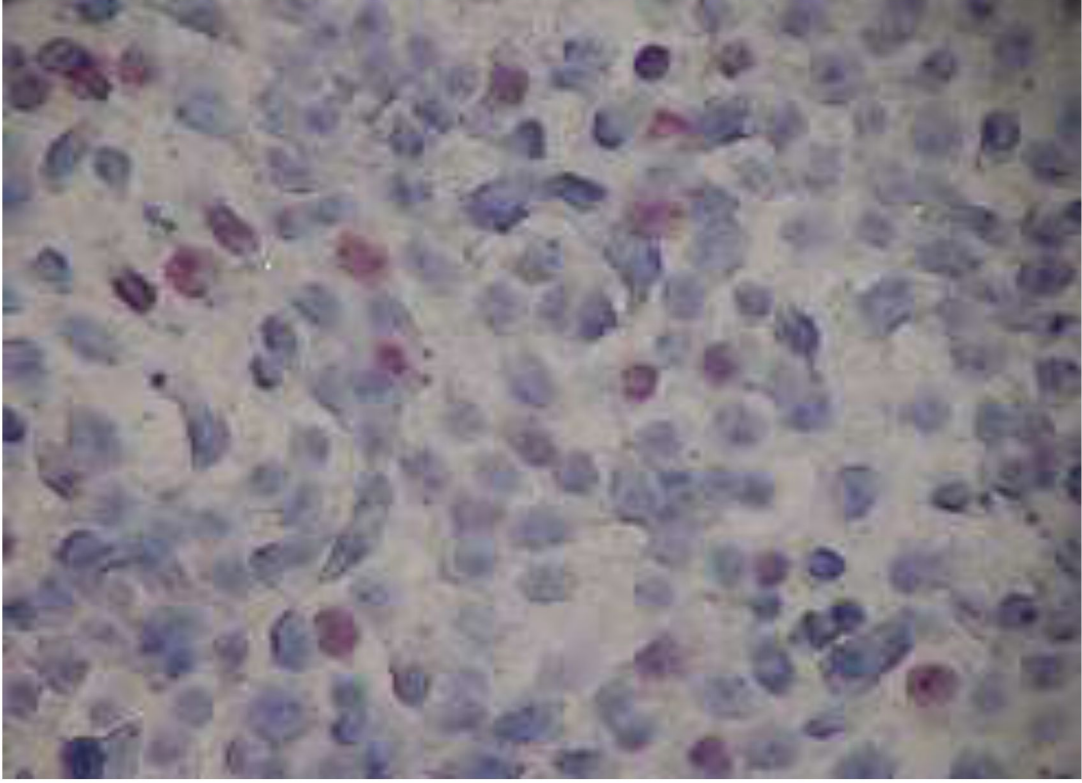
Şekil 4-7: 72. saat Kontrol grubu; çok sayıda MDAH-2774 ovaryum tümör hücresi Brdu ile işaretlenmiş (kırmızı renkli) olarak gözlemlendi. X 500.



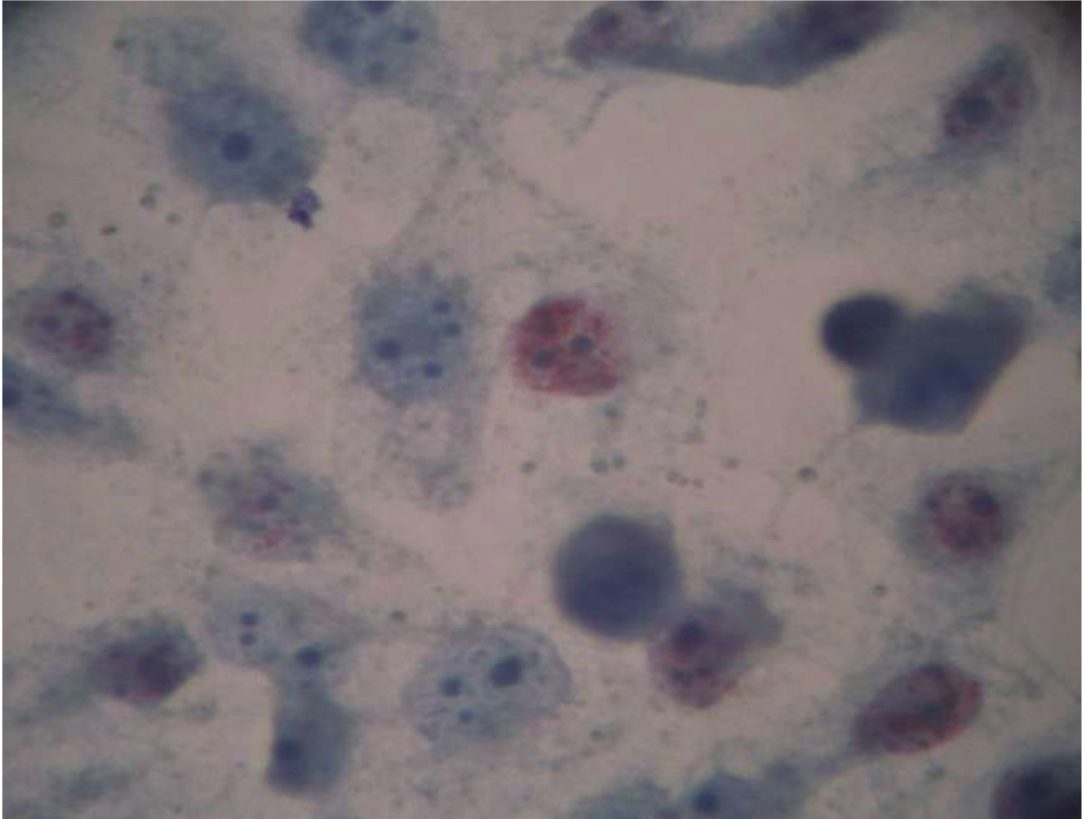
Şekil 4-8: 24. saat Vinorelbine grubu; kontrol grubuna göre daha az sayıda BrdU ile işaretlenmiş tümör hücresi. X 2000.



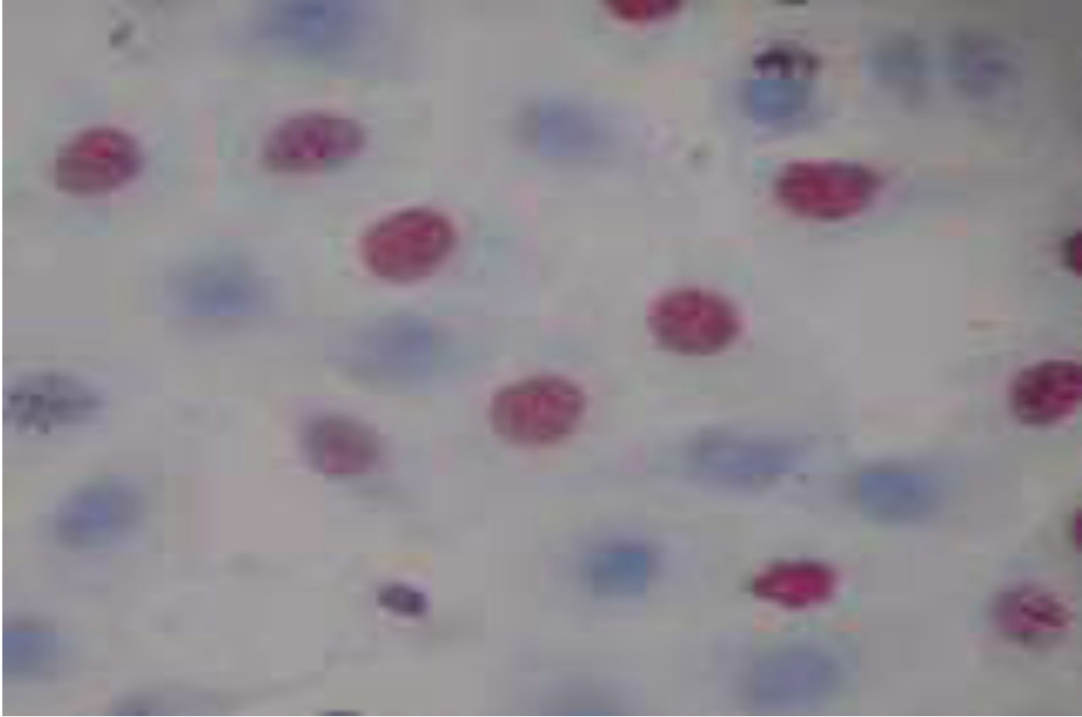
Şekil 4-9: 72. saat Vinorelbine grubu; az işaretli hücreler X 500.



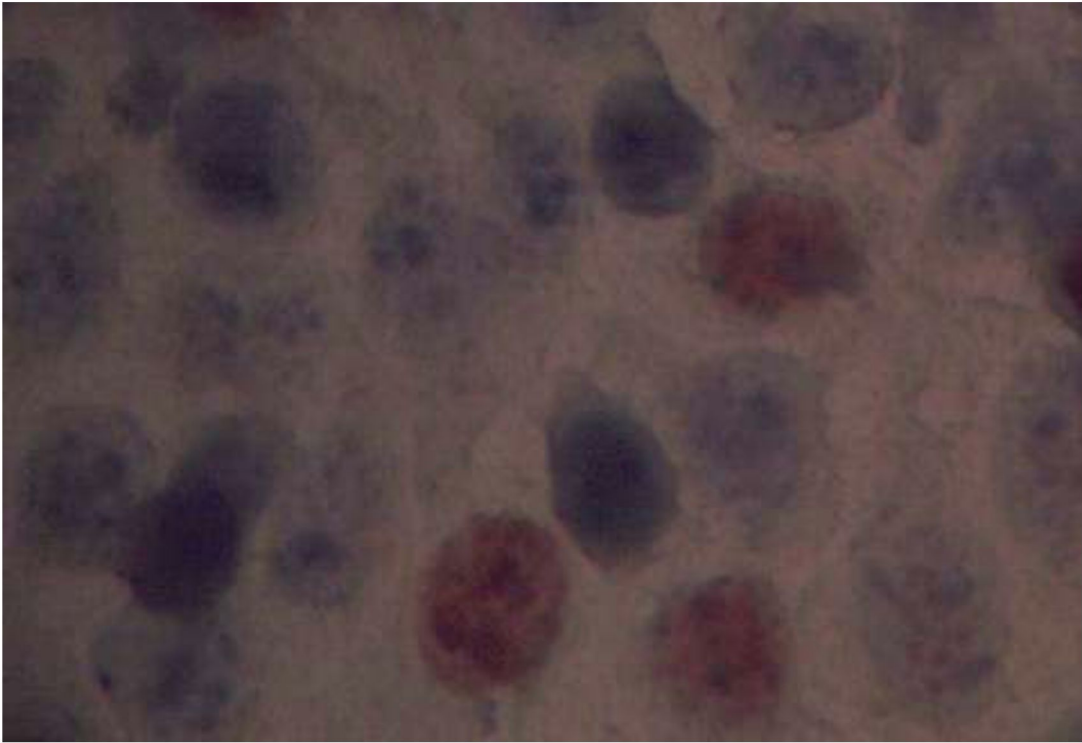
Şekil 4-10: 24. saat Lityum grubu; az işaretli hücreler X 500.



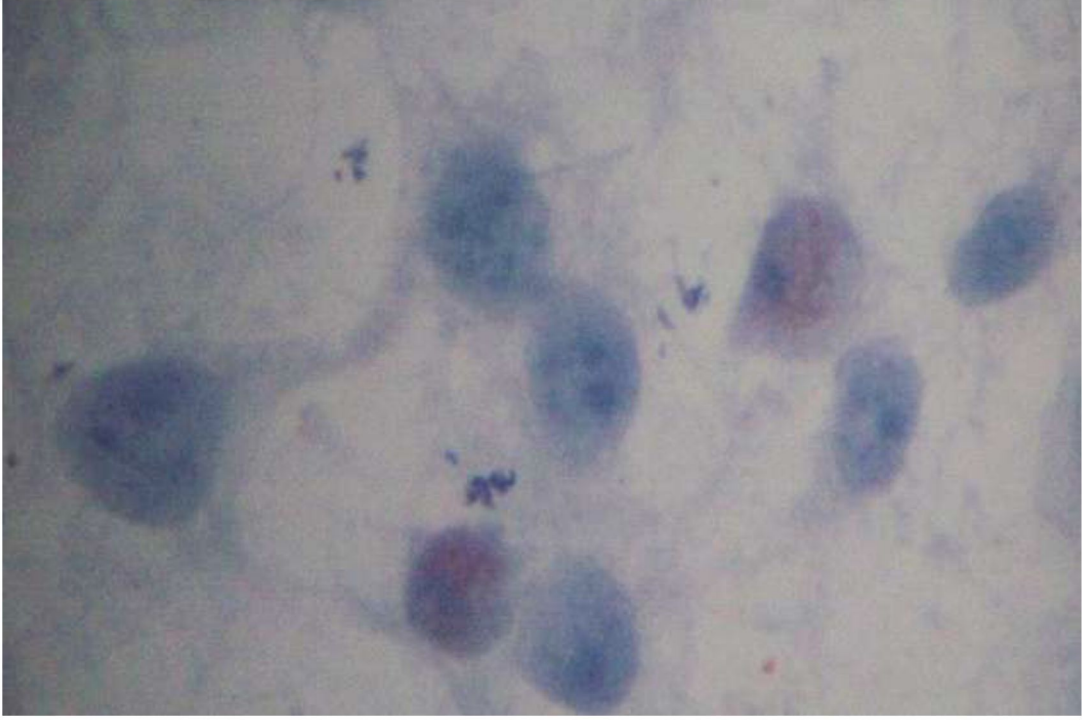
Şekil 4-11: 72. saat Lityum grubu; çok az işaretli hücre X 2000.



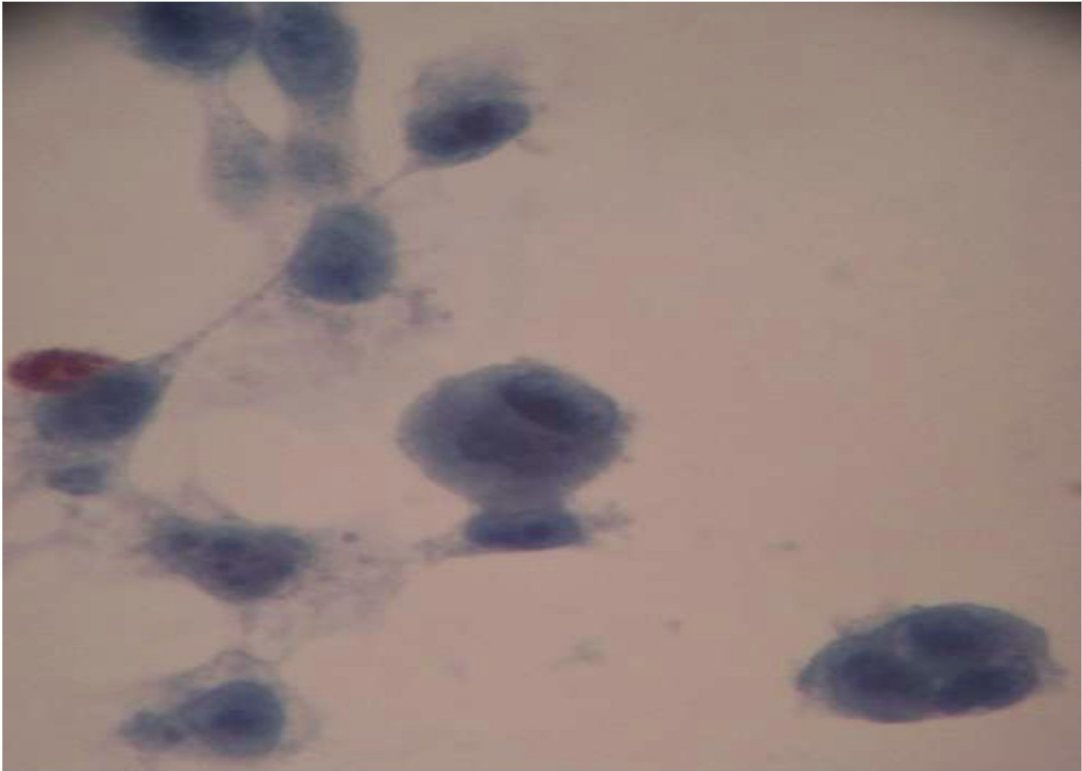
Şekil 4-12: 24. saat Asetaminofen grubu; az işaretli hücreler X 500.



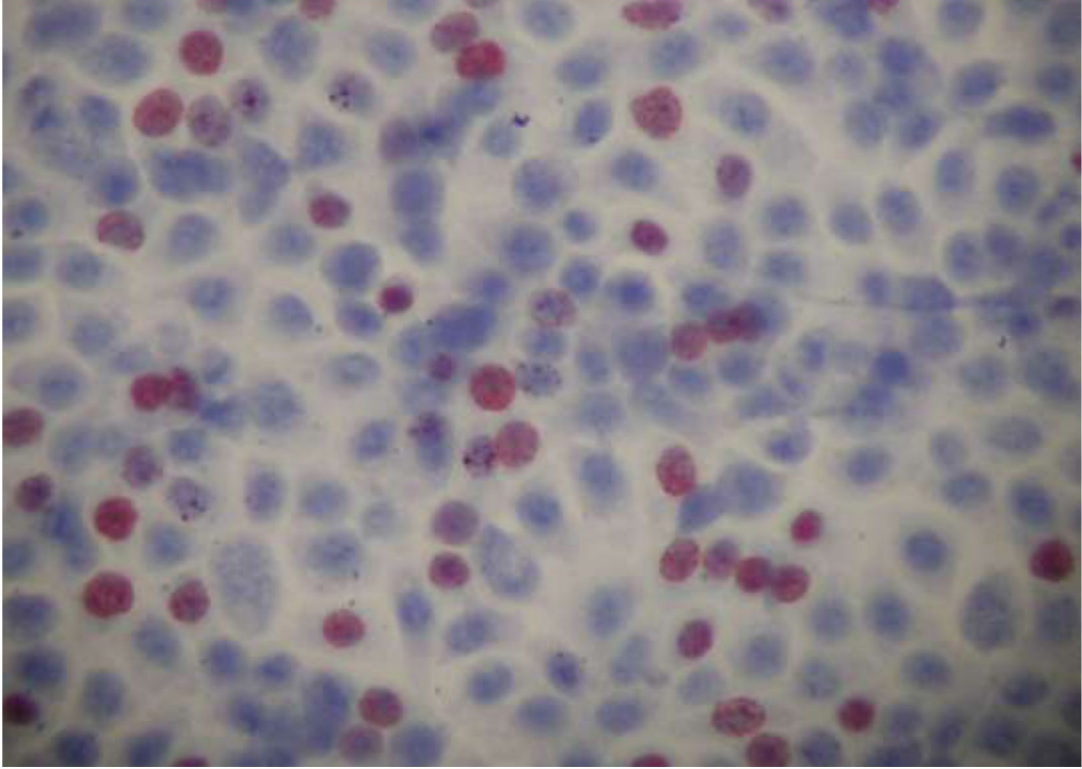
Şekil 4-13: 72. saat Asetaminofen grubu; kontrol grubuna benzer olarak çok sayıda işaretli hücre X 2000.



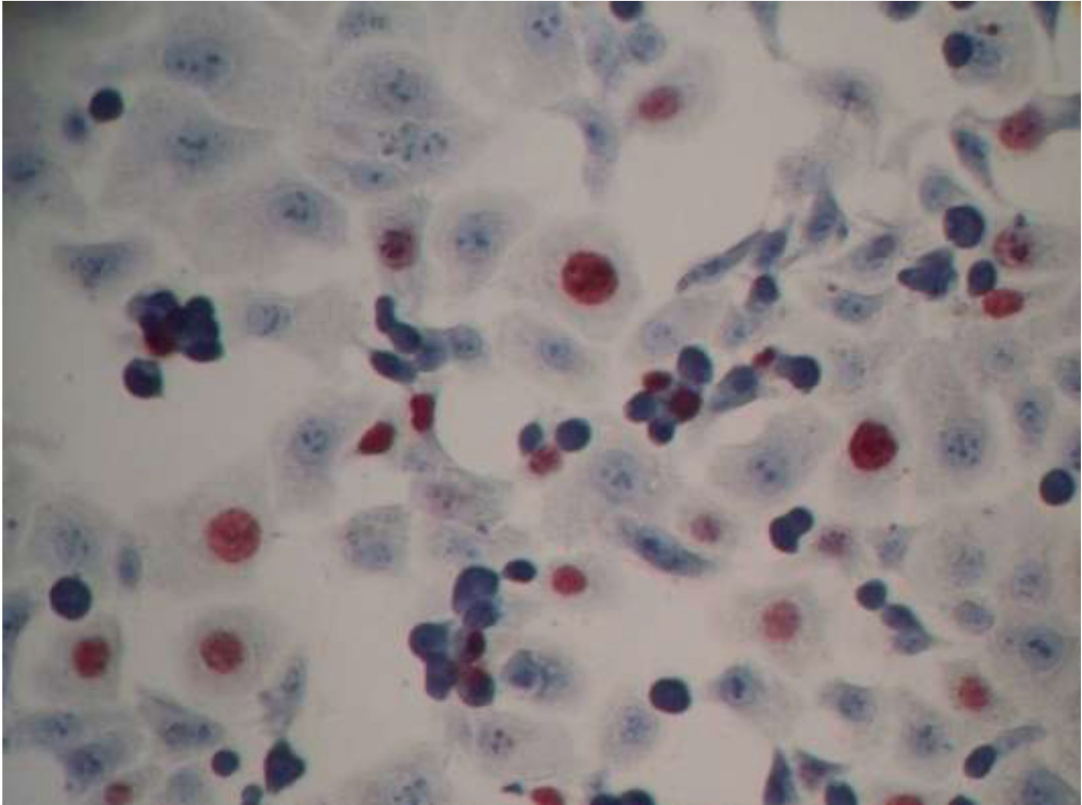
Şekil 4-14: 24. saat V+L grubu; az sayıda işaretli hücre X 2000.



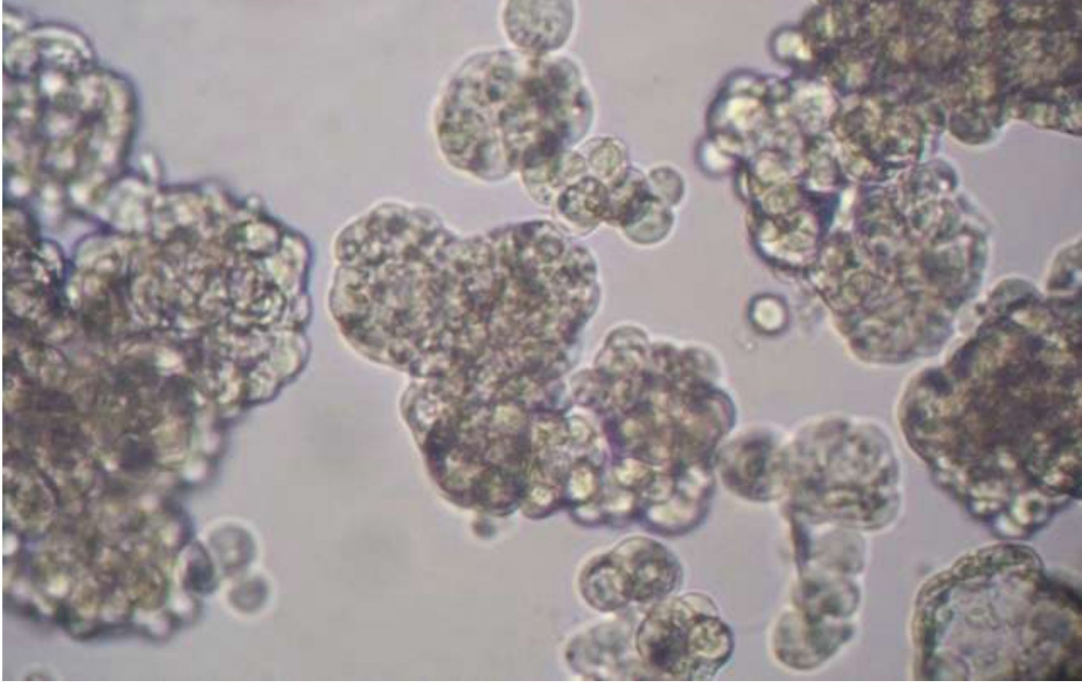
Şekil 4-15: 72 saat V+L grubu; az sayıda işaretli hücre X 2000.



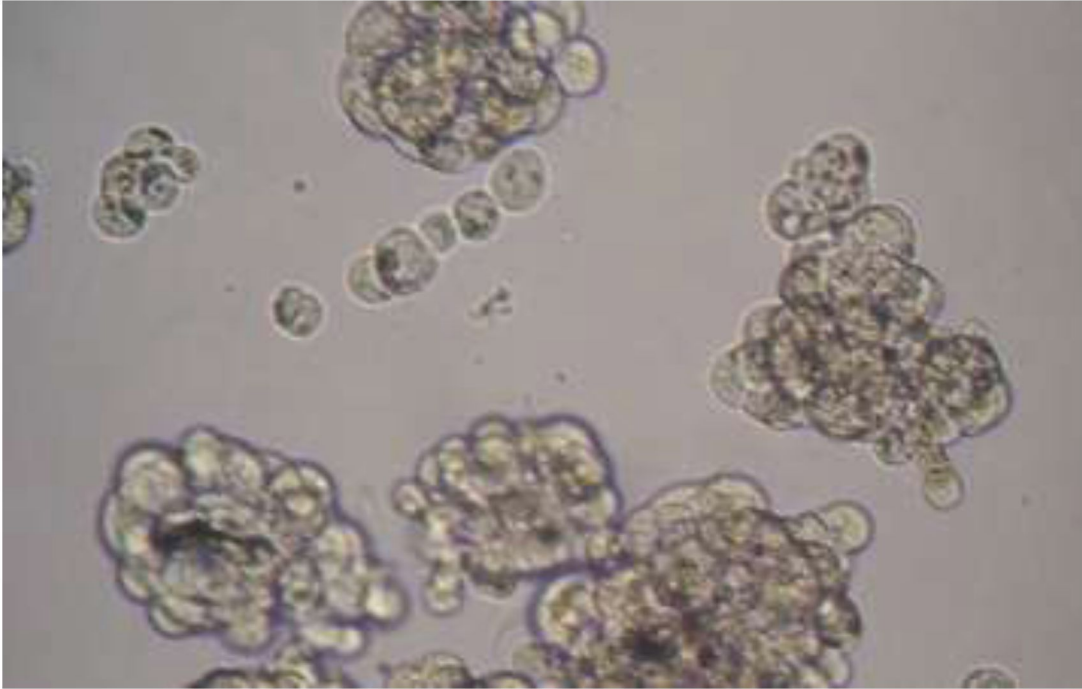
Şekil 4-16: 24. saat V+A grubu; kontrol grubuna göre az sayıda işaretli hücre. X 500.



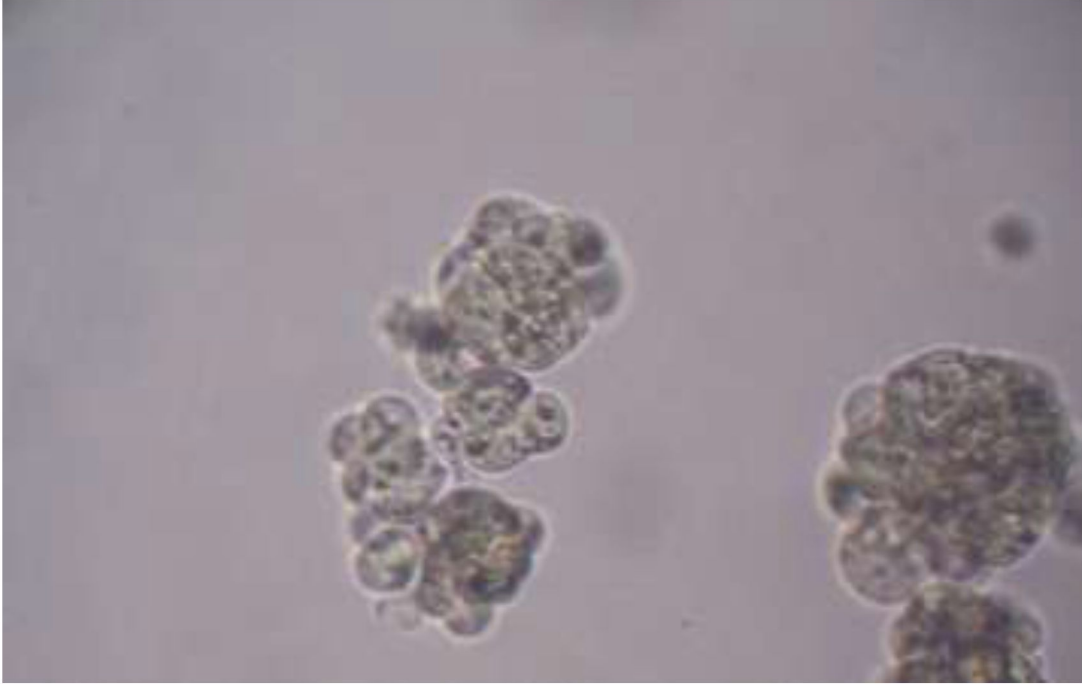
Şekil 4-17: 72. saat V+A; 24. saate göre daha az işaretli hücre X 500.



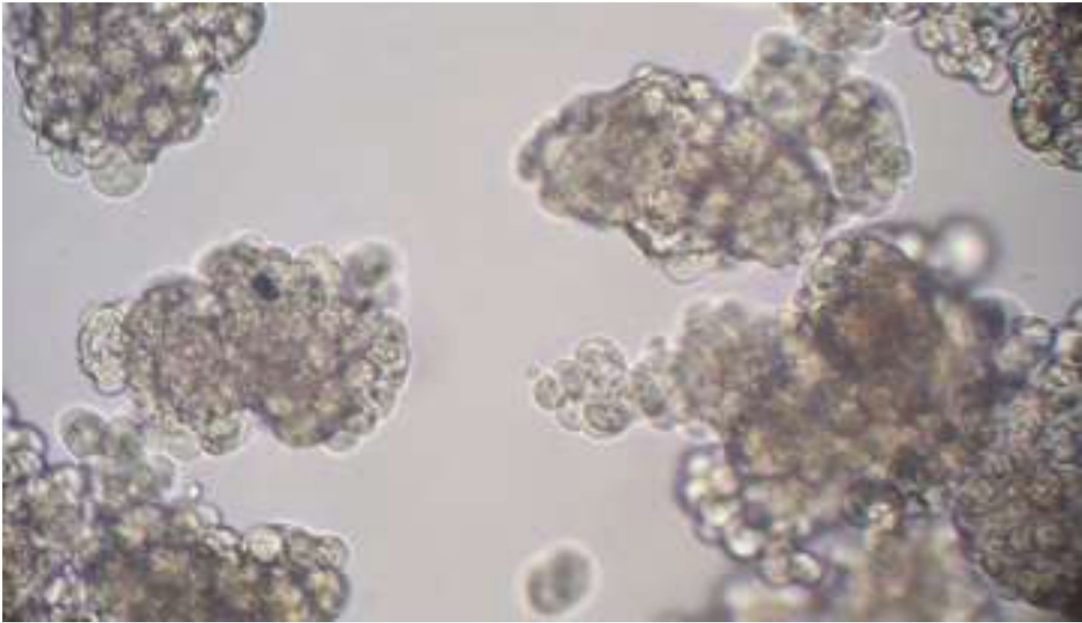
Şekil 4-18: Kontrol sferoid X 2000.



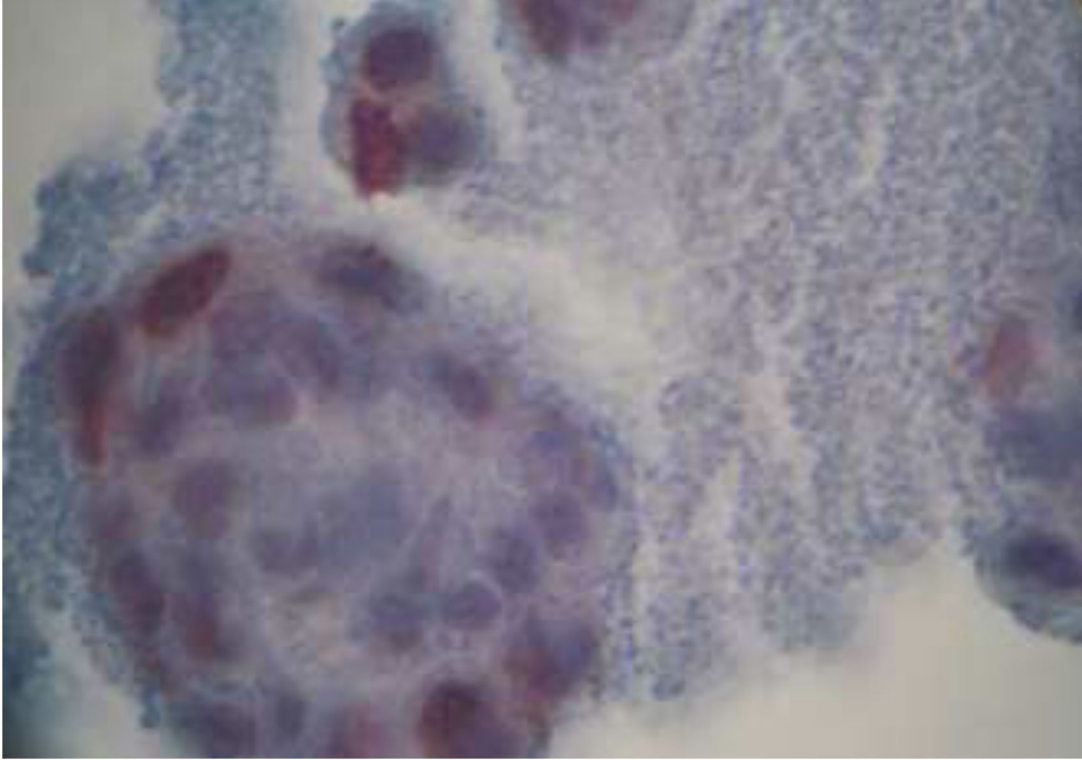
Şekil 4-19: Vinorelbine X 2000.



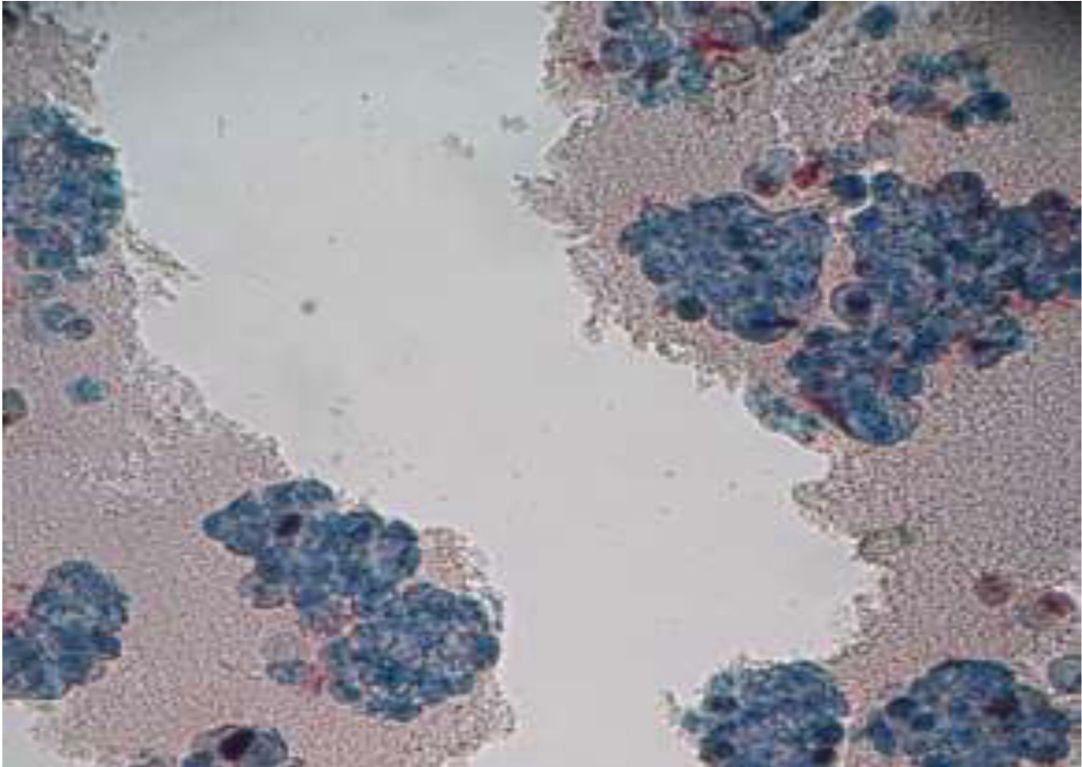
Şekil 4-20: Lityum grubu X 2000



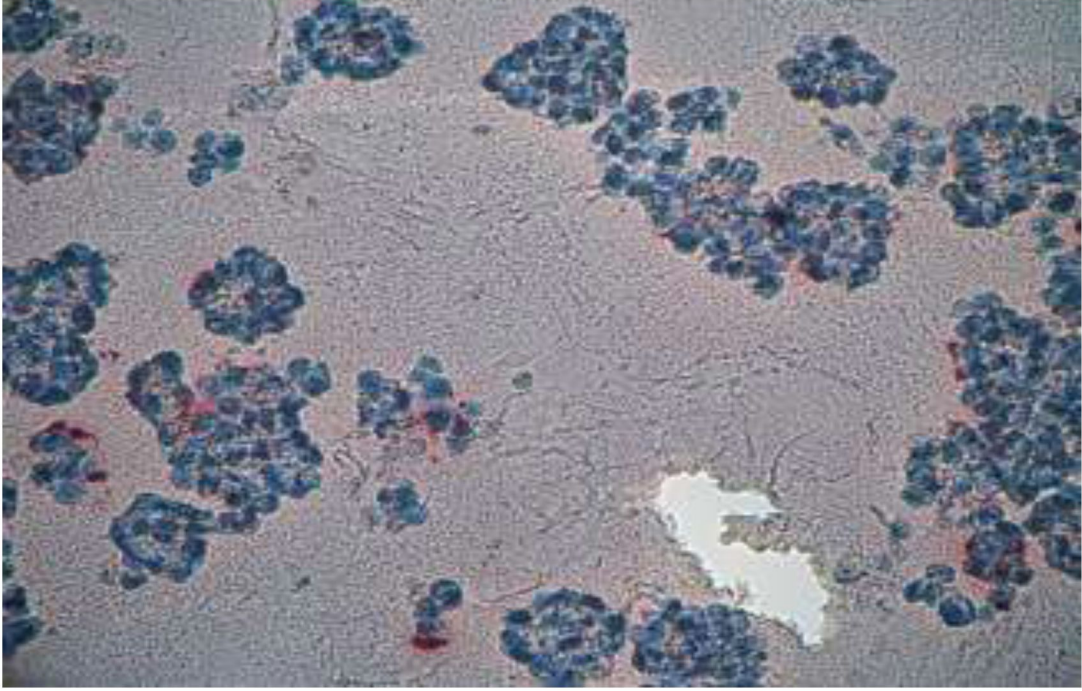
Şekil 4-21: Asetaminofen grubu X 2000.



Şekil 4-22: Kontrol grubu; çok sayıda işaretli hücreler X 2000.



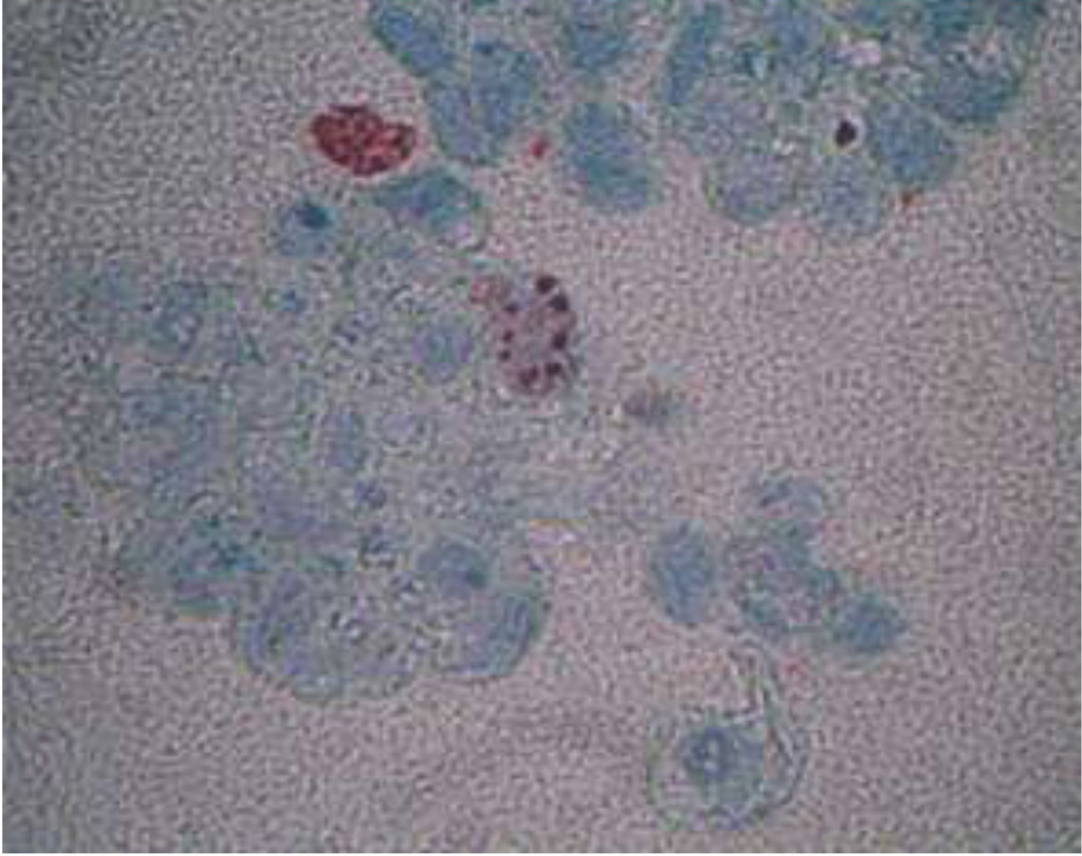
Şekil 4-23: Vinoralbin grubu; kontrole göre az sayıda işaretli hücre X 500.



Şekil 4-24: Asetaminofen grubu; kontrole göre az sayıda işaretli hücre X 500.



Şekil 4-25: V+A grubu; az sayıda işaretli hücre X 2000.



Şekil 4-26: V+L grubu; az sayıda işaretli hücre X 2000.

5. TARTIŞMA

Ovaryum kanseri jinekolojik kanserler arasında en ölümcül olanıdır (Askar ve ark. 2006). Kadın genital kanserleri arasında her zaman ilk beş hastalık içinde yer almaktadır (Oulet ve Percival 2001). Kemoterapiye en duyarlı tümör tiplerinden biri olmasına rağmen ovaryum kanserlerinde ölüm oranı halen yüksektir. Hastalık uzun bir dönem belirti vermeden seyrettiği için hastalığın ileri evrelerinde hekime başvurulmaktadır (Cramer ve ark. 1998). Bu nedenle geleneksel kemoterapi ajanlarıyla yapılan tedavi ile her zaman başarı sağlanamamaktadır. Bu durumda da, yeni kemoterapi ajanlarının uygun dozlarda ve farklı ilaçlarla kombine bir şekilde kullanılmasının tedavide başarı şansını arttıracakı düşüncesindeyiz.

Vinoralbin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, servikal kanser ve meme kanseri tedavisinde klinik olarak kullanılan kemoterapatik bir vinka alkaloiddir (Glaxo). Mitokondriyal sitokrom-c miktarını azaltarak insan lenfoma hücrelerinde apoptozu indüklediği belirtilmektedir. Ayrıca vinoralbin tübülün oluşumuna engel olmakta ve mitotik iğ oluşumunu inhibe ederek hücreyi metafazda durdurmaktadır. Böylece hücre siklusunu G2/M noktasında durdurarak antimitotik ajan olarak da rol oynar (Hanley ve ark. 1998).

Araştırmamızda, Vinoralbin izlenen tüm saatlerde kontrol grubuna oranla hücre sayısını azalttı ($p<0.05$). BrdU verilerine ve hücre proliferasyon sonuçlarına baktığımızda vinoralbin'in hücre sayısını anti-proliferatif etkisinden dolayı azalttığı görülmektedir. Çalışmamızda, vinoralbinin, MDAH-2774 hücrelerinde ölüme neden olduğunu, iki ve üç boyutlu kültürlerde sayısal olarak belirledik ve bu dozun ($10 \mu\text{M}$) hücre siklusunun sentez fazında azalmaya yol açtığı belirgin olarak saptandı. Vinoralbin uygulamasından sonra BrdU-LI ve hücre proliferasyon değerlerindeki azalma veya artış birbirleriyle uyumluluk gösterir.

Klinikte duyugudurum düzenleyici olarak kullanılan LiCl'ün çeşitli kanser hücrelerinde proliferasyonu engellediği belirtilmektedir (Sun ve ark. 2007; Kunnimalaiyaan ve ark. 2007). LiCl'ün wnt sinyal yolunu aktive ederek miyeloma gelişimini engellediği gösterilmiştir (Sun ve ark. 2007).

LiCl S fazında hücre siklusunu durdurarak hücre proliferasyonunu azaltmaktadır, ayrıca prostat kanseri hücrelerinde çoğalmayı azalttığı, tiroid kanser hücrelerinde ise tümör hacmini azalttığı belirtilmektedir (Sun ve ark. 2007; Kunnimalaiyaan ve ark. 2007).

GSK-3 β (Glikojen Sentetaz Kinaz-3 β), NF-kappaB aktivasyonunu sağlayarak kanser hücrelerinde hücre proliferasyonu artırır (Cao ve ark. 2006). Cao ve arkadaşlarının çalışmasına göre, GSK-3 β 'nın ovaryum kanser hücrelerinde çoğalmaya neden olduğu belirtilmektedir (Cao ve Feng 2006). Biz de bu noktadan yola çıkarak MDAH-2774 insan ovaryum tümör hücrelerinde GSK-3 β inhibitörü kullanarak çoğalmayı inhibe etmeyi amaçladık.

GSK-3 β 'nın aktive olması siklin D1 ekspresyonunu artırarak S fazına girmeyi indükler ve ovaryum kanser hücrelerinde proliferasyonu artırır (Cao ve ark. 2006).

GSK-3 β çok fonksiyonlu bir serin/treonin kinazdır. LiCl serin 9'u fosforile ederek GSK-3 β 'yı inhibe eder (Cai ve ark. 2007). Çalışmamızda LiCl hücre proliferasyonunu inhibe ederek hücre sayısını azalttı. BrdU-LI sonuçlarına baktığımızda bu etkisini hücre siklusunu S fazında durdurarak yaptığını gördük. Çünkü S fazı hücre oranı izlenen tüm saatlerde geriledi. Üç boyutlu kültürlerde de BrdU-LI değerleri anlamlı olarak düşüş gösterdi ($p < 0.05$).

Vinoralbin ve Lityum MDAH-2774 insan ovaryum tümör hücreleri üzerine etkili ilaçlar olduklarını gösterdiler. Vinoralbin 72 saat boyunca direkt hücre sayısını azaltarak çok belirgin düzeyde hücre tutunma inhibisyonu gerçekleştirdi ($p < 0.05$). Vinoralbin'in; kontrol ile karşılaştırıldığında BrdU-LI düzeyini oldukça düşürdüğü gözlemlendi.

Siklooksijenaz inhibitörlerinin çeşitli tümörlerin tedavisinde potansiyel hedef oldukları düşünülmektedir. Asetaminofen'in nöroblastoma hücre ölümüne sebep olduğu belirtilmiştir (Posadas ve ark. 2007). Ayrıca epitel kökenli kolon ve gastrointestinal kanal tümörlerinde ve meme ve ovaryum kanserinde düzenli kullanımının önleyici etkisi olduğu gösterilmiştir (Crew ve Neugut 2006).

Asetaminofen'in, anjiyogenesi, invazyonu, apoptozise direnci indükleyen COX-2, VEGF (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü) ve plazminojen aktivatörleri gibi çeşitli proteazların, büyüme faktörlerinin gen transkripsiyonunu inhibe eden NF-kappaB aktivitesini inhibe ederek ovaryum kanserini önlediği bulunmuştur (Altinoz ve Korkmaz 2004).

Asetaminofen'in ovaryum kanser riskini üç ayrı yolak üzerinden etkileyerek azalttığına dair çalışmalar vardır. Bu üç yol: I) Sex steroidlerine benzer fenolik halkaya sahip olmasından dolayı spesifik reproduktif atrofiyi indüklemesi. II) Premalignant ovaryum lezyonlarında önemli rol oynayan NAPQI'e bağlı olarak glutatyon seviyesini azaltması. III) Ovulasyona hazırlık için gerekli olan ve ovaryum kanserinde de salınan MIF (Makrofaj Migrasyonunu İnhibe Edici Faktör)'in inhibe edilmesi (Bonovas ve ark. 2006). Östrojen biyosentezini stimüle eden aromatazların gen ekspresyonunu uyaran prostaglandinleri, siklooksijenazları baskılayarak inhibe etmektedir. 24. ve 48 saatlerde asetaminofen uygulanan gruplarda hücre sayısında meydana gelen anlamlı düşüş ($p < 0.005$) bu inhibisyona bağlanabilir. Ayrıca 72. saatte meydana gelen kontrole göre hücre sayısındaki artış literatürle uyumludur (Bilir 2002). Üç boyutlu kültürlerde de asetaminofen hücre sayısında anlamlı düşüş meydana getirdi ($p < 0.05$).

Vinoralbin, Asetaminofen ile kombine edildiğinde 72 saat boyunca hücre tutunma inhibisyonu gözlemlendi. Ancak tek başına Asetaminofen ile karşılaştırıldığında asıl etkileşimin vinoralbin'e bağlı olduğu gözlemlendi. Bu kombinasyon Vinoralbin etkisine paralel sonuçlar doğurdu.

Kombinasyon gruplarında hem hücre proliferasyonunda hem de BrdU-LI sonuçlarında bir azalma görülürken, hücre sitotoksitesinde de artış izlendi.

Sonuç olarak, vinoralbin ve lityumun ovaryum tümörlerinde tek başına hem iki boyutlu hem de üç boyutlu kültürlerde hücre çoğalmasını azalttığı, asetaminofenin de 24 ve 48. saatlerde azaltma meydana getirdiği ama vinoralbin ile birlikte kullanılmasında ekstra bir etki göstermediği görülmüştür.

KAYNAKLAR

Altinoz, M.A. ve Korkmaz, R. (2004). NF-kappaB, macrophage migration inhibitory factor and cyclooxygenase-inhibitions as likely mechanisms behind the acetaminophen- and NSAID-prevention of the ovarian cancer. *Neoplasma*.**51(4)**, 239-247.

Askar, N., Cırpan, T., Toprak, E., Karabulut, B., Selvi, N., Terek, M.C. ve ark. (2006). Arsenic trioxide exposure to ovarian carcinoma cells leads to decreased level of topoisomerase II and cytotoxicity. *Int J Cancer*. **16(4)**, 1552-1556.

Aytekin, Y. ve Solakoglu, S. (2006). *Temel Histoloji*. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri.

Babich, H., Reisbaum, A.G. ve Zuckerbraun, H.L. (2000). In Vitro Response of Human Gingival Epithelial S-G Cells to Resveratrol. *Toxicol Letter*. **114**, 143-153.

Bardos, A.P. (2005). Treatment of Ovarian Cancer. İçinde Altinoz, M.A. ve Bilir, A. (Ed.), *Inflammation, nonsteroid and steroid anti-inflammatory agents and ovarian cancer*. New York: Nova Science Publishers Inc; 97-133.

Berridge, M.J. ve Irvine, R.F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*. **341(6239)**, 197-205.

Bilir, A., Altinoz, M.A., Attar, E., Erkan, M. ve Aydiner, A. (2002). Acetaminophen modulations of chemotherapy efficacy in MDAH 2774 human endometrioid ovarian cancer cells in vitro. *Neoplasma*. **49(1)**, 38-42.

Bilir, A., Solakoğlu, S. ve Ahışhalı, B.(2004). *Uygulamalı Flow Sitometri-PCR ve Hücre Kültürü Kursu*. İstanbul.

Bitran, J.A., Manji, H.K., Potter, W.Z. ve Gusovsky, F. (1995). Down-regulation of PKC alpha by lithium in vitro. *Psychopharmacol Bull*. **31(2)**, 449-452.

Bonovas, S., Filioussi, K. ve Sitaras, N.M. (2006). Paracetamol use and risk of ovarian cancer: a meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol*. **62(1)**, 113-121.

Cai, G., Wang, J., Xin, X., Ke, Z. ve Luo, J. (2007). Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 beta at serine 9 confers cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Int J Oncol.* **31(3)**, 657-662.

Cao, Q. ve Feng, Y.J. (2006). Glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) promotes proliferation of ovarian cancer cells in vitro. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* **28(11)**, 804-809.

Cao, Q., Lu, X. ve Feng, Y.J. (2006). Glycogen synthase kinase-3beta positively regulates the proliferation of human ovarian cancer cells. *Cell Res.* **16(7)**, 609.

Carré, M., André, N., Carles, G., Borghi, H., Brichese, L., Briand, C. ve ark. (2002). Tubulin is an inherent component of mitochondrial membranes that interacts with the voltage-dependent anion channel. *J Biol Chem.* **277(37)**, 33664-9.

Castilla, E.A., Prayson, R.A., Kanner, A.A., Rybicki, L.A., Tubbs, R.R., Vogelbaum, M.A. ve ark. (2003). Cyclooxygenase-2 in oligodendroglial neoplasms. *Cancer.* **98(7)**, 1465-1472.

Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S. ve ark. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99(21)**, 13926-31.

Cragg, G.M. ve Newman, D.J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol.* **100(1-2)**, 72-79.

Cramer, D.W., Harlow, B.L., Titus-Ernstoff, L., Bohlke, K., Welch, W.R. ve Greenberg, E.R. (1998). Over-the-counter analgesics and risk of ovarian cancer. *Lancet.* **351(9096)**, 104-7.

Crew, K.D. ve Neugut, A.I. (2006). Aspirin and NSAIDs: effects in breast and ovarian cancers. *Curr Opin Obstet Gynecol.* **18(1)**, 71-75.

Demir, R. (2001). *Histolojik Boyama Teknikleri*. Ankara, Palme Yayıncılık.

Disaia, P.J. ve Creasman, W.T. (2003). *Clinical Gynecologic Oncology*. New York. Mosby Inc.

El Hafny, B., Cano, N., Piciotti, M., Regina, A., Scherrmann, J.M. ve Roux, F. (1997). Role of P-glycoprotein in colchicine and vinblastine cellular kinetics in an immortalized rat brain microvessel endothelial cell line. *Biochem Pharmacol.*

53(11), 1735-1742.

Gidding, C.E., Kellie, S.J., Kamps, W.A. ve Graaf, S.S. (1999). Vincristine revisited. *Crit Rev Oncol Hematol.* **29(3)**, 267-287.

Gilloteaux, J., Jamison, J.M., Arnold, D., Taper, H.S., Von Gruenigen, V.E. ve Summers, J.L. (2003). Microscopic aspects of autoshizic cell death in human ovarian carcinoma (2774) cells following vitamin C, vitamin K3 or vitamin C:K3 treatment. *Microsc Microanal.* **9(4)**, 311-329.

Glaxo Wellcome. Navelbine product monograph.
<http://www.chemocare.com/bio/navelbine.asp>.

Gregory, R.K. ve Smith, I.E. (2000). Vinorelbine--a clinical review. *Br. J Cancer* **82 (12)**, 1907-1913.

Gunin, A.G., Emelianov, V.U., Mironkin, I.U., Morozov, M.P. ve Tolmachev, A.S. (2004). Lithium treatment enhances estradiol-induced proliferation and hyperplasia formation in the uterus of mice. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* **114(1)**, 83-91.

Hanley, M.L., Elion, G.B., Colvin, O.M., Modrich, P.L., Keir, S., Adams, D.J. ve ark. (1998). Therapeutic efficacy of vinorelbine against pediatric and adult central nervous system tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* **42(6)**, 479-482.

Hayakawa, A., Kawamoto, Y., Nakajima, H., Sakai, J., Takasawa, R., Nakashima, I. ve ark. (2008). Bid truncation mediated by caspases-3 and -9 in vinorelbine-induced apoptosis. *Apoptosis.* **13(4)**, 523-530.

Huang, K.P. (1989). The mechanism of protein kinase C activation. *Trends Neuroscience.* **12**, 425-432.

Hudelist, G., Wagner, T., Rosner, M., Fink-Retter, A., Gschwantler-Kaulich, D., Czerwenka, K. ve ark. (2007). Intratumoral IGF-I protein expression is selectively upregulated in breast cancer patients with BRCA1/2 mutations. *Endocr Relat Cancer.* **14(4)**, 1053-1062.

Kayaalp, O. (2000). *Rasyonel Tedavi Yöminden Tıbbi Farmokoloji*. Ankara, Güneş Basımevi.

Kierszenbaum, A.L. (2002). *Histology and Cell Biology*. New York, Mosby Inc.

Kunnimalaiyaan, M., Vaccaro, A.M., Ndiaye, M.A. ve Chen, H. (2007). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β , a downstream target of the raf-1 pathway, is associated with growth suppression in medullary thyroid cancer cells. *Mol Cancer Ther.* **6(3)**, 1151-1158.

Lenox, R.H., McNamara, R.K., Watterson, J.M. ve ark. (1996). Myristoylated Alanine-rich C kinase substrate (MARCKS): A molecular target for the therapeutic action of mood stabilizers in the brain. *J Clin Psychiatry.* **57 (13)**, 23-31.

Lenox, R.H., McNamara, R.K., Papke, R.L. ve ark. (1998). Neurobiology of lithium: An update. *J Clin Psychiatry* **59(6)**, 37-47.

Lin, C.F., Chen, C.L., Chiang, C.W., Jan, M.S., Huang, W.C. ve Lin, Y.S. (2007). GSK-3 β acts downstream of PP2A and the PI 3-kinase-Akt pathway, and upstream of caspase-2 in ceramide-induced mitochondrial apoptosis. *J Cell Sci.* **120(16)**, 2935-2943.

Luque, I. ve Gelinas C. (1997). Rel/Nf-KappaB and I kappaB Factors in Oncogenesis. *Semin Cancer Biol.* **8(2)**, 103-111.

Maia, H. Jr ve Casoy, J. (2007). Non-contraceptive health benefits of oral contraceptives. *Eur J Contracep Reprod Health Care.* **24**,1-8.

Mao, C.D., Hoang, P. ve DiCorleto, P.E. (2001). Lithium inhibits cell cycle progression and induces stabilization of p53 in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem.* **276(28)**, 26180-8.

Manji, H.K., Etcheberrigaray, R., Chen, G. ve ark. (1993). Lithium decreases membrane-associated protein kinase C in hippocampus: selectivity for the α isozyme. *J Neurochemistry.* **61**, 2303-2310.

Manji, H.K., Bersudsky, Y., Chen, G. ve ark. (1996). Modulation of protein kinase C isozymes and substrates by lithium: The role of myo-inositol. *Neuropsychopharmacology.* **15**, 370-381.

Manji, H.K., Bebchuk, J.M., Moore, G.J. ve ark. (1999). Modulation of CNS signal transduction pathways and gene expression by mood-stabilizing agents: Therapeutic implications. *J Clin Psychiatry*. **60(suppl. 2)**, 27-39.

Montag, T.W. (1990). Tumor Markers in Gynecologic Oncology. *Obstet.Gynecol Surv*. **45**: 94-105.

Nahorski, S.R., Ragan, C.I., Challiss, R. ve ark. (1991). Lithium and the phosphoinositide cycle: An example of uncompetitive inhibition and its pharmacological consequences. *Trends Parmacol Sci*. **12**, 297-303.

Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*. **258**, 607-614.

Okouneva, T., Hill, B.T., Wilson, L. ve Jordan, M.A. (2003). The effects of vinflunine, vinoralbine, and vinblastine on centromere dynamics. *Mol Cancer Ther*. **2(5)**, 427-436.

Oktay, S. (Ed.). (1998). *Farmakoloji*. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.

Olt, G.J., Berchuck, A. ve Bast, R.C. Jr. (1990). Gynecologic tumor markers. *Semin Surg Oncol*. **6(6)**, 305-313.

Oulet, M. ve Percival, M.D. (2001). Mechanism of Acetaminophen Inhibition of Cyclooxygenase Isoforms. *Arch Biochem Biophys*. **387(2)**, 273-280.

Öktem, G., Vatansever, S., Ayla, S., Uysal, A., Aktaş, A., Karabulut, B. ve ark. (2006). Effect of apoptosis and response of extracellular matrix proteins after chemotherapy application on human breast cancer cell spheroids. *Oncology Reports* **15**:335-340.

Özalpan, A. (2001). *Temel Radyobioloji*. İstanbul, Haliç Üniversitesi Yayınları.

Partridge, E.E. ve Barnes, M.N. (1999). Epithelial ovarian cancer: prevention, diagnosis, and treatment. *CA Cancer J Clin*. **49(5)**, 297-320.

Pasha, K.V. ve Vijayan, E. (1989). Glutathione distribution in rat brain at different ages and the effect of intraventricular glutathione on gonadotropin levels in ovariectomized steroid-primed rats. *Brain Res Bull*. **22(4)**, 617-9.

Posadas, I., Vellecco, V., Santos, P., Prieto-Lloret, J. ve Ceña, V. (2007). Acetaminophen potentiates staurosporine-induced death in a human neuroblastoma cell line. *Br J Pharmacol.* **150(5)**, 577-585.

Qui, C., Xin, L., You-Ji, F. (2006). Glycogen synthase kinase-3 β positively regulates the proliferation of human ovarian cancer cells. *Cell Research.* **16**, 671-677.

Renshaw, P.F., Summers, J.J., Renshaw, C.E. ve ark. (1986). Changes in the 31 PNMR spectra of cats receiving lithium chloride systemically. *Biol Psychiatry.* **21**, 694-698.

Rodríguez-Burford, C., Barnes, M.N., Oelschlager, D.K., Myers, R.B., Talley, L.I., Partridge, E.E. ve ark. (2002). Effects of Nonsteroidal Anti-Inflamamatory Agents (NSAIDs) on Ovarian Carcinoma Cell Lines: Preclinical Evaluation of NSAIDs as Chemopreventive Agents. *Clin Cancer Res.* **8(1)**, 202-209.

Rong, W., Yali, Z., Eric, R., Fearon, ve Kathleen R. Cho. (2001). Diverse Mechanisms of β -Catenin Deregulation in Ovarian Endometrioid Adenocarcinomas. *Cancer Research* **61**, 8247–8255.

Santini, M.T. ve Rainaldi, G. (1999). Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology.* **67(3)**, 148-157.

Schiffenbauer, Y.S., Abramovitch, R., Meir, G., Nevo, N., Holzinger, M., Itin, A. ve ark. (1997). Loss of ovarian function promotes angiogenesis in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci.* **94(24)**, 13203-8.

Sharma, H.W. ve Narayanan, R. (1996). The Nf-KappaB Transcription Factor in Oncogenesis. *Anticancer Research.* **16(2)**, 589-596.

Struewing, I.T., Barnett, C.D., Tang, T. ve Mao, C.D. (2007).Lithium increases PGC-1 α expression and mitochondrial biogenesis in primary bovine aortic endothelial cells. *FEBS J.* **274(11)**, 2749-2765.

Sun, A., Shanmugam, I., Song , J., Terranova, P.F., Thrasher, J.B. ve Li, B. (2007). Lithium suppresses cell proliferation by interrupting E2F-DNA interaction and subsequently reducing S-phase gene expression in prostate cancer. *Prostate.* **67(9)**, 976-988.

Tanaka, C., Nishizuka, Y. (1994). The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annu Rev Neurosci.* **17**, 551-567.

Tang, H.R. ve He, Q. (2003). Effects of lithium chloride on the proliferation and apoptosis of K562 leukemia cell *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* **28(4)**,357-360.

Tseng, W.W., Deganutti, A., Chen, M.N., Saxton, R.E. ve Liu, C.D. (2002). Selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib (Vioxx) induces expression of cell cycle arrest genes and slows tumor growth in human pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg.* **6(6)**, 838-843.

Türkölmez, K., Bedük, Y., Baltacı, S., Göğüş, C. ve Göğüş, O. (2003). Gemcitabine plus vinorelbine chemotherapy in patients with advanced bladder carcinoma who are medically unsuitable for or who have failed cisplatin-based chemotherapy. *Eur Urol.* **44(6)**, 682-686.

Vona-Davis, L., Yu, A., Magabo, K., Evans, T., Jackson, B., Riggs, D. ve ark. (2004). Peptide YY attenuates transcription factor activity in tumor necrosis factor-alpha-induced pancreatitis. *J Am Coll Surg.* **199(1)**, 87-95.

Yıldız, A., Tunca, Z., (2001). Duygudurum düzenleyici iki ilaç lityum ve valproatın etki mekanizmalarına ilişkin bulgular. *Türk Psikiyatri Dergisi.* **12(2)**, 147-155

Warner, T.D., Mitchell, J.A. (2002). Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum? *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99(21)**, 13371-13373.

Zaragosi, L.E., Wdziekonski, B., Fontaine, C., Villageois, P., Peraldi, P. ve Dani, C. (2008). Effects of GSK3 inhibitors on in vitro expansion and differentiation of human adipose-derived stem cells into adipocytes. *BMC Cell Biol.* **13**, 9-11.

Zhang J, Huang W, Chua SS, Wei P, Moore DD. (2002). Modulation of acetaminophen-induced hepatotoxicity by the xenobiotic receptor CAR. *Science.* **298(5592)**, 422-4.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Selame Nuray	Soyadı	Atılmış
Doğ.Yeri	Trabzon	Doğ.Tar.	06/02/1981
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	66934062422
Email	selamee@yahoo.com	Tel	535-8405724

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (Burslu)	2004
Lise	Kenan Evren Lisesi (Yabancı dil ağırlıklı lise)	1999

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2006-2008

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi	73.75	
İtalyanca	Orta	Orta	Orta		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	82.973	82.995	82.158
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Word	Çok iyi
Excel	Çok iyi
Power Point	Çok iyi

Yayımları:

1) Aybar, B., Emes, Y., Atalay, B., Vural, P., Kaya, A.S., **Eren, S.N.**, Işsever, H. ve Bilir, A. (2008 Feb 7). Effects of bone morphogenetic protein on neonatal rat calvarial osteoblast-like cells: An in vitro study. J Biomed Mater Res A.

2) Mine Ergüven, Ayhan Bilir, Tülay İrez, Seyfettin Uludağ, **Selame Nuray Atılmış**, Esin Aktas, Ebru Karabulut, Erkut Attar. (24-27 Şubat 2008). Handshaking of imatinib mesylate with lithium chloride and medroxyprogesterone acetate in the treatment of human endometrial adenocarcinoma cell line Ishikawa. Multidisipliner Araştırma Sempozyumu. CD, 11 nolu sözlü bildiri. Bursa-Uludağ.

Sertifikaları:

1) Deney Hayvanlarının Biyolojik Araştırmalarda Kullanılması Kursu. (Haziran 2007). İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı.

2) Uygulamalı Deney Hayvanları Kursuna Katılım Belgesi. (Mayıs 2005). İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü.

3) “Uyuşturucu ve Gençlik” konulu kompozisyon yarışması başarı belgesi. (1998).

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Yazmak, kitap okumak, müzik dinlemek, bisiklete binmek , yüzmek , yürüyüş yapmak , tiyatroya ve sinemaya gitmek , sektörel gelişme ve makaleleri internetten takip etmek.