

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YL-2023 -0070

PKR KİNAZ AKTİVASYONUNUN KORYOKARSİNOM
HÜCRELERİNDE KEMOTERAPÖTİK AJANA
DUYARLILIĞINA ETKİSİ

Büşra BİLEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Abdullah YALÇIN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-21031 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2023

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Büşra BİLEN tarafından hazırlanan “PKR kinaz aktivasyonunun koryokarsinom hücrelerinde kemoterapötik ajana duyarlılığına etkisi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07/08/2023

Üye (T.D.): Prof. Dr. Abdullah YALÇIN Aydın Adnan Menderes
Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Gizem DÖNMEZ YALÇIN Aydın Adnan Menderes
Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Ayşegül YILDIZ Muğla Sıtkı Koçman
Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK
Enstitü Müdürü V.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda akademik bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen ve yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Abdullah YALÇIN 'na çok teşekkür ederim.

Bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Gizem Dönmez YALÇIN'a,

Tez çalışmamda laboratuvarında çalıştığım zaman yardım ve emeklerini esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Araştırma Görevlisi Umut Kerem KOLAÇ ve Araştırma Görevlisi Bakiye GÖKER BAĞCA,

Tez çalışmama farklı bakış açıları içeren fikirleriyle ve tavsiyeleriyle katkı sağlayan, bilgi ve önerilerini benimle paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Elif ERTÜRK'e,

Tez çalışmamda labartuvarında çalışmalarımnda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen doktora öğrencisi Sibel ÇINAR ASA'ya,

Her koşulda yanımda olup moral ve motivasyon sağlayan, bütün sevinç ve üzüntülerimi paylaştığım değerli hocam Prof. Dr. Sibel TAŞ'a,

Hayatım boyunca her koşulda yanımda olan,sonsuz güven desteklerini esirgemeyen tez çalışmam süresince gösterdiği sabır, özveri ve hoşgörüsünü esirgemeyen canım aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar	3
2.2.1. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklarda Epidemiyoloji.....	4
2.2.2. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıkların Genetik Özellikleri	5
2.2.3. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıkların Tanı ve Tedavisi	5
2.3 Kemoterapi İlacı Doksorubisin.....	6
2.4. Koryokarsinom	6
2.5. PKR	7
2.5.1. PKR Tanımı ve Yapısı.....	7
2.5.2. PKR Aktivasyonu	8
2.6. Apoptoz	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	10
3.1. Gereç.....	10
3.1.1. Cihazlar.....	10
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	11

3.2. Yöntem	13
3.2.1. Hücre Kültürü	13
3.2.1.1. Çalışmada Kullanılan Hücreler	13
3.2.1.2. Kullanılan Kemoterapik Doksorubisin İlacının Hazırlanması	13
3.2.1.3. Hücre Hattının Stoktan Çıkarılması	13
3.2.1.4. Hücre Hattının Pasajlanması	14
3.2.1.5. Hücre Hattının Stoklanması	14
3.2.1.6. Kullanılan Mediumun Hazırlanması	14
3.2.2. Çalışmada Kullanılacak Hücre Gruplarının Belirlenmesi	15
3.2.3. Hücre Sayım Cihazı ile Hücrelerin Canlı ve Ölü Oranlarının Belirlenmesi	15
3.2.4. Metiltiazotetrazolium (MTT) Canlılık Testi	16
3.2.5. Flow Sitometri Metodu.....	18
3.2.6. Protein İzalasyonu	19
3.2.7. Protein Tayini Metodu	20
3.2.8. Western Blot Metodu	21
3.2.9. İstatiksel Analizler.....	22
4. BULGULAR	23
4.1. Hücre Sayım Cihazı ile Canlı ve Ölü Hücre Sayım Oranı Bulguları	23
4.2. MTT (Metiltiazotetrazolium) Canlılık Metodu Bulguları	32
4.3. Flow Sitometri Metodu Bulguları	39
4.4. Western Blot Deneyi Bulguları	52
5. TARTIŞMA.....	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR.....	59
BİLİMSEL ETİK BEYANI	63
ÖZ GEÇMİŞ.....	64

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Apaf 1	: Apoptotik Proteaz Aktive Eden Faktör
ATF-4	: Aktivatör Transkripsiyon Faktörü
BSA	: Bovin serum albümin
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
Dox	: Doksorubisin
dsRNA	: Çift Zincirli RNA
EIF2α	: Ökaryotik Başlatma Faktörü
ER	: Endoplasmik Retikulum
ETT	: Epiteloid Trofoblastik Tümör
FBS	: Fetal Bovin Serum
GTH	: Gestasyonel Trofoblastik Hastalık
GTT	: Gestasyonel Trofoblastik Tümörleri
HCG	: İnsan Koryonik Gonadotropin
IFN	: İnterferon
LPS	: Lipopolisakkarit
MTT	: Metiltiazotetrazolium
PBS	: Fosfat Tuzu Tamponu
PERK	: PKR (RNA'ya bağlı protein kinazı) –ER kinaz ile ilişkili
PKR	: Protein Kinaz RNA
POLYI:C	: Poliinosinik:Polisitidilik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Doksorubisinin moleküler yapısı.	6
Şekil 2. Apoptozun regülasyonu	9
Şekil 3. MTT testinin yapılışı	17
Şekil 4. Protein konsantrasyonu standart grafiği.....	21
Şekil 5. Swan 71 hücrelerinde doksorubisin uygulanan canlılık yüzdesi eğri grafiği.	23
Şekil 6. Swan 71 hücrelerinde doksorubisin uygulanan canlılık yüzdesi sütun grafiği.....	24
Şekil 7. Swan 71 hücrelerinde poly I:C, LPS ve doksorubisin uygulanan canlılık yüzdesi eğri grafiği.....	25
Şekil 8. Swan 71 hücrelerinde poly I:C, LPS ve doksorubisin uygulanan canlılık yüzdesi sütun grafiği.	25
Şekil 9. Swan 71 hücrelerinde doksorubisin uygulanan ölü hücre oranı eğri grafiği.	26
Şekil 10. Swan 71 hücrelerinde doksorubisin uygulanan ölü hücre oranı sütun grafiği.....	27
Şekil 11. Swan 71 hücrelerinde poly I:C, LPS ve doksorubisin uygulanan ölü hücre oranı eğri grafiği.....	28
Şekil 12. Swan 71 hücrelerinde poly I:C, LPS ve doksorubisin uygulanan ölü hücre oranı sütun grafiği.	28
Şekil 13. Swan 71 hücrelerinin kontrolü ve en yüksek doz doksorubisin grafiği.	29
Şekil 14. Swan 71 hücrelerine uygulanan poly I:C, LPS ve doksorubisin grafiği.....	30
Şekil 15. Doksorubisin grubu ve Poly I:C/LPS/Dox grubu eğri grafiği.	31
Şekil 16. 100 µM Doksorubisin grubu ile 100 µM Dox/LPS/poly I:C grubu grafiği.....	31
Şekil 17. MTT canlılık deneyinde birinci deney sonuçlarının grafiği.	33
Şekil 18. MTT canlılık deneyinde ikinci deney sonuçlarının grafiği.....	34
Şekil 19. MTT canlılık deneyinde üçüncü deney sonuçlarının grafiği.	35
Şekil 20. MTT canlılık deneyinde dördüncü deney sonuçlarının grafiği.....	36
Şekil 21. MTT canlılık deneyinde ikinci metot birinci deney sonuçlarının grafiği.	37
Şekil 22. MTT canlılık deneyinde ikinci metot ikinci deney sonuçlarının grafiği.....	38
Şekil 23. MTT canlılık deneyinde ikinci metot üçüncü deney sonuçlarının grafiği.	39
Şekil 24. Gruplara göre canlılık yüzdeleri	40
Şekil 25. Dox grubu ve poly I:C, LPS ve dox grubunun canlılık yüzdesi	40
Şekil 26. Gruplara göre nekroz yüzdeleri	41

Şekil 27. Dox grubu ve poly I:C, LPS ve dox grubunun nekroz yüzdesi	42
Şekil 28. Gruplara göre erken apoptoz yüzdesi	43
Şekil 29. Gruplara göre geç apoptoz yüzdeleri	44
Şekil 30. Dox grubu ve poly I:C, LPS ve dox grubunun geç apoptoz yüzdesi	44
Şekil 31. Gruplara göre canlılık yüzdeleri	45
Şekil 32. Dox grubu ve poly I:C, LPS ve dox grubunun canlılık yüzdesi	46
Şekil 33. Gruplara göre nekroz yüzdeleri	47
Şekil 34. Dox grubu ve poly I:C, LPS ve dox grubunun canlılık yüzdesi	47
Şekil 35. Gruplara göre erken apoptoz yüzdesi	48
Şekil 36. Gruplara göre geç apoptoz yüzdesi	49
Şekil 37. Dox grubu ve poly I:C, LPS ve dox grubunun geç apoptoz yüzdesi	49
Şekil 38. Kontrol grubun, poly I:C ve LPS grubun, Doksorubisin grubu ve poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubuyla canlılık, nekroz, geç apoptoz ve erken apoptoz sonuçlarının değerlendirilmesi ve yüzde değerleri. Poly I:C/ LPS 48 saat, Doksorubisin 24 saat histogramları	50
Şekil 39. Kontrol grubun, poly I:C ve LPS grubun, Doksorubisin grubu ve poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubuyla canlılık, nekroz, geç apoptoz ve erken apoptoz sonuçlarının değerlendirilmesi ve yüzde değerleri. Poly I:C/ LPS 72 saat, Doksorubisin 48 saat histogramları	51
Şekil 40. p-PKR ve α -tubulin bant görüntüleri.....	52
Şekil 41. Gruplara göre p-PKR ve α -tubulin oranları.	53

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. MTT testinde birinci deneyin yapılışı.	18
---	----

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Hücrenin özellikleri ve hücre tipi.....	13
Tablo 2. Deney grupları.....	15
Tablo 3. Çalışmamızda uygulanan kimyasallar, ilaçlar ve dozları.....	16
Tablo 4. Çalışmamızdaki deney grupları ve dozları.....	17
Tablo 5. Çalışmamızdaki deney grupları ve dozları.....	19
Tablo 6. Çalışmamızdaki deney grupları ve dozları.....	20
Tablo 7. Bradford assay standartlar tablosu.	20
Tablo 8. Bradford assay örnekler tablosu.....	20

ÖZET

PKR KİNAZ AKTİVASYONUNUN KORYOKARSİNOM HÜCRELERİNDE KEMOTERAPÖTİK AJANA DUYARLILIĞINA ETKİSİ

BİLEN B. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Programı, Yüksek Lisans, Aydın, 2023.

Amaç: Hücre kültüründe çoğaltılan koryokarsinom hücrelerinin PKR aktivasyonu sonucunda proliferasyon, apoptotik özelliklerinin ne şekilde değişeceğini belirlemeyi, PKR aktivasyonunun koryokarsinom hücrelerinde kemoterapötik ajan doksorubisine karşı duyarlılığını belirleyerek, kanser tedavisinde kullanabilecek bir alternatif olabileceğini göstermeyi hedeflendi.

Gereç ve Yöntem: Hücre kültürü yöntemiyle koryokarsinom hücreleri çoğatıldı. Hücreler, doksorubisin grubu ve poly I:C/LPS/doksorubisin grubu olarak iki gruba ayrıldı. Doksorubisin farklı dozlarda hücrelere uygulandı. PKR aktivasyonu oluşturmak için ise LPS ve poly I:C hücrelere uygulandı. Ardından gruplar; kontrol, doksorubisin, poly I:C/LPS ve poly I:C/LPS/doksorubisin olarak oluşturuldu ve swan 71 hücreleri üzerine olan etkilerine belirlemek için MTT canlılık testi yapıldı. Flow sitometri yöntemiyle canlılığa, nekroz ve apoptoz yollarına bakıldı. Protein izolasyonu metoduyla protein elde edildi. Ardından, bradford deneyi ile elde edilen protein miktarı belirlendi. PKR aktivasyonun tespiti ve PKR aktivasyonunda doksorubisinin etkisini belirlemek için western blot deneyi yapılarak p-PKR bakıldı.

Bulgular: Hücre sayım cihazıyla yapılan deneyde doksorubisinin farklı dozları ile muamele edilen swan 71 hücrelerinde ve PKR aktive edilmiş hücrelerde doksorubisinle birlikte kontrole oranla doza ve zamana bağlı canlılık yüzdesinde konsantrasyon arttıkça istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi. Devamında MTT testi deney grupları değerlendirildi fakat sonuç elde edilemedi. Flow sitometride bu gruplarda canlılık değerlerine bakıldığında ise poly I:C/LPS/dox grubunda ise doksorubisin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı. Nekroz yolağında ise, LPS/polyI:C/dox grubunun ise doksorubisin grubun göre nekroz yolağına gittiği görüldü. Apoptoz yolağında, LPS/polyI:C/dox grubunun doksorubisin

grubuna göre apoptoza gittiği gözlendi. Son olarak tüm gruplarda p-PKR aktivasyonu western blot analiziyle tespit edildi. PKR aktivasyonunun doksorubisinin duyarlılığını engellediği görüldü.

Sonuç:PKR aktivasyonunun koryokarsinom hücrelerinde bir kemoterapötik ajan olan doksorubisine karşı direnç gösterdiği gözlendi.

Anahtar kelimeler: Doksorubisin, Koryokarsinom, PKR Aktivasyonu.

ABSTRACT

THE EFFECT OF PKR KINASE ACTIVATION ON THE SENSITIVITY OF CHORIOCARCINOMA CELLS TO A CHEMOTHERAPEUTIC AGENT

Bilen B. Aydın Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Medicine Faculty Medical Biology Program Master Thesis, Aydın, 2023.

Objective: It is aimed to determine how the proliferation and apoptotic properties of choriocarcinoma cells grown in cell culture will change as a result of PKR activation, and to show that PKR activation can be an alternative that can be used in cancer treatment by determining the sensitivity of PKR activation in choriocarcinoma cells to the chemotherapeutic agent doxorubicin.

Materials and Methods: Choriocarcinoma cells were grown by cell culture method. Cells were divided into two groups as doxorubicin group and poly I:C/LPS/doxorubicin group. Doxorubicin was applied to the cells at different doses. To create PKR activation, LPS and poly I:C were applied to the cells. Then the groups; control was formed as doxorubicin, poly I:C/LPS and poly I:C/LPS/doxorubicin and MTT viability assay was performed to determine their effects on swan 71 cells. Viability, necrosis and apoptosis pathways were examined by flow cytometry method. Protein was obtained by protein isolation method. Then, the amount of protein obtained by the Bradford experiment was determined. In order to detect PKR activation and to determine the effect of doxorubicin on PKR activation, western blot test was performed to determine p-PKR.

Results: In the experiment performed with the cell count device, statistically significant decreases were observed in the percentage of viability depending on dose and time compared to the control with doxorubicin in swan 71 cells and PKR activated cells treated with different doses of doxorubicin as the concentration increased. Subsequently, MTT test experimental groups were evaluated, but no result could be obtained. When the viability values in these groups were examined in flow cytometry, a statistically significant increase was found in the poly I:C/LPS/dox group compared to the doxorubicin group. In the necrosis pathway, it was observed that the LPS/polyI:C/dox group went to the necrosis pathway compared to the doxorubicin group. In the apoptosis pathway, it was observed that the LPS/polyI:C/dox group

went to apoptosis compared to the doxorubicin group. Finally, p-PKR activation was detected in all groups by western blot analysis. It was observed that PKR activation inhibited the sensitivity of doxorubicin.

Conclusion: It was observed that PKR activation showed resistance to doxorubicin, a chemotherapeutic agent, in choriocarcinoma cells.

Keywords: Choriocarcinoma, Doxorubicin, PKR Activation.

1. GİRİŞ

Kanser, insan vücudunun organ ve dokularındaki hücrelerin çevresel ve genetik faktörler etkisiyle kontrolsüz bir şekilde çoğalıp farklılaşması sonucu oluşan ve yaşamı tehdit eden kompleks bir hastalıktır (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Gestasyonel trofoblastik, anormal plasentadan oluşan lokal invazyon ve metastaz potansiyel özelliğine sahip bir hastalıktır (Soper, 2021). Gestasyonel tümörleri, hidatidiform molar gebelikleri ve neoplastik olmayan tümör benzeri lezyonları bu durumların çoğu trofoblast proliferasyonu ilgili olarak genotip ve fenotipine bağlı olarak oluşur. Gebelik sırasında ve gebelikten sonra ortaya çıkan gestasyonel trofoblastik hastalıklar, premalign kısım hidatidiform mol ve malign kısım invaziv mol koryokasinom, plasental kısım trofoblastik tümör ve epitelooid tümör olmak üzere dört grup şeklinde ayrılır ve bunlar trofoblastik neoplazi olarak da bilinirler (Seckl ve diğerleri, 2010). Premalign mol hidatidiform türünün tedavi edilme olasılığı yüksek iken; malign kısım invaziv mol koryokasinom, plasental kısım trofoblastik tümör ve epitelooid tümörlerde ölüm riski fazla olduğundan tedavi edilme durumu düşüktür (Ngan ve diğerleri, 2021).

Koryokarsinom, trofoblast kökenli olup normal olmayan plasenta trofoblast hücrelerinin çoğalmasıyla oluşan malign bir tümördür. Koryokarsinom en ölümcül hastalık olmakla birlikte akciğer, karaciğer ve merkezi sinir sistemine metastaz yapma özelliğine sahiptir (Wang ve diğerleri, 2022). Nekroz ve hemorajiyle karakterize edilen germ hücreli bir tümör bileşeni olması mevcuttur. Koryokasinom gestasyonel olmayan ve gestasyonel olarak iki tipe ayrılır ve gestasyonel olmayan tip daha kötü huylu tümör olup kemoterapi ilaçlarına dirençlidir. Koryokasinom hastalığının tanısı, insan koryonik gonadotropin (HCG) protein seviyesi ölçülerek belirlenir (Ngan ve diğerleri, 2021). Koryokarsinom cerrahi işlem, radyoterapi ve kemoterapi ilaçlarıyla tedavi edilir (Wang ve diğerleri, 2022). Bununla birlikte kemoterapi ilacı olan doksorubisin, kanser tedavilerinde kullanılan lipozomal kapsüllü antikanser ilacıdır. Doksorubisin pegile lipozomal doksorubisin olarak da bilinmektedir ve doksorubisin içeren lipozomun etrafında bir polietilen glikol yapısı içermektedir (Soininen ve diğerleri, 2015).

Protein kinaz RNA (PKR); hücreyel olaylara cevap olarak transdüksiyonu düzenleyen, hücrede çeşitli yerlerde bulunabilen ve protein translasyonunu regüle eden eIF2 α proteinini fosforile eden bir serin treonin kinazdır. Viral enfeksiyon, yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi, stres uyarılara cevap olarak hücre sinyali ökoryotik başlatma faktörü 2' nin alfa alt

biriminin fosforilasyonu ile birleşip, dört kinaz ailesinden $elf2\alpha$ 'nin fosforilasyonu ile gerçekleşir. Viral enfeksiyona cevap olarak aktive edilen PKR'ın RNA ile etkilişimi dimerizasyonu destekler ve otoposforilasyona uğrar, daha sonra $elf2\alpha$ 'yı fosforile ederek genel translasyonu kapatır. Bu esnada ATF4 stres tepkisi transkripsiyon faktörünün artan translasyonu ile downstream sinyal kaskadını aktive eder (Hesler ve diğeri, 2021). PKR, endoplazmik retikulum stresinde (ER stres) aktive olan bir stres kinazıdır. Benzer şekilde ER streste de protein sentezini durdurarak yanlış katlanmış proteinlerin oluşmasını azaltır. PKR aktivasyonu için PKR'leri bağlayan RNA'lar aktif yapıyı destekleyen kinaz alanında dimerizasyonu indükler (Cole, 2007).

Apoptoz; gelişme ve yaşlanma sırasında hasar gören hücreleri korumak için gerçekleşen kontrollü hücre ölümüdür (Elmore, 2007). Apoptoz, normalde hücrenin gelişme, yaşlanma ve farklılaşması sırasında hücrenin korunması için homeostatik bir mekanizma olarak ortaya çıkar. Hasar görülen hücrelerde ölüm sinyalleri, hücre ölümünün yürütülmesinden sorumlu olan kaspazların aktivasyonuna yol açan sinyal yolları aracılığıyla iletilir ve hücre kontrollü bir şekilde ölüme gider (Xu ve diğeri, 2019). Nekroz; litik viral enfeksiyon, hipertemi, iskemi, hipoksi ve şiddetli oksidatif stress gibi durumlarda hücrelerin hasar görek hücrenin kendi enzimiyle kendini yok etmesi yani kontrolsüz hücre ölümüdür. Hücrenin ölümüyle beraber geçen sürede hücrenin kendi kendini yok etme durumu otoliz olarak da tanımlanır (Elmore, 2007).

Bu çalışmada; hücre kültüründe çoğaltılan koryokarsinom (swan 71) hücrelerinin PKR aktivasyonu sonucunda proliferasyon ve apoptotik özelliklerinin ne şekilde değişeceğini belirlemek amaçlanmıştır. Bununla birlikte, PKR aktivasyonunun koryokarsinom hücrelerinde kemoterapötik ajan olan doksorubisinin duyarlılığına etkisini belirlemek ve kanser tedavisinde kullanılabilecek bir alternatif olabileceğini göstermek hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, anormal hücrelerin bulunduğu ortamda ya da uzak ortamlarda kontrolsüz olarak çoğalıp büyümeleri sonucu oluşan bir hastalıktır. Kansereleşme; çevre, genetik ve yaşlanmanın etkisiyle hücre proliferasyonundaki anormallik ile hücrelerde oluşan mutasyonların birikmesi sonucu meydana gelir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre kalp krizinden sonra kanser ikinci sırada olan en ölümcül hastalıktır (Roy ve Saikia, 2016). Kanser 20. yüzyılda en korkulan hastalıkların biri olmakla beraber son yıllarda her dört kişiden biri ömür boyu kanser riski taşımaktadır. Kanser tedavisi cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi yaygın olarak kullanılan tedavi yöntemleridir.

2.2. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar

Gestasyonel trofoblastik hastalık, plasenta kökenli olan neoplastik olmayan tümör benzeri lezyonları, hidatidiform molar gebelikleri ve gestasyonel trofoblastik tümörleri (GTT) içeren bir hastalıktır. Gestasyonel trofoblastik neoplazi, lokal invazyon ve metastaz potansiyeline sahip hastalıktır (Seckl ve diğerleri, 2010). Gestasyonel trofoblastik hastalık (GTH), anormal fertilizasyon sonrasında görülen bir hastalık olmakla beraber benign GTH ve malign GTH olarak iki sınıfa ayrılır. Benign GTH'lar komplet mol hidatiform, parsiyel mol hidatiform, plasental site nodül, egzajere plasental site olarak sınıflandırılabilir. Malign GTH'lar, invazif mol hidatiform, koryokarsinom, plasenta yerleşimli trofoblastik tümör (PSTT) ve epiteloïd trofoblastik tümör (ETT) sınıflandırılır. WHO'ya göre; gestasyonel trofoblastik hastalık hidatiform mol, invazif mol, koryokarsinom ve plasental bölge tümörü olarak dört sınıfa ayrılmıştır (Kaur, 2021).

Hidatiform mol : Hidropik villusların geçişi ve anomormal kanamadan dolayı semptomlar olduğunda gebeliğin ilk yarısında teşhis edilir. Tam ve kısmi olmak üzere histolojik ve morfolojik olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Tam hidatiform mol ve kısmi hidatiformde gametogenez ve döllenmedeki bir hatadan dolayı plasental villustta küçük üzüm benzeri (hidatidiform) yapılar olur. Kısmi molde histolojik özellikler tam mole göre daha az belirgindir (Soper, 2021).

İnvazif mol : Trofoblast proliferasyonu, troblast büyümesi metastaz yapabilen hidropik koryonik villüs ile karakterizedir. Tam molar gebelikten sonra ortaya çıkan anormal vajina

kanama, uterus büyümesi ve artmış β -HCG yüksekliğiyle belirtiler gösterir (Silva ve diğerleri, 2021).

Plasental bölge tümörü : İmplantasyondan meydana gelen monoforfik ekstrasvillöz sitotroblast benzeri hücreler popülasyonundan meydana gelir. Gebelikle olayında gelişebilir veya geliştikten yıllar sonra ortaya çıkabilmektedir. En önemli belirtiler anomal vajinal kanama ve uterus büyümesidir (Silva ve diğerleri, 2021).

Koryokarsinom : Molar gebelikten sonra oraya çıkan germ hücrelerinden ve somatik hücrelerden elde edilir. Hem anne ve hem fetüsta metastaz gelişimi olabilmektedir. Vajinal kanama, artmış β -HCG yüksekliği ve metastik bölgelerde kanama varlığıyla en önemli belirtileridir (Silva ve diğerleri, 2021).

2.2.1. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklarda Epidemiyoloji

Gestasyonel trofoblastik hastalık insidans verileri Asya, Orta Doğu ve Afrikada rapor edilen bilgiler doğrultusunda en yüksek oranda görülmektedir. Hidatiform mol indasına göre Kuzey Amerika, Avusturya ve Yeni Zelanda elde edilen çalışmalarda 1000 gebelikle 0.57- 1.1 arasında değişim gösterirken Güneydoğu Asya da 1000 gebelikte 2,0 gibi yüksek veriler bulunmuştur. Gestasyonel hastalıkların Asya ülkelerinde daha fazla olmasının sebebini genetik özellikler ve kültürel faktörlere bağlamaktadırlar. Koryokarsinom insidans oranları, koryokarsinomun nadir olmasından dolayı sınırlıdır. Koryokarsinom Avrupa ve Kuzey Amerika da 40.000 gebelikten 1'inde görünürken, Güneydoğu Asya ve Japonya da 40.000 gebelikten 9.2 ve 3.3 insidans verileri de görülmektedir. Hidatiform mol 21- 35 yaş arası kadınlar 1.9 kat riske sahipken, 40 yaş üstü kadınlarda ise 7.5 katı daha fazla görülmektedir. Hidatiform mol obstetrik risk faktörü gebelikte düşük yapan kadınlarda düşük yapmayan kadınlara karşılaştırıldığında 2 veya 3 kat daha fazla molar gebelik riski oluşmuştur. Koryokarsinomda önceden hidatidiform mol geçirmiş ve ileri yaşlarda gebe kalma durumunda risk faktörü oluşmuştur. Bununla birlikte, kan grubu A olan kadınlarda koryokarsinom görülme olasılığı daha fazladır (Luarin, 2010).

2.2.2. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıkların Genetik Özellikleri

Tam hidatiform mol baba genomundan gelen kromozomal tamamlayıcına sahip olan germ kökenlidir. En yaygın karyotip 46 XX'dır. Tam hidatiforma neden olan dispermik dölleme ve Y kromozomuna sahiptir. Kısmi hidatiform mol ise bir anneden gelen kromozom ve iki babadan gelen kromozom trizomiye sahip olarak 69 XXX, 69 XXY veya 69 XYY karyotipine yapı olan trizomidir ve 69 YYY görülmez. Tekrarlayan mol olan hastaların metarnal etki genleri olan NLRP7 ve KHDC3L 'de germ hattı mutasyonları sırasıyla %48-80 ve %10-14 görülür. Baba tarafından gelen p57 sikline bağımlı kinaz inhibitörü anne tarafından ifade edilen gendir (Soper, 2021).

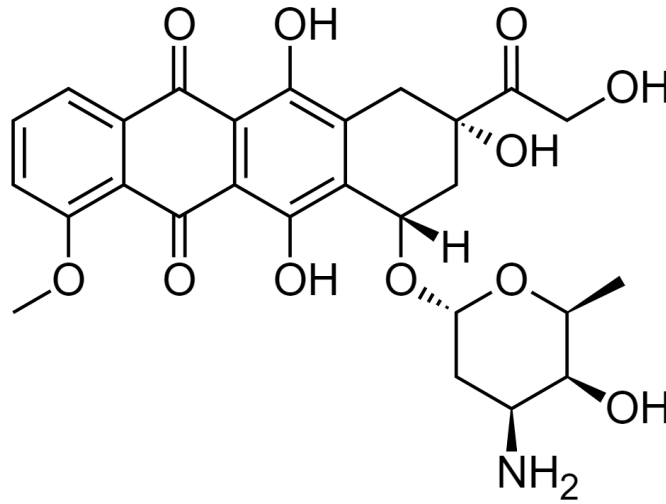
2.2.3. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıkların Tanı ve Tedavisi

Gestasyonel troblastik hastaların tanı ve tedavisinde biyobelirteç olarak HCG seviyelerine bakılmaktadır. Troblast hastalığının erken döneminde HCG değerinin serumda yüksek çıkması hastalığın tanısını belirler. Koryokarsinomda hc protein yapısı farklılık gösterebilir ve normal gebelikte sentezlenen HCG daha büyük oligosakkarid yan zincirine sahip olmaktadır. Bu hiperglikoze hcg olarak isimlendirilir. Gestasyonel trofoblast hastalığının tanısında birkaç farklı biyobelirteçler de bulunur. Koryokarsinom için Ki-67 CD146, MUC-4, HLA-G belirteç olarak kullanılabilir (Silva ve diğerleri,2021).

Gestasyonel trofoblastik hastalığın tedavisinde cerrahi yöntem, radyoterapi ve kemoterapi yöntemleri kullanılır. Kemoterapi olarak tek bir ajan kullanıldığında ve cevap alındığında HCG değerleri tedavi sırasında düşüşe geçer, eğer yükselirse veya doz yeterli değilse ya da tedaviyi engelliyorsa alternatif olarak başka ajanla değiştirilmelidir (Ngan ve diğerleri, 2021). Kemoterapötik ajanlardan metotreksattan ve aktinomisin D uygulandığında, HCG seviyelerinin %76 ve %87 arasında iyi bir cevap oranı verdiği gözlenmiştir ve bununla birlikte birden fazla kemoterapi ilacı düşünülebilir. Koryokarsinom hastalarında metastaz potansiyeli olduğu ve kemoterapötik ajana dirençli olduğu için iki farklı ajan uygulanabilir (Ngan ve diğerleri, 2021). Gestasyonel trofoblast hastalarında pembroluzimab ve avelumab ilacı, dirençte etkili olduğu bildirilen bir Anti-PD-1 kemoterapi ajanıdır. HCG değerleri normale ulaştığında tedavi başarısız olarak değerlendirilir. Kemoterapi üç kür alındığında stabilize olursa hastaların tedaviye dirençli olduğunu belirtilir ve ikinci basamak tadeviler uygulanmalıdır (Silva ve diğerleri, 2021).

2.3 Kemoterapi İlacı Doksorubisin

Doksorubisin; hücre yapılarının yıkımı, hücre ölümü ve kanser hücrelerinin büyümesini engellemesi gibi birkaç sitotoksik mekanizmalarının aracılık ettiği, çeşitli kanser hastalarının tedavisinde kullanılan antrasiklin antibiyotiktir. Çeşitli kanser türlerinde kanser hücrelerini öldürme potansiyeli yüksektir. Doksorubisin ve sorafenib FDA tarafından onaylanmış ilaçlardır (Sotto ve diğerleri, 2021). Doksorubisinin etki mekanizması karmaşık bir halde olduğu için tamamen anlaşılmayıp DNA'yı etkilediğini düşünülür. Transkripsiyon esnasında DNA'daki çift bağı açılmasında görev yapan topoizomerez II enziminin ilerlemesini bloke eder (Soininen ve diğerleri, 2015).



Şekil 1. Doksorubisinin moleküler yapısı.

2.4. Koryokarsinom

Koryokarsinom, anarmol trofoblast hücrelerinin çoğalması, koryonik yapının yokluğu ve interstisyel transformasyonu ile karakterize olan agresif bir tümördür. Koryokarsinom gestasyonel ve gestasyonel olmayaan olarak iki sınıfa ayrılır. Gestasyonel olmayan karsinomlar germ hücreli bir tümör bileşini veya hipofraksiyone karsinomlarda somatik mutasyonlarıdır. Karyokarsinomlar genellikle gebelik sırasında ortaya çıkar bunlara gebelik karsinomları olarak isimlendirilir. Hidatidiform mol gebelikten oraya çıkan %50 den fazlası, erken doğumdan kaynanlanan veya geri kalan tubal gebelikte oraya çıkan %25 kısmını oluşturur (Mangla ve diğerleri 2017).

Koryokarsinom malign bir tümör olup metastaz yapma potansiyeline sahiptir. Distale akciğer, distale karaciğer ve merkezi sinir sisteme metastaz yaparak yayılır. Koryokarsinomun %5'i ise gastrointestinal sisteme metastaz yapma özelliği göstererek kötü prognoza sahiptir. Koryokarsinom hastalarının yaklaşık olarak %30' unda metastatik hastalık görülme durumu olmaktadır. Akciğer ise metastazı en sık görülen bölgedir (Mangla ve diğerleri, 2017). Farklı genetik kökenlere ve immünojenist seviyelerine sahip olan gestasyonel karsinom ve gestasyonel olmayan karsinomların kemoterapi ve tedavi olma durumları farklıdır (Wang ve diğerleri, 2022).

Gestasyonel koryokarsinom, DNA mutasyonlarından ortaya çıkmamakla beraber gelişim sırasındaki metilasyon aberasyonlarının sonucu olarak ortaya çıkma durumu olabilir. Bu durum erken troblast hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Gestasyonel koryokarsinom patogenezinde, moleküler düzeyde MDM2, TP53 ve epidermal büyüme faktörü reseptörünün aşırı ekspresyonu ile diğer onkoproteinlerin (BCL-2, c-FMS ve c-MYC) rol oynadığı bilinmektedir. Aynı zamanda koryokarsinomda NLRP7 geninde germline mutasyon görülmüş ve trofoblast proliferasyonunun, apoptoz üzerinde etkileri plasenta gelişiminde önemli rol oynamıştır (Fiore ve diğerleri, 2021).

Koryokarsinom hastalarının erken evresinde terapötik bir ajan oldukça etkili olur ve ileri evrede bu sayede iyi bir prognoz gösterir. Bu durumda hastaların %95'i kemoterapi ile iyileşme gösterir (Fiore ve diğerleri, 2021). Koryokarsinomda biyobelirteç olarak HCG seviyeleri ölçünerek tanı konulur. İlaveten, koryokarsinom kemoterapiye olan yüksek duyarlılığı göz önüne alınarak tedavi edilmelidir (Wang ve diğerleri, 2022).

2.5. PKR

2.5.1. PKR Tanımı ve Yapısı

Protein kinaz RNA (PKR); hücrel olaylara cevap olarak transdüksiyonu düzenleyen, çeşitli yerlerde bulunabilen ve protein translasyonunu regüle eden eIF2 α proteinini fosforile eden bir serin treonin kinazdır (Garcia ve diğerleri, 2007). Aminoasit uzunluğu en fazla 551' dir ve 2. kromozom üzerinde yer alır, (Freng ve diğerleri, 1992). PKR, ELF2AK2 gen tarafından kodlanır ve transkripsiyonel kontrol, hücre proliferasyonu, apoptoz düzenlenmesi ve mRNA'ya dönüşüm üzerine etkilidir. PKR bozukluğunda, kanser, metabolik bozukluklar, viral enfeksiyon ve nörodejeneratif hastalıklar ortaya çıkabilir (Garcia ve diğerleri, 2007).

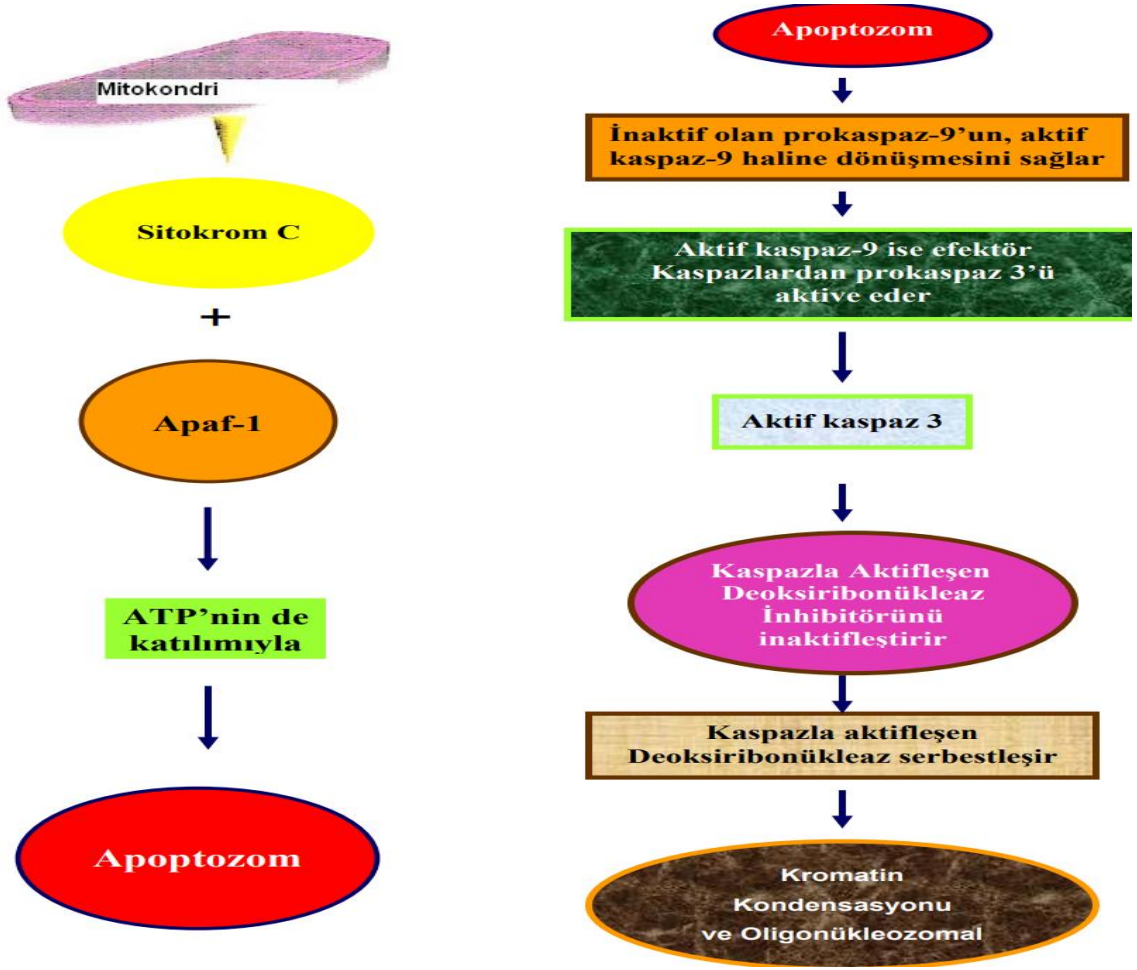
2.5.2. PKR Aktivasyonu

PKR aktivasyonunu; DNA hasarı, sitokinler, ER stresi, sitotoksik ve büyüme faktörleri artırır. Aynı zamanda PKR aktivasyonu, kaspaz aktivasyonuna apoptoz sırasında bağlanır (Lee ve diğerleri, 2022). PKR aktivasyonunu proteinler ve RNA'lar düzenler. RNA virüsü replikasyonunun PKR aktivatörü dsRNA' dır. dsRNA'lar, DNA virüsleriyle enfekte olan hücrelerin sitoplazmasında bulunur. Sirküler RNA' lar PKR inhibitörleridir ve kısa, RNA dupleksleri oluşturan PKR aktivasyonunu inhibe ederler. İnterferon (IFN) ve indüklenen protein kinaz ELF2AK2, protein aktivatörü bir PKR aktivatörüdür (Cesaro ve Michiels, 2021)

PKR, interferondan indüklenir. Viral kaynaklı enfekte olmuş hücrelerde çift sarmallı RNA'ya (dsRNA) bağlanır ve translasyonel başlatma faktörü eIF2 α ' yi fosforile eden kinazı aktive eden otofosforilasyon reaksiyonuna gider ve bundan dolayı viral durumda enfekte hücreler protein sentezini inhibe eder. PKR aktivasyonunda, hücresel protein PACT aktive olur ve bu durumda protein ve RNA'lar tarafından inhibe edilir (García ve diğerleri, 2007).

2.6. Apoptoz

Hücrenin hasar görmesi ile genetik ve moleküler düzeylerinin kontrol edilerek, dolaylı gerçekleşen programlanmış hücre ölümü sürecidir. Apoptoz normalde hücrenin gelişme, yaşlanma ve farklılaşması sırasında hücrenin korunması için homeostatik bir mekanizma olarak ortaya çıkar. Apoptoz, hücreler zararlı ajanlar tarafından hasar gördüğünde ve apoptozu tetikleyen olaylar olduğunda bir savunma mekanizması olarak ortaya çıkar (Elmore, 2007). Fizyolojik ve patolojik olaylar sırasında istenilmeyen hücreler apoptoza giderek ve hücreyi komşu hücrelerinden uzaklaştırarak kontrollü şekilde ölüme götürürler. İntersik (içsel) yolak ve ekstrinsik (dışsal) yolak apoptoz yollarıyla birleşen uyanlarla apoptoz aktivasyonunu başlatır (Xu ve diğerleri, 2019).



Şekil 2. Apoptozun regülasyonu (Akşit ve Bildik, 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Cihazlar

Hücre kültür kabini (Labronco)

Pipet seti (10 µl, 200 µl, 1000 µl)

Buzdolapları (-80 °C, -20 °C, +4 °C) (Samsung)

Sıcak su banyosu (Memmert)

Hücre sayım cihazı (İnvitrogen countess)

İnkübatör (Nuaire)

Vorteks (İsolab)

Sıvı azot tankı (-196 °C)

Buz cihazı (Uğur buzaL60)

Santrifüj (Hettich zentrifugen)

Otoklav (Hirayama)

Flow sitometri cihazı

Spektrofotometre

Hassas terazi (Shimadzu)

pH metre (Mettler toledo)

Sıvı azot tankı (-196 °C)

Distile su cihazı (Nüve)

Soğutmalı santrifüj (Eppendorf centrifuge 5415 R)

Orbital çalkalayıcı (IKA KS 130)

UV görüntüleme cihazı (G:Box Syngene)

Western blot seti (yürütme, transfer tankı, güç kaynağı, Biorad, Criterion)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Swan 71 hücre hattı

25 cm²' lik flask

10 cm²' lik petri kabı (Biologix)

Ham's F-12 besi yeri (Sigma)

Fetal sığır serumu (FBS, 500 ml, Sigma)

L-Glutamin solüsyonu (200 mM, 100 ml, Capricorn)

Penisilin/Streptomisin (100 ml, Capricorn)

Tek kullanımlık steril pipet (5ml, 10 ml,25ml Biologix)

Pastör pipeti (VWR)

Sodyum pirüvat (Gibco)

Tripsin-EDTA (% 0,05, Capricorn)

Dulbecco's PBS (1x, Sigma)

6 well plate (Biologix)

5 ml şırınga (BD-Luer-Lok™ Tip)

15 ml' lik falkon (İsolab)

50 ml' lik steril falkon (İsolab)

Cryotube (İsolab)

Enjektör filtresi (İsolab)

Dimetil Sülfoksit (DMSO, Merck)

Etanol (Merck)

RIPA lizis tamponu (ABT)

Protein kuantifikasyon kiti (Bradford testi, Abcam)

Proteaz ve fosfataz inhibitörü (100x, MedChem Express)

Tripan mavisi (İnvitrogen)

Tris hidroklorid (Sigma)

Tris base (Nzytech)
Sodyum klorür (Merck Millipore Emsure)
Yağsız süt tozu (Pınar)
Hücre sayım slaytı (CountessTM)
MTT testi kiti (Biotum)
ECL (Biorad)
Tubulin antikoru (Elabscience)
Muse kiti
Glisin (Nzytech)
 β -Merkaptoetanol (Merck Millipore)
Metanol (Merck Millipore)
SDS-PAGE yükleme boyası (5x, Nzytech)
SDS-PAGE jeli (Biorad, Criterion midi)
Whatman Kağıdı (Filtre kağıdı, Whatman)
Hücre sayım slaytı (CountessTM)
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (BioShop)
Nitro seluloz membran (Santa Cruz)
Tween 20 (Sigma)
Anti-Rabbit IgG-HRP sekonder antikor (Elabscience)
Mdivi-1 (Kat. no: A14316, Adooq), Dynasore (Kat. no: A12726, Adooq)

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. Çalışmada Kullanılan Hücreler

Hücre Kültürü, canlıdaki büyüme ortamını taklit ederek hücrelerin bölünüp çoğalmasını sağlayan, kontrollü şartlar altında olan bir süreçtir. Çalışmamızda kullandığımız hücre hattı, insan plasenta koryokarsinom (Swan 71) dur. Swan 71, koryokarsinomlu bir bireyin plasentasından izole edilen bir hücre dizisidir. Çalışmada kullandığımız swam 71 hücre hattının hücre tipi ve hücrenin özellikleri Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Hücrenin özellikleri ve hücre tipi.

Organizma	Homo sapiens, İnsan
Morfoloji	Epitelyal
Doku	Plasenta
Hastalık	koryokarsinom
Büyüme Özelliği	Adherent

3.2.1.2. Kullanılan Kemoterapik Doksorubisin İlacının Hazırlanması

Doksorubisin, dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek DMEM besiyerinde 0.39 µg/ml, 1.56 µg/ml, 6.25 µg/ml, 25 µg/ml ve 100 µg/ml’lik dozlar halinde hazırlandı.

3.2.1.3. Hücre Hattının Stoktan Çıkarılması

-80°C’de kriyovial içinde saklanan Swan 71 hücre hattının hızlı bi şekilde çözülmesi için hücre 37 °C’de, % 5 CO₂ içeren ortamda 2 dk inkübe edildi. Çözüldükten sonra 15 ml’lik falkon tüpüne hücre süspansiyonu koyulup 1200 rpm’de 5 dk santifüj yapıldı. Daha sonra süpernant kısmı aspire edilip hücre peletinin üzerine 1 ml hams F12 besiyeri ilave edilip hücrenin süspansiyon haline getirildi. % 10 FBS, % 1 penisilin-streptomisin , %1 sodyum pirüvat ve %3 L-glutamin içeren 5ml hams F12 besiyeri 25 cm²’lik flask içerisine alındı ve 25 cm²’lik flask içerisine 1ml hücre süspansiyonu koyularak %5 CO₂ 37°C ’de içerdiği ortama bırakıldı.

3.2.1.4. Hücre Hattının Pasajlanması

İnkübasyona bırakılan hücreler 25 cm²'lik flask yüzeyini %80 kapladıklarında flask içerisinde mediumu aspire edildi. Hücrelerin besiyerinden tamamen arınması ve ölü hücrelerinin kalmaması için 25 cm²'lik flaskın içine 2 ml PBS koyularak yıkanması sağlandı. Yıkama işlemi bittikten sonra flaskın yüzey kısmına yapışan hücrelerin ayrılmasının için %0.05 Tripsin EDTA solüsyon flask içerisine bırakılıp hücreyi 37°C 'de, % 5 CO₂'li ortamda 3dk inkübe edilmesi sağlandı. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığı mikroskop altında bakıldığında hücrelerin yüzeyden ayrıldığı gözlemlendikten sonra tripsini inhibe yapabilmek için 3 katı kadar medium ilave edilip hücre süspansiyon oluşturuldu. 10 ml'lik petri içerisine % 10 FBS, % 1 penisilin-streptomisin , %1 sodyum pirüvat ve %3 L-glutamin içeren 8 ml hams F12 medium koyuldu. 10 ml'lik petri içerisinden 2 ml hücre süspansiyonu ilave edildikten sonra 37°C 'de, % 5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde hücrelerin çoğalması sağlandı.

3.2.1.5. Hücre Hattının Stoklanması

Hücreler 10 ml'lik petri yüzeyini tamamen kapladıklarında petri içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücrelerin besiyerinden tamamen arınması ve ölü hücrelerinin kalmaması için 10ml'lik petri içerisine 5 ml PBS ilave edilerek yıkanması sağlandı. Petri yüzeyine yapışan hücrelerin ayrılması için hücreler 1ml Tripsin EDTA solüsyonu içerisine bırakılıp hücrelerin 37°C' de, % 5 CO₂'li ortamda 3dk inkübe edilmesi sağlandı. Hücrelerin petri yüzeyinden ayrıldığı mikroskop altında bakıldıktan sonra tripsinin inhibe edilmesi için en az 3 katı kadar ortama medium konuldu. Hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkon içine alınıp 1200 rpm'de 5 dk santifüj yapıldı. Santifüjden sonra pelet kısmının kalması için süpernant kısmı aspire edildi. 1.5 ml kriyovial tüp için frezying medium (% 70 DMEM, % 20 Fetal Bovin Serum (FBS), % 10 DMSO) hazırlandı. 15'lik falkon içerisine frezying medium ilave edilip pipetaj yapılarak, hücre süspansiyon haline getirilip kriyovial tüpün içerisine alındı. Hücreler -20°C'de buzdolabında 20 dk bekletildikten sonra -80°C'deki buzdolabına konuldu.

3.2.1.6. Kullanılan Mediumun Hazırlanması

Swan 71 hücre dizisi için %10 fetal bovine serum, % 1 penisilin-stroptomisin, % 3 L-glutamin ve %1 Sodyum pirüvat içeren hams F12 besiyeri solüsyonu kullanıldı.

3.2.2. Çalışmada Kullanılacak Hücre Gruplarının Belirlenmesi

Çalışmamız dört deney grubu şeklinde belirlenip gruplar Tablo 2' de gösterilmiştir.

Tablo 2. Deney grupları.

GRUPLAR	UYGULAMALAR
Grup 1	Kontrol
Grup 2	Doksorubisin
Grup 3	LPS ve poly I:C
Grup 4	LPS, poly I:C ve Doksorubisin

3.2.3. Hücre Sayım Cihazı ile Hücrelerin Canlı ve Ölü Oranlarının Belirlenmesi

Hücre sayım cihazı ile yapılan ölçüm; hücrelerin canlılık sayısını, canlılık yüzdesini, ölü sayısını, ölü yüzdesini ve toplam total hücre sayısını belirleyen yöntemdir. Deney iki grup şeklinde üç tekrar halinde yapılmıştır. Hücrelere pasaj işlemi yapıp bir gece boyunca bekletildikten sonra 10 ml'lik petri içerisinde konfluent olan hücrelerin besiyeri aspire edildi. Aspire edildikten sonra 5 ml PBS ile yıkanarak 1ml tripsin EDTA koyulup 5 dk inkübasyona bırakıldı. Tripsini uzaklaştırmak için 3 katı kadar mediumu ilave edilip 15 ml' lik falkon tüpü içine alındı. Falkon tüpü içerisine alınan hücreler santifüj edilip süpernant kısmı atıldı ve pelet kısmına 1 ml besiyeri koyularak hücre süspansiyon haline getirildi. Hücre süspansiyon haline getirildikten sonra 15 ml'lik falkon tüplerine 5 ml besiyer ilave edildi. 6 kuyucuklu olan 6 well palletlere 1 ml besiyeri ve üzerine 100.000 hücre olacak şekilde 1 ml hücre süspansiyondan ilave edilip bir gece boyunca kalması için 37°C %5 CO₂ ortamda inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün kullanılacak gruplarda poly I:C (50 µg/ml) ve LPS (500 ng/ml) uygulanarak 24 saat süreyle muamele edildi. 24 saat dolduktan sonra kullanılacak olan kemoterapi ilacı doksorubisin uygulanacak olan gruplara belirlenen dozlarda (0 µg/ml, 0.39 µg/ml, 1.56 µg/ml, 6.25 µg/ml, 25 µg/ml, 100 µg/ml) hücrelere muamele edilerek 24 saat süreyle 37°C %5 CO₂ ortamda inkübasyona bırakıldı. Süreleri dolduktan sonra 6 well plate hücre kapları içerisindeki besiyeri ve bulunan ölü hücreleri farklı gruplara ayırdığımız 15 ml'lik falkon tüplere koyuldu. Hücrelerin üzerinden besiyeri çekilmiş olan hücreleri 500 ml 1x PBS'le yıkandı. Hücreleri yüzeyden ayrılmasını sağlamak için 500 ml Tripsin-EDTA solüsyonu koyularak hücreleri 37°C'de, % 5 CO₂'li ortamda 3dk inkübasyona bırakıldı. İlk önce 6 well plate hücre kapları içerisindeki ölü hücreler farklı gruplara ayırdığımız 15 ml'lik falkon tüplere koyuldu ve sonra kaldırılan hücreler 15 ml'lik falkon tüplere eklendi. Ardından 5 dk 1200 rpm' de santifüj edilerek hücrelerin süpernant kısmı aspire edildi ve pelet kısmına

1ml besiyeri konularak hücre süspansiyonu haline getirildi. Elde edilen hücre süspansiyonundan 10 µl alındı ve 10 µl tripan blue da alınıp ependorf tüpüne konuldu. Bu karışımdan 10 µl alınıp hücre sayım slaytına koyulup, hücre sayım cihazında ölçüm yapıldı. Bu çalışmada yapılan deney grupları ve kullanılan dozlar aşağıda Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Çalışmamızda uygulanan kimyasallar, ilaçlar ve dozları.

UYGULANAN KİMYASAL VE İLAÇLAR	DOZLARI
Kontrol Grubu	0 µg/ml
Dokso rubisin	0.39 µg/ml
Dokso rubisin	1.56 µg/ml
Dokso rubisin	6.25 µg/ml
Dokso rubisin	25 µg/ml
Dokso rubisin	100 µg/ml
Poly IC, LPS	50 µg/ml, 500 ng/ml
Poly IC, LPS, Dokso rubisin	50 µg/ml, 500 ng/ml, 0.39 µg/ml
Poly IC, LPS, Dokso rubisin	50 µg/ml, 500 ng/ml, 1.56 µg/ml
Poly IC, LPS, Dokso rubisin	50 µg/ml, 500 ng/ml, 6.25 µg/ml
Poly IC, LPS, Dokso rubisin	50 µg/ml, 500 ng/ml, 25 µg/ml
Poly IC, LPS, Dokso rubisin	50 µg/ml, 500 ng/ml, 100 µg/ml

3.2.4. Metiltiazotetrazolium (MTT) Canlılık Testi

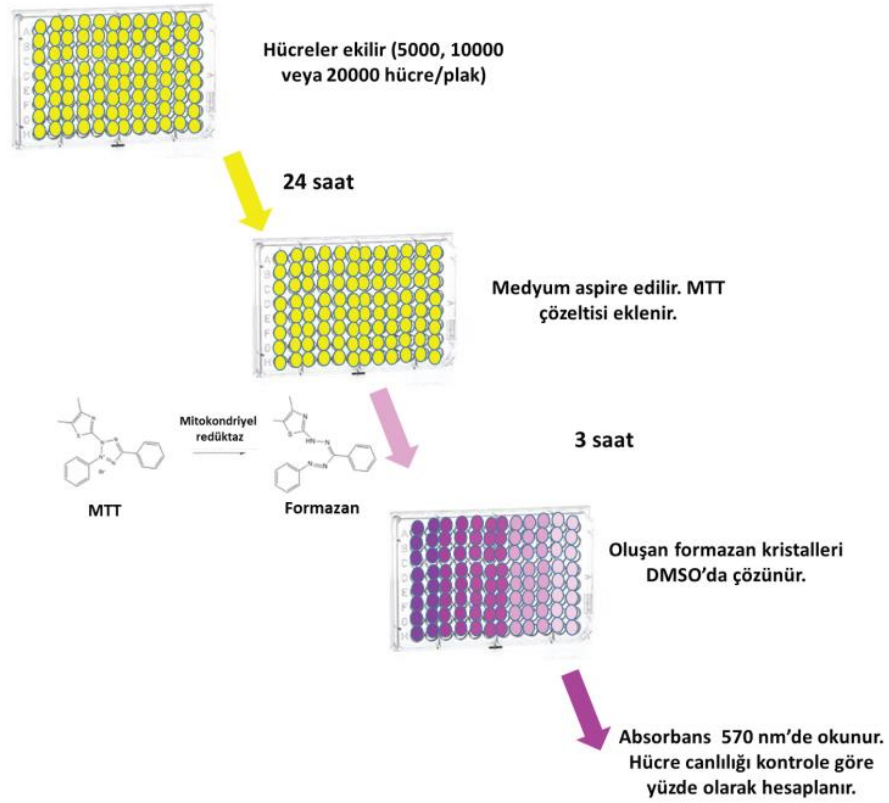
MTT testi, Mosmann 1983'te geliştirilen yöntem hücre canlılığını, proliferasyon ve sitotoksisite belirmesinde günümüzde kullanılan en yaygın testir. Bu yöntem canlı hücrelerde bakılan mitokondriyal süksinat dehidrogenaz kolorimetrik olarak enzim aktivitesinin ölçülmesi sağlayan hücre canlılık testidir. MTT maddesi (tetrazolyum (3-(4,5-dimetiltiyazol - 2)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) sarı renkte bir formozon tuzudur, yaşayan hücreler tarafından koyu mavi-mor renkli formazan kristallerine dönüşür ve MTT tetrazolium tuzunun formazana indirgenmesi azalır. Formazan kristali DMSO kullanılarak çözülür, renk değişimine bağlı olarak 570 nm ve 630 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüm yapılarak değerleri bulunur (Erkekoğlu ve Baydar, 2021).

MTT metodu, dört grup şeklinde belirlenmiş, 5000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında ekim yapılarak bir gece boyunca 37°C %5 CO₂ ortamda inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün kullanılacak gruplarda poly I:C (50 µg/ml) ve LPS (500 ng/ml) uygulanarak 48 saat süresine kadar inkübe edildi. Kullanılan kemoterapi ilacı dokso rubisin belirlenen 100 µg/ml dozda 24 saat süresince hücrelere inkübe edildi. Hücreler tedavi

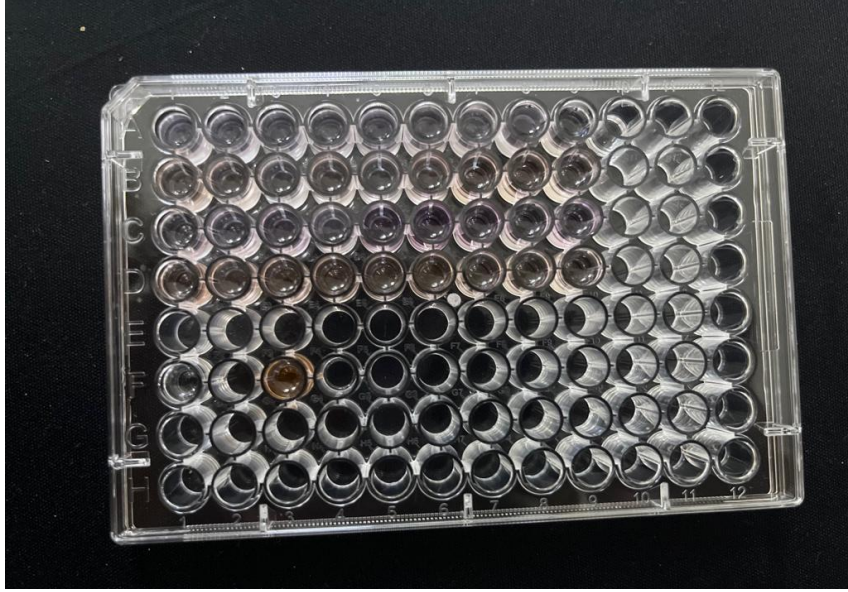
sürelerinde 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. 24 ve 48 saat sonunda her bir kuyucuğun besiyeri aspire edilerek PBS'le yıkandı. Her bir kuyucuğa 200 µl PBS koyuldu ve 5 µl MTT solüsyonu koyularak 1.5 saat inkübasyona bırakıldı. Oluşan formazan kristallarının çözülmesi için her bir kuyucuğa 200 µl DMSO koyuldu, 570 nm ve 630 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüm yapıldı ve absorbanlar belirlenerek hücrelerin canlılık oranları tespit edildi. Bu çalışmada yapılan deney grupları ve kullanılan dozlar Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Çalışmamızdaki deney grupları ve dozları.

GRUPLAR	KULLANILAN DOZLAR
Kontrol	0 µg/ml
Dokсорubisin	100 µg/ml
Poly I:C/LPS	50 µg/ml, 500 ng/ml
Poly I:C/LPS/ Dokсорubisin	50 µg/ml, 500 ng/ml, 100 µg/ml



Şekil 3. MTT testinin yapılışı (Erkekoğlu ve Baydar, 2021).



Resim 1. MTT testinde birinci deneyin yapılışı.

3.2.5. Flow Sitometri Metodu

Flow sitometri metodunda, dört grup üç tekrar şeklinde ayrılarak 6 kuyucuklu olan dört adet 6 well plate 1 ml besiyeri ve üzerine 100.000 hücre olacak şekilde 1 ml hücre süspansiyondan ilave edilip bir gece boyunca kalması için 37°C %5 CO₂ ortamda inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün kullanılacak gruplarda poly I:C (50 µg/ml) ve LPS (500 ng/ml) uygulanarak 48 saat ve 72 saat süreyle muamele edildi. 24 saat ve 48 saat dolduktan sonra kullanılacak olan kemoterapi ilacı doksorubisin uygulanacak olan gruplara belirlenen 100 µg/ml dozda 24 saat ve 48 süreyle hücrelerle muamele edildi. Süreleri sonunda 6 well plate hücre kapları içerisindeki besiyerinde bulunan ölü hücreleri farklı gruplara ayırdığımız 15 ml'lik falkon tüplere koyuldu. Hücrelerin üzerinden besiyeri çekilmiş olan hücreleri 500 ml 1x PBS'le yıkandı. Hücreleri yüzeyden ayrılmasını sağlamak için 500 ml Tripsin EDTA solüsyonunu koyularak hücreleri % 5 CO₂'li, 37°C'de ortamda 3dk inkübasyona koyuldu. Kaldırılan hücreleri 6 well plate hücre kapları içerisindeki besiyeri ve bulunan ölü hücreleri farklı gruplara ayırdığımız 15 ml'lik falkon tüplere koyduğumuz kaldırılan hücreler de eklendi ve 5 dk 1500 rpm' de santifüj edilerek hücreleri süpernatant ve pellet haline getirdiğimiz hücreleri süpernant kısmı aspire edildi. Pelet kısmını 100 µl PBS'le hücreleri seyreltilir. Efendorf tüpleri içerisine count-viability kitinden 450 µl koyularak 50 µl hücre süspansiyon ettiğimiz hücreleri (1x10⁶) olacak şekilde koyulur ve vorteksliyip ışığa maruz kalmayacak şekilde 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Flow sitometri cihazı ile ölçüm yapıldı. Bu çalışmada kullanılan deney grupları ve kullanılan dozlar Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5. Çalışmamızdaki deney grupları ve dozları.

GRUPLAR	KULLANILAN DOZLAR
Kontrol	0 µg/ml
Dokso rubisin	100 µg/ml
Poly I:C/LPS	50 µg/ml, 500 ng/ml
Poly I:C/LPS/ Dokso rubisin	50 µg/ml, 500 ng/ml, 100 µg/ml

3.2.6. Protein İzalasyonu

Protein izalasyon metodunda dört grup şeklinde ayrılarak 6 kuyucuklu olan 6 well plate 1 ml besiyeri ve üzerine 100.000 hücre olacak şekilde 1 ml hücre süspansiyondan ilave edilip bir gece boyunca kalması için 37°C %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Bir sonraki gün poly I:C ve LPS uygulanacak gruplara poly I:C 50 µg/ml ve LPS 500 ng/ml muamele edilerek 48 saat süreyle inkübe edildi. 24 saat dolduktan sonra kullanılacak olan kemoterapi ilacı dokso rubisin uygulanacak hücrelere belirlenen 100 µg/ml dozda 24 saat süreyle hücrelerle muamele edildi. Sürelerin sonunda petrilерinin üzerindeki besiyerleri aspire edilerek 5 ml PBS ile yıkandı. Petrinin yüzeyindeki hücreleri kaldırmak için 1 ml tripsin EDTA eklendi ve 3 ila 5 dk arasında inkübasyona bırakıldı. Petri yüzeyinden kalkan hücrelere PBS 5ml koyularak toplandı ve 15 ml'lik falkon tüpüne koyuldu. Hücrelere, 5 dk 4°C 2000 rpm'de santrifüj yapıldı. Santifüjden sonra süpernant kısmı atılıp pellet kısmı 1 ml PBS ile çözdürüldü ve ependorf tüplerine aktarıldı. Ependorf tüplerine aktarılan hücre süspansiyonlarına 5 dk 4°C 2000 rpm'de santrifüj yapıldı. Santifüj yapılan hücrelerin süpernant kısmı atılıp pellet kısmına 150 µl RIPA tamponu (Radio Immunoprecipitation Assay, lizis ve ekstraksiyon tamponu) eklenerek 15 kez buz kalıbı üstünde pipetaj yapıldı. RIPA tamponun hazırlanmak için %1 proteaz inhibitörü, %1 fosfat inhibitörü ve 166,6 µl RIPA tamponu ise ependorf tüpü içerisinde hazırlandı. Pipetaj işlemi yaptıktan sonra 15 kez enjektör iğne ucundan geçirildi ve 20 dk bekletilmek üzere -80°C'ye koyuldu. -80 °C' den alınan tüpler buz kalıbı üzerinde 10-15 kez pipetaj işlemi yapılarak çözdürüldü. Çözme ve dondurma işlemi 4 kez tekrar edildi ve sonra 5 dk 4°C 14000 rpm'de santifüj edilip süpernant kısımları başka ependorf tüplerine alınarak elde edilen proteinler -20 °C'ye kaldırıldı. Bu çalışmada kullanılan deney grupları ve dozlar Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Çalışmamızdaki deney grupları ve dozları.

GRUPLAR	KULLANILAN DOZLAR
Kontrol	0 µg/ml
Dokso rubisin	100 µg/ml
Poly I:C/LPS	50 µg/ml, 500 ng/ml
Poly I:C/LPS/Dokso rubisin	50 µg/ml, 500 ng/ml, 100 µg/ml

3.2.7. Protein Tayini Metodu (Bradford Assay)

Protein izalasyonundan sonra Tablo 7’de gösterilen şekilde standartlar 1:5 oranında seyreltilerek hazırlandı. Çalışma solüsyonu olarak adlandırıldığımız standartlar 1x konsantrasyon haline getirildi. Örneklerde Tablo 8’de gösterildiği gibi hazırlanmıştır.

Tablo 7. Bradford assay standartlar tablosu.

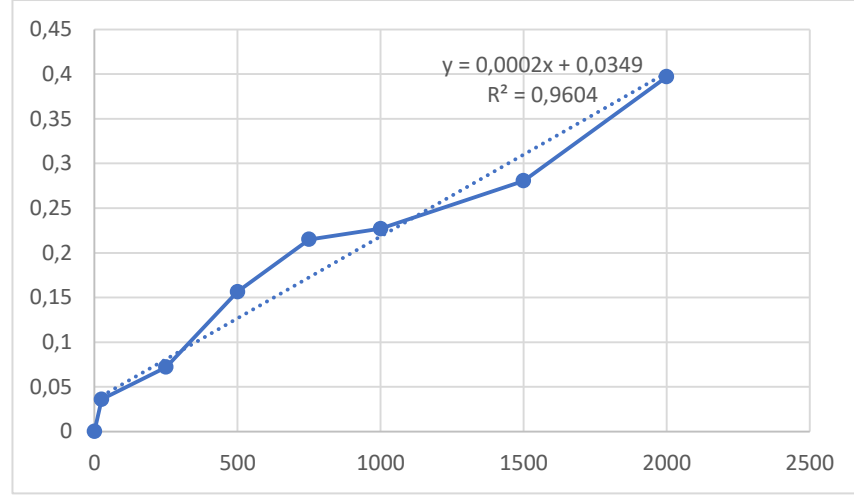
SIRA	H₂O	BSA (µl)	KONSANTRASYON(µg/µl)
A	0	300 Stok	2000
B	125	375 Stok	1500
C	335	325 Stok	1000
D	175	175 B’den	750
E	325	325 C’den	500
F	325	325 E’den	250
G	325	325 F’den	125
H	400	100 G’den	25
I	400	0	0

Tablo 8. Bradford assay örnekler tablosu.

ÖRNEK ADI	PROTEİN(µl)	H₂O (µl)
Swan 71 /Kontrol	5	20
Swan 71/ Poly I:C/LPS	5	20
Swan 71 /Dokso rubisin	5	20
Swan 71/ Poly I:C/LPS /Dokso rubisin	5	20

Hazırlanan standart ve örneklerden 96’lik well platalere 200 µl çalışma solüsyonu her bir kuyucuğa koyuldu. Sonra her bir kuyucuğa 10 µl standart ve 10 µl örnek eklenerek pipetaj

yapılıp iyice karışması sağlandı. Bu işlem yapıldıktan sonra 30 sn çalkalanıp karanlıkta 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede 595 nm’de ölçüm alındı. Örneklerdeki protein konsantrasyonu standart grafiğe uygun olarak hesaplandı (Şekil 4).



Şekil 4. Protein konsantrasyonu standart grafiği.

3.2.8. Western Blot Metodu

Western blot (WB) metodu, herhangi bir numaneden istenen bir proteini saptamanın bir yolu olarak başlayan eski ve güvenilir bir tekniktir. Artmış ya da azalmış olarak protein ifadesinin ölçülmesinde, hücrenin spesifik protein izoformlarının ölçümünde, genetik hastalıkların ortaya çıkışından sorumlu proteinlerin belirlenmesinde kullanılan metoddur.

Western blot için tampon çözeltileri;

TBS (Tris Buffered Salline, 1lt); 6,05 gr Tris-HCl ve 8,76 gr NaCl 1 lt dH₂O içinde çözdürüldü. (pH 7,6).

Yıkama Tamponu (TBS, %0,1 Tween 20); 100 ml TBS çözeltisine 100 µl Tween 20 eklenerek karıştırıldı.

Transfer Tamponu; 3,03 gr Tris-Base, 14,4 gr glisin, 200 ml metanol ve 2 ml %10 SDS 1 L dH₂O içinde çözdürüldü.

10X Yürütme Tamponu; 30,3 gr Tris-Base, 144 gr glisin ve 10 gr SDS 1 lt dH₂O’nda çözdürüldü.

Bloklama Solüsyonu (% 5 Süt tozu, TBS) için; gerekli miktarda bloklama solüsyonu her seferinde % 5 süt tozu içerecek şekilde TBS ile hazırlandı.

Strip Tamponu; 200 ml % 10 SDS, 62,5 ml 1 M Tris (pH: 6,7) ile dH₂O ile 1 lt 'ye tamamlanmıştır. Strip aşamasından önce 50 ml strip tamponu içerisine 350 µl βmerkaptoethanol eklendi.

Western Blot Tekniği;

-20 C'den çıkarılan örnekler buzun üstünde erimesi sağlandıktan sonra örnek tüplerini hazırlamak için 5x'lik yükleme tamponunda 6 µl örnek ve 24 µl lizat tamponunun örnekleri içerdikleri protein konsantrasyonuna göre 1,5 ml' lik ependorf tüplerine alındı. Ependorf tüpleri 5 dk 95 °C' de inkübe edildi. İnkübe edildikten sonra jel kuyucuğuna 3 µl marker ve 30 µl örnek yüklendi. 90 V' ta 1.5 saat yürütüldü. Ardından transfer tamponu içine aşağıdan yukarıya doğru sünger, whatman kağıdı, jel, membran, whatman kağıdı, sünger dediğimiz transfer sandviçi hazırlandı. Transfer sandviçi, transfer tankına yerleştikten sonra 70 V' ta 2 saat boyunca transfer gerçekleştirildi. Sonra bloklama solüsyonuyla membran oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Bloklamadan sonra membran, 1:1000 konsantrasyonda primer antikoruyla ve bloklama solüsyonuyla 4 °C' de gece boyunca inkübe edildi. Gece boyunca inkübe edildikten sonra membran yıkama solüsyonu dediğimiz wash buffer ile 3 kere 5 dk yıkandı. İşlem bittikten sonra membran oda sıcaklığında 2 saat boyunca 1:5000 konsantrasyonda sekonder antikorla ve bloklama solüsyonuyla beraber muamele edildi ve tekrar wash buffer ile 10 dk 3 kere yıkandı. Yıkanmadan sonra membran 500 ml ECL ile 2 dk muamele edildi ve görüntüleme cihazında görüntü alındı. Sonra membran oda sıcaklığında 1.5 saat boyunca strip solüsyonuyla inkübe edildi. Strip işleminden sonra membran 5 dk 3 kere wash buffer ile yıkandı ve tekrarında bloklama solüsyonuyla oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edildi. İnkübe edildikten sonra a-Tubulin (1:5000) ya da diğer bir primer antikorla (1:1000) ve bloklama solüsyonu içinde gece boyunca muamele edilip basamaklar tekrar edildi. Elde edilen bant görüntüleri ImageJ (NIH, USA) programı ile analiz edildi ve miktarları belirlendi. Bantlar, her grup için a-Tubulin' e göre normalize edildi ve kat değişiklikleri hesaplandı.

3.2.9. İstatiksel Analizler

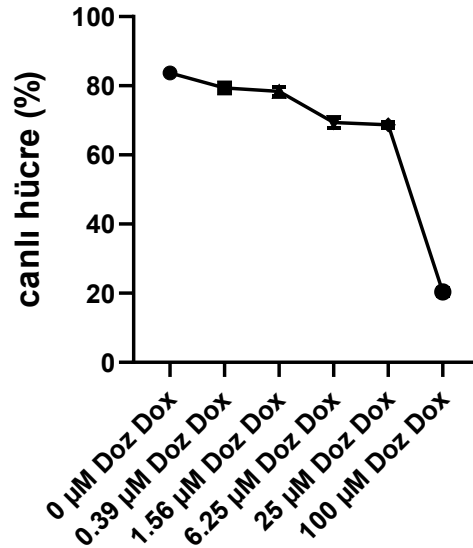
İstatiksel analizlerde GraphPad Prism 8 (San Diego, ABD) uygulaması kullanılarak veriler Ortalama ± Standart hata olarak gösterildi. GraphPad Prism 8 uygulamasında Unpaired T-Testi ile Welch's Correction ve One Way ANOVA testleri yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı veriler p<0,05, p<0,01, p<0,001 düzeylerinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

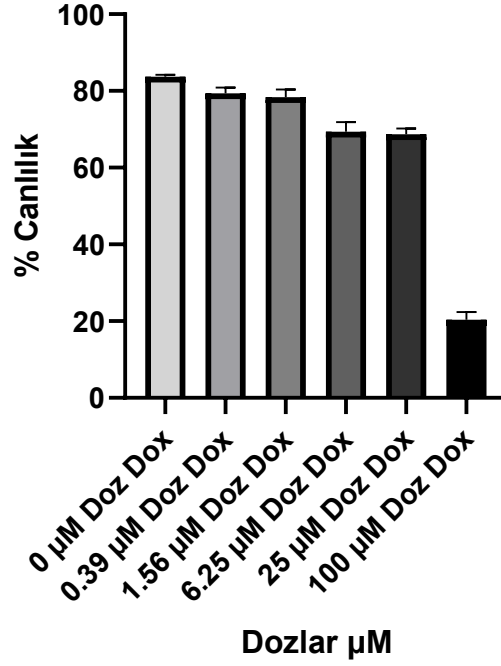
4.1. Hücre Sayım Cihazı ile Canlı ve Ölü Hücre Sayım Oranı Bulguları

Koryokarsinom hücrelerinde PKR'yi aktive etmek için poly I:C ve LPS uyguladığımız swan 71 hücrelerinde doksorubisinin etkisini belirlemek için hücre sayım cihazı kullanılarak hücre sayımı gerçekleştirildi. Ayrıca swan 71 hücrelerinde doksorubisini farklı dozlarda (0.39 µg/ml, 1.56 µg/ml, 6.25 µg/ml, 25 µg/ml, 100 µg/ml) uygulayarak etkisini belirleyebilmek için de aynı yöntem kullanıldı.

Doksorubisini farklı dozlarda 24 saat swan 71 hücreleri ile mualeme ettiğimizde kontrol grubunda $83,67 \pm 48,30$, 0.39 µg/ml dozunda $79,33 \pm 45,80$, 1.56 µg/ml dozunda $78,33 \pm 45,22$, 6.25 µg/ml dozunda $69,33 \pm 40,02$, 25 µg/ml dozunda $68,67 \pm 39,64$ ve 100 µg/ml dozunda $20,33 \pm 11,73$ canlılık ortalaması ve standart hata belirlendi. Bu bulguya göre doksorubisin uyguladığımız swan 71 hücrelerinde 24 saatte doza ve zamana bağlı hücrelerin canlılık yüzdesinde konsantrasyon arttıkça istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi ($p < 0,001$, $p < 0,05$). Swan 71 hücrelerinde 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda doksorubisin uygulanmasında ortaya çıkan bulgular Şekil 5 ve Şekil 6'da gösterildi.

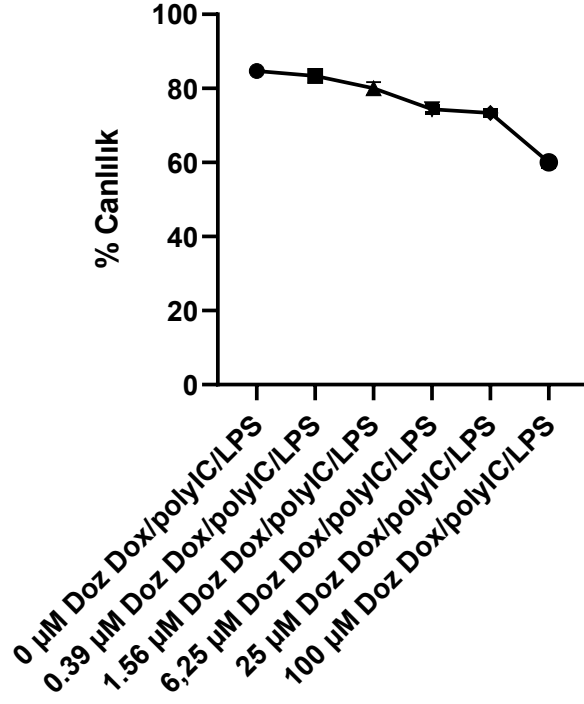


Şekil 5. Swan 71 hücrelerinde doksorubisin uygulanan canlılık yüzdesi eğri grafiği.

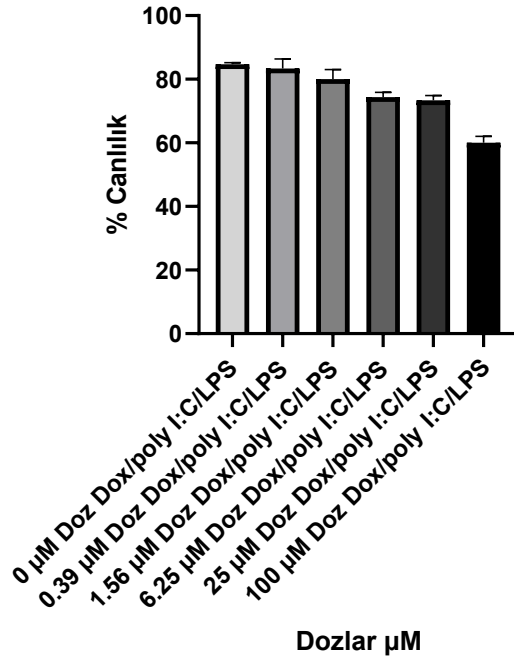


Şekil 6. Swan 71 hücrelerinde doksorubisin uygulanan canlılık yüzdesi sütun grafiği.

Swan 71 hücrelerine PKR aktive etmek için poly I:C ve LPS 48 saat uygulandıktan sonra, doksorubisin farklı dozlarda (0.39 $\mu\text{g/ml}$, 1.56 $\mu\text{g/ml}$, 6.25 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$) 24 saat mualeme edildi ve kontrol grubunda $84,67 \pm 48,88$, 0.39 $\mu\text{g/ml}$ dozunda $83,33 \pm 48,11$, 1.56 $\mu\text{g/ml}$ dozunda $80,00 \pm 46,18$, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ dozunda $74,33 \pm 42,91$, 25 $\mu\text{g/ml}$ dozunda $73,33 \pm 42,33$ ve 100 $\mu\text{g/ml}$ dozunda $60,00 \pm 34,64$ canlılık ortalaması ve standart hata belirlendi. Doksorubisin (24 saat) ve poly I:C /LPS (48 saat) mualeme edildiğinde swan 71 hücrelerinde doza ve zamana bağlı hücrelerin canlılık yüzdesinde konsantrasyon arttıkça istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi ($p < 0,05$, $p < 0,001$). Swan 71 hücrelerine 48 saat poly I:C ve LPS uygulanan ve ardından 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda doksorubisin uygulanması ile ortaya çıkan bulgular Şekil 7 ve Şekil 8’de gösterildi.



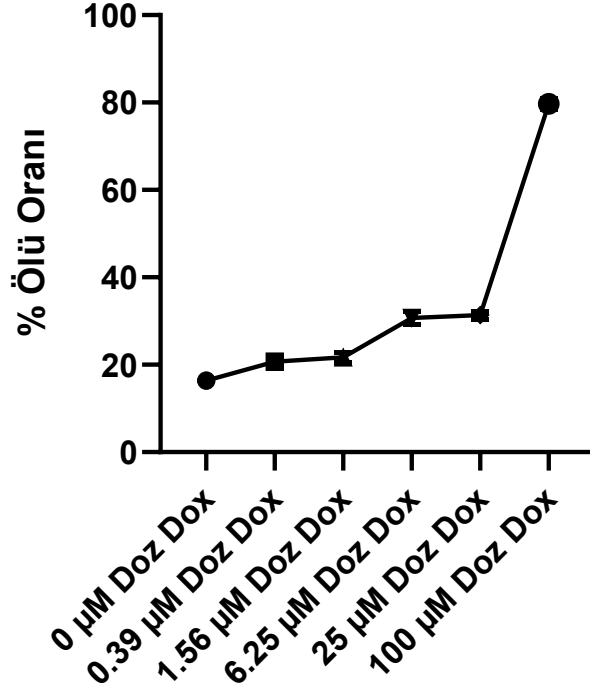
Şekil 7. Swan 71 hücrelerinde poly I:C, LPS ve doksorubisin uygulanan canlılık yüzdesi eğri grafiği.



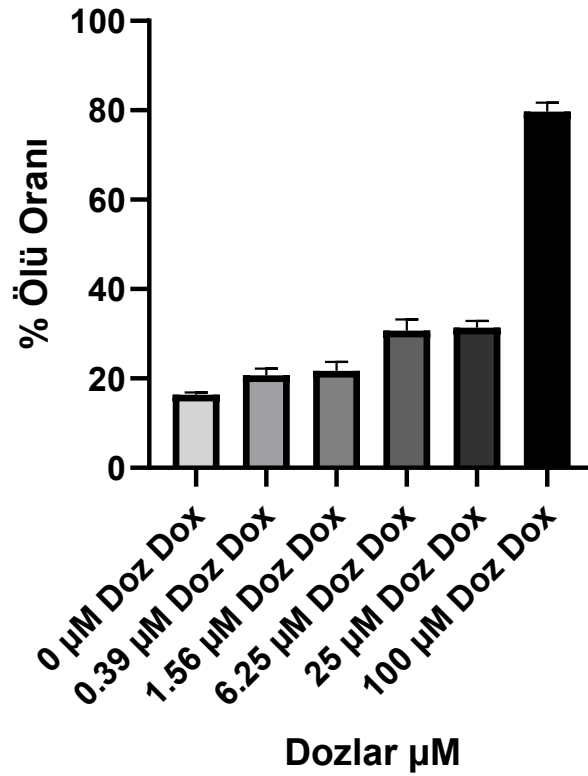
Şekil 8. Swan 71 hücrelerinde poly I:C, LPS ve doksorubisin uygulanan canlılık yüzdesi sütun grafiği.

Swan71 hücrelerinde doksorubisini farklı dozlarda 24 saat mualeme ettiğimizde kontrol grubunda $16,33 \pm 9,42$, 0.39 µg/ml dozunda $20,67 \pm 11,93$, 1.56 µg/ml dozunda $21,67 \pm 12,51$, 6.25 µg/ml dozunda $30,67 \pm 17,70$, 25 µg/ml dozunda $31,33 \pm 18,08$ ve 100 µg/ml dozunda $79,67 \pm 45,99$ ölü hücre ortalaması ve standart hata belirlendi. Bu bulguya göre

doksorubisin uygulanan swan 71 hücrelerinde 24 saatte doza ve zamana bağlı hücrelerin ölü yüzdesinde konsantrasyon artıkça istatistiksel olarak anlamlı artmalar gözlemlendi ($p<0.001$, $p<0,05$). Swan 71 hücrelerinde 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda doksorubisin uygulanmasıyla ortaya çıkan bulgular Şekil 9 ve Şekil 10'da gösterildi.

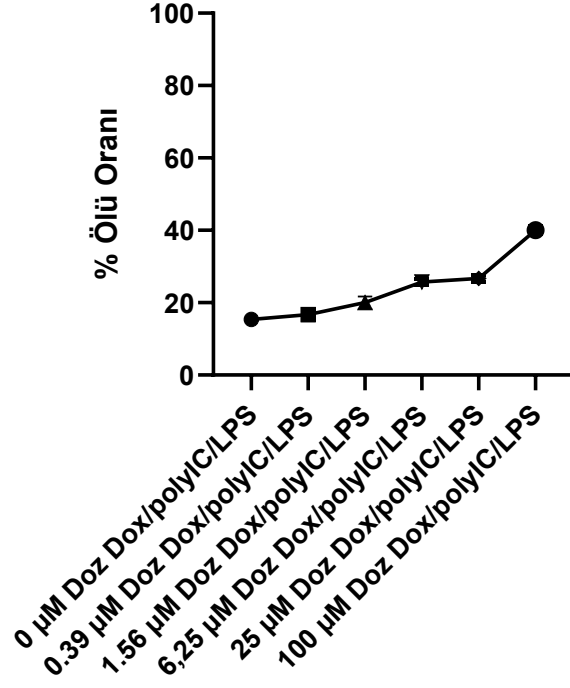


Şekil 9. Swan 71 hücrelerinde doksorubisin uygulanan ölü hücre oranı eğri grafiği.

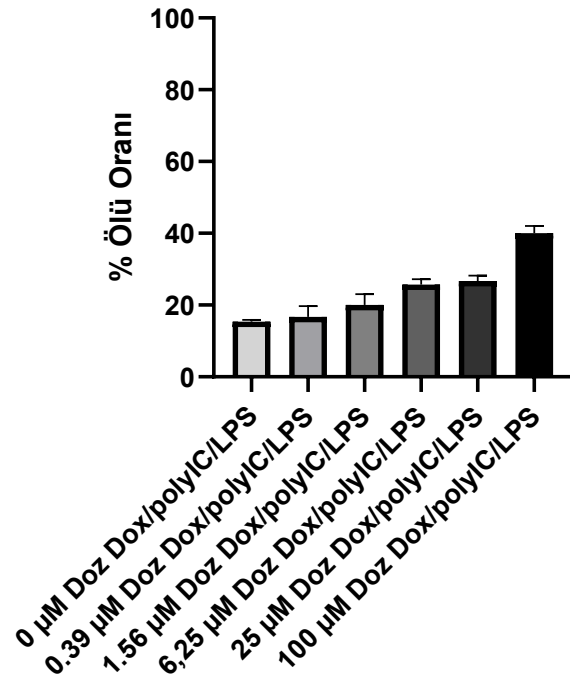


Şekil 10. Swan 71 hücrelerinde doksorubisin uygulanan ölü hücre oranı sütun grafiği.

Swan 71 hücrelerine PKR aktive etmek için poly I:C ve LPS 48 saat muamele edildikten sonra akabinde doksorubisin farklı dozlarda (0.39 µg/ml, 1.56 µg/ml, 6.25 µg/ml, 25 µg/ml, 100 µg/ml) 24 saat muamele edildi ve poly I:C ve LPS kontrol grubunda 15,33± 8,85, 0.39 µg/ml dozunda 16,67 ± 9,67, 1.56 µg/ml dozunda 20,00± 11,54, 6.25 µg/ml dozunda 25,67± 14,82, 25 µg/ml dozunda 26,67± 15,39 ve 100 µg/ml dozunda 40,00 ± 23,09 ölü hücre oranı ortalaması ve standart hata belirlendi. Doksorubisin (24 saat) ve poly I:C /LPS (48 saat) muamele edildiğinde swan 71 hücrelerinde doza ve zamana bağlı hücrelerin ölü yüzdesinde konsantrasyon arttıkça istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p < 0,001$, $p < 0,05$). Swan 71 hücrelerine 48 saat poly I:C ve LPS uygulanan ve akabinde 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda doksorubisin uygulanmasıyla ortaya çıkan bulgular Şekil 11 ve Şekil 12'de gösterilmiştir.

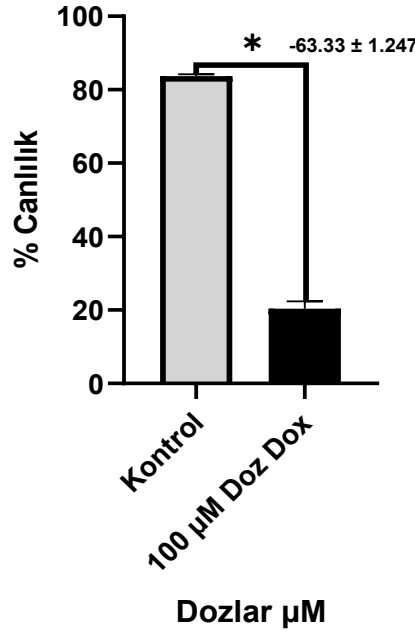


Şekil 11. Swan 71 hücrelerinde poly I:C, LPS ve dokсорубisin uygulanan ölü hücre oranı eğri grafiği.



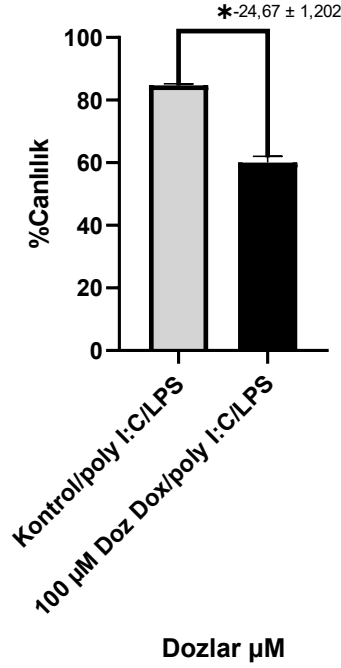
Şekil 12. Swan 71 hücrelerinde poly I:C, LPS ve dokсорубisin uygulanan ölü hücre oranı sütun grafiği.

Koryokarsinom swan 71 hücrelerinde doksorubisinin en yüksek dozu (100 µg/ml) ve doksorubisin uygulanmamış kontrol grubu karşılaştırıldığında $-63,33 \pm 1,247$ ortalama ve standart hata belirlendi. Bu sonuca göre doksorubisinin swan 71 hücrelerinde doza bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde swan 71 hücrelerini öldürdüğü görülmüştür ($p<0,001$, $p<0,05$). Bulgular Şekil 13’de gösterilmiştir.



Şekil 13. Swan 71 hücrelerinin kontrolü ve en yüksek doz doksorubisin grafiği.

Swan 71 hücrelerinde poly I:C ve LPS ile PKR aktive ettiğimizde aktive ettikten sonra doksorubisini en yüksek dozu (100 µg/ml) ile sadece PKR aktive ettiğimiz kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda $-24,67 \pm 1,202$ ortalama ve standart hata belirlendi. PKR aktive ettiğimiz hücelere doksorubisin uyguladığımızda PKR aktive edilen hücelere oranla $p<0,05$, $p<0,001$ düzeyinde anlamlı bir azalma görülmüş ve Şekil 14’de gösterilmiştir.

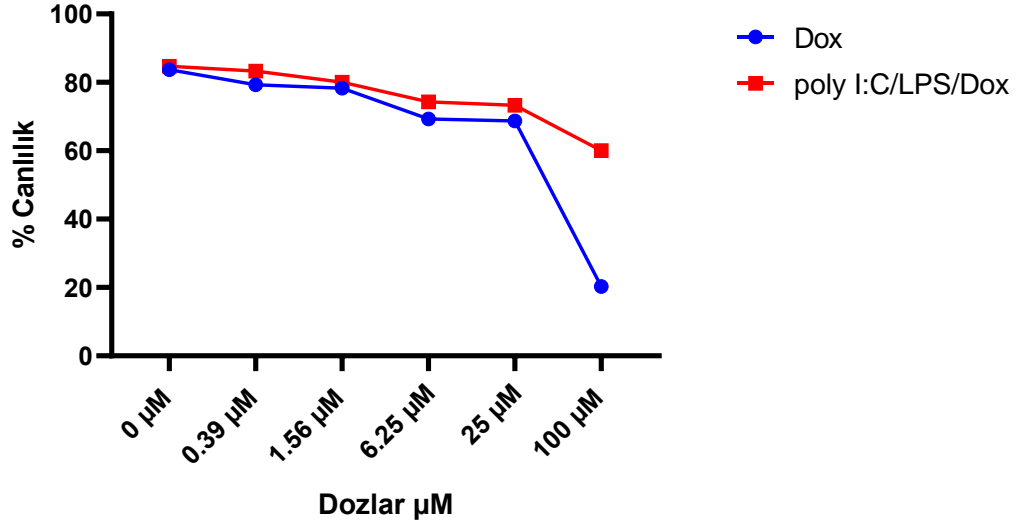


Şekil 14. Swan 71 hücrelerine uygulanan poly I:C, LPS ve doksorubisin grafiği.

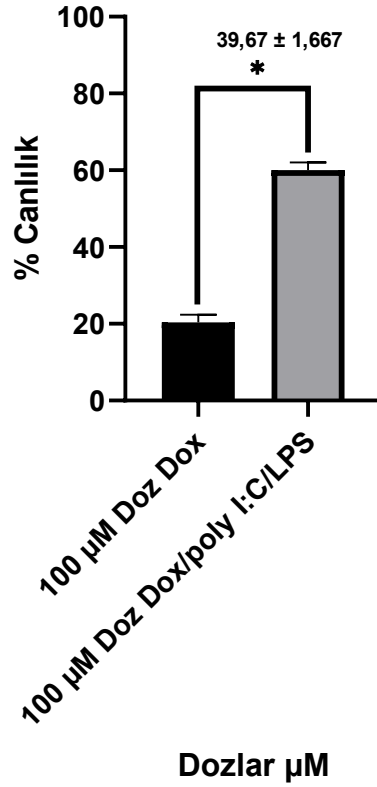
Swan 71 hücrelerinde doksorubisin uygulamadığımız kontrol grubuyla, poly I:C ve LPS uyguladığımız kontrol grubu arasında ortalama fark ve standart hata değeri $1,000 \pm 0,4714$ dir. Anlamlılık açısından $p > 0.05$ değerinden büyük olduğu için anlamlı bulunmamıştır. Doksorubisini en düşük doz uyguladığımız swan 71 hücrelerinde $0.34 \mu\text{g/ml}$ doksorubisin grubu ve ve poly I:C, LPS ve doksorubisin grubu ortalama fark ve standart hata değeri $4,000 \pm 1,972$ dir. Anlamlılık açısından $p > 0.05$ değerinden büyük olduğu için anlamlı bulunmamıştır. $1.56 \mu\text{M}$ doz doksorubisin grubu ve $56 \mu\text{M}$ doz doksorubisin, LPS ve poly I:C grubu ortalama fark ve standart hata değeri $1,667 \pm 2,108$ dir. Anlamlılık açısından $p > 0.05$ değerinden büyük olduğu için anlamlı bulunmamıştır. $6.25 \mu\text{M}$ doz doksorubisin grubu ve $6.25 \mu\text{M}$ doz doksorubisin, LPS ve poly I:C grubu ortalama fark ve standart hata değeri $5,000 \pm 1,700$ dir. Anlamlılık açısından $p < 0.05$ değerinden küçük olduğu için anlamlı bulunmuştur. $25 \mu\text{M}$ doz doksorubisin grubu ve $25 \mu\text{M}$ doz doksorubisin, LPS ve poly I:C grubu ortalama fark ve standart hata değeri $4,667 \pm 1,247$ dir. Anlamlılık açısından $p < 0.05$ değerinden küçük olduğu için anlamlı bulunmuştur.

$100 \mu\text{M}$ doz doksorubisin grubu ve $100 \mu\text{M}$ doz doksorubisin, LPS ve poly I:C grubu ortalama fark ve standart hata değeri $39,67 \pm 1,667$ dir. Anlamlılık açısından $p < 0.05$ değerinden küçük olduğu için anlamlı bulunmuştur ve Şekil 15'de gösterilmiştir. T testine

göre doksorubisini en yüksek doz uyguladığımız swan 71 hücrelerinde ve PKR aktive edip doksorubisin uyguladığımızda istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmüş ve Şekil 16'da gösterilmiştir.



Şekil 15. Doksorubisin grubu ve Poly I:C/LPS/Dox grubu eğri grafiği.

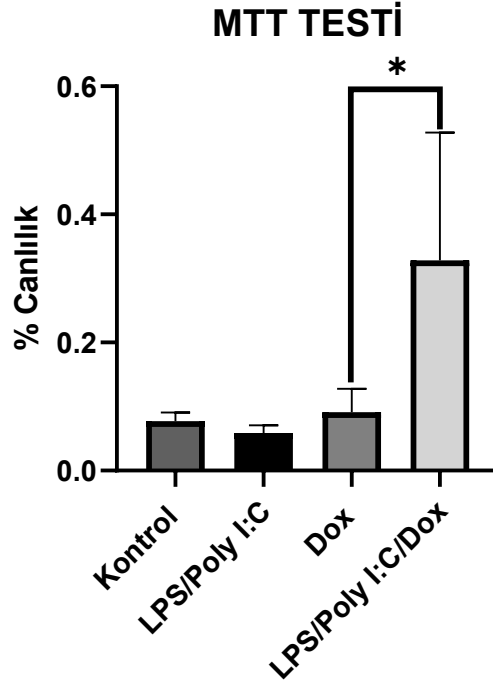


Şekil 16. 100 µM Doksorubisin grubu ile 100 µM Dox/LPS/poly I:C grubu grafiği.

4.2. MTT (Metiltiazotetrazolium) Canlılık Metodu Bulguları

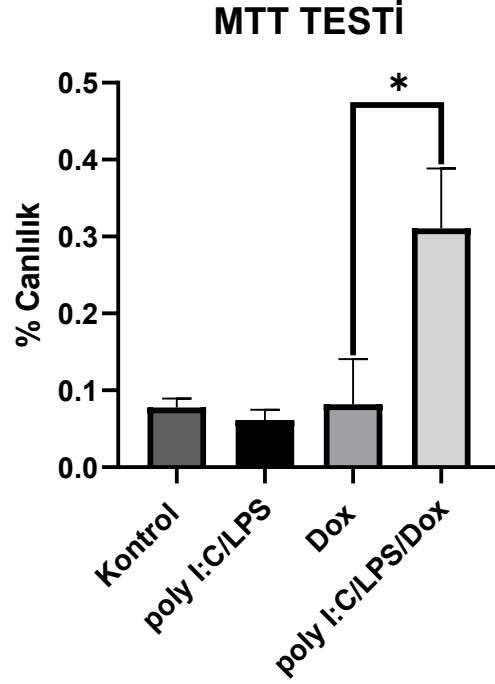
MTT canlılık deneyi iki metot kullanılarak yapılmıştır. İlk metotta DMEM ve MTT solüsyonu beraber kullanılıp, 630 nm ve 570 nm dalga boyunda absorbans değeri alındı ve dört tekrar şeklinde yapıldı. İkinci metotta DMEM besiyeri yerine PBS kullanılarak absorbans değeri alınıp üç tekrar şeklinde yapıldı. Bu iki metodun yapılmasının amacı formazan absorpsiyon spektrumlarının DMEM ve doksorubisinin fenol kırmızı renginden dolayı absorpsiyon spektrumları ile örtüşebileceğinin düşünülmesindedir. Doksorubisinin formazan kristalleri içerip fenol kırmızı renkte olması spektrofotometrede kırmızı rengin görünür ışıktaki yayıldığını ve deney sonucunda absorbans değerlerinin farklı çıkacağı düşünülmüştür ve bu nedenle gerçekleştirilmiştir. Swan 71 hücrelerine poly I:C ve LPS 48 saat muamele edilirken doksorubisin 24 saat muamele edilmiştir.

İlk metotta dört grup ile yapılan birinci deney sonucunda elde edilen istatistiksel verilere göre, kontrol grubunda $0,077 \pm 0,038$, Poly I:C ve LPS grubunda $0,059 \pm 0,029$, Doksorubisin grubunda $0,091 \pm 0,045$ ve Poly I:C, LPS ve Dox grubunda ise $0,328 \pm 0,164$ ortalama ve standart hata değeri bulunmuştur. Kontrol grubunun Poly I:C ve LPS grubuna göre ortalama fark değeri $0,018$ olup anlamlılık açısından anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubun doksorubisin grubuna göre ortalama fark değeri $0,014$ olup, anlamlılık açısından anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubun Poly I:C, LPS ve doksorubisin grubuna göre ortalama fark değeri $0,251$ olup, anlamlılık açısından anlamlı bulunmuştur. Swan 71 hücrelerine Poly I:C ve LPS uyguladığımızda ve PKR aktive ettiğimizde doksorubisin uyguladığımız swan 71 hücrelerini sadece doksorubisinle muamele ettiğimizde ortalama fark değeri $0,237$ bulunup anlamlılık açısından anlamlı bulunmuştur ve Şekil 17'de gösterilmiştir.



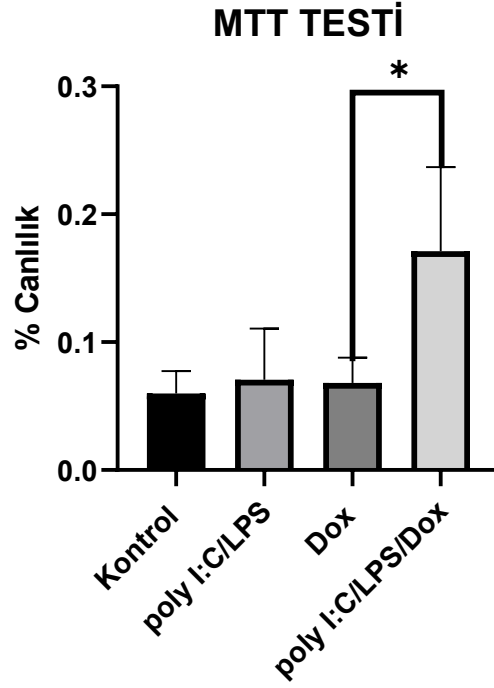
Şekil 17. MTT canlılık deneyinde birinci deney sonuçlarının grafiği.

İlk metotta dört grup ile yapılan ikinci deney sonucunda elde edilen istatistikî verilere göre, kontrol grubunda $0,077 \pm 0,038$, Poly I:C ve LPS grubunda $0,061 \pm 0,030$, doksorubisin grubunda $0,082 \pm 0,041$ ve Poly I:C, LPS ve doksorubisin grubunda ise $0,310 \pm 0,155$ ortalama ve standart hata değeri bulunmuştur. Kontrol grubun Poly I:C ve LPS grubuna göre ortalama fark değeri $0,016$ olup, anlamlılık açısından anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubun Doksorubisin grubuna göre ortalama fark değeri $0,004$ olup, anlamlılık açısından anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubun Poly I:C, LPS ve Dox grubuna göre ortalama fark değeri $0,233$ olup, anlamlılık açısından anlamlı bulunmuştur. Swan 71 hücrelerine Poly I:C ve LPS uyguladığımızda ve PKR aktive ettiğimizde doksorubisin uyguladığımız swan 71 hücrelerine sadece doksorubisinle muamele ettiğimiz ortalama fark değeri $0,228$ bulunup, anlamlılık açısından anlamlı bulunmuştur ve Şekil 18’de gösterilmiştir



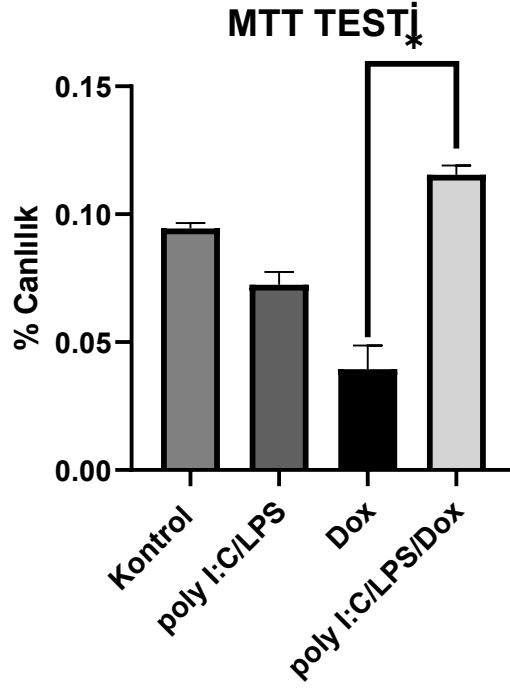
Şekil 18. MTT canlılık deneyinde ikinci deney sonuçlarının grafiği.

İlk metotta dört grup ile yapılan üçüncü deney sonucunda elde edilen istatistikî verilere göre, kontrol grubunda $0,060\pm 0,030$, Poly I:C ve LPS grubunda $0,070\pm 0,035$, Dox grubunda $0,068\pm 0,034$ ve Poly I:C, LPS ve Dox grubunda ise $0,171\pm 0,085$ ortalama ve standart hata değeri bulunmuştur. Kontrol grubun Poly I:C ve LPS grubuna göre ortalama fark değeri $0,010$ olup, anlamlılık açısından anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubun Dox grubuna göre ortalama fark değeri $0,008$ olup, anlamlılık açısından anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubun Poly I:C, LPS ve Dox grubuna göre ortalama fark değeri $0,111$ olup, anlamlılık açısından anlamlı bulunmuştur. Swan 71 hücrelerine Poly IC ve LPS uyguladığımızda ve PKR aktive ettiğimizde doksorubisin uyguladığımız swan 71 hücrelerine sadece doksorubisinle muamele ettiğimiz ortalama fark değeri $0,103$ bulunup, anlamlılık açısından anlamlı bulunmuştur ve Şekil 19'da gösterilmiştir.



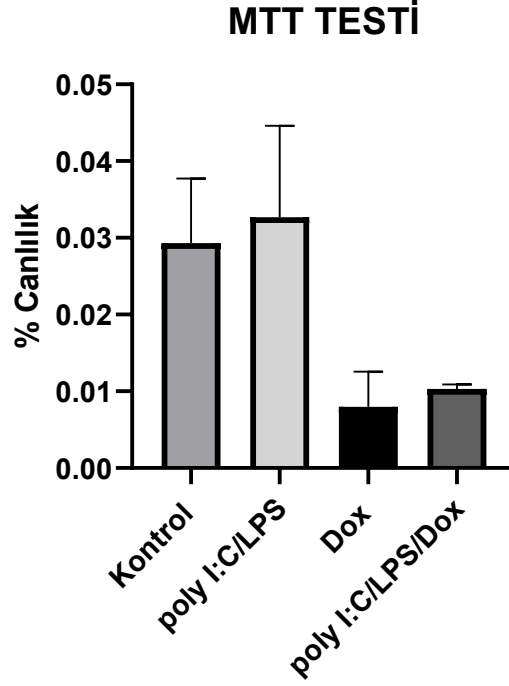
Şekil 19. MTT canlılık deneyinde üçüncü deney sonuçlarının grafiği.

İlk metotta dört grup ile yapılan dördüncü deney sonucunda elde edilen istatistiki verilere göre, kontrol grubunda $0,094\pm 0,066$, Poly I:C ve LPS grubunda $0,072\pm 0,051$, Dox grubunda $0,039\pm 0,027$ ve Poly I:C, LPS ve Dox grubunda ise $0,115\pm 0,081$ ortalama ve standart hata değeri bulunmuştur. Kontrol grubun Poly I:C ve LPS grubuna göre ortalama fark değeri $0,022$, anlamlılık açısından anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubun Dox grubuna göre ortalama fark değeri $0,055$ olup, anlamlılık açısından anlamlı bulunmuştur. Kontrol grubun Poly I:C, LPS ve Dox grubuna göre ortalama fark değeri $0,021$ olup, anlamlılık açısından anlamlı bulunmamıştır. Swan 71 hücrelerine Poly IC ve LPS uyguladığımızda ve PKR aktive ettiğimizde doksorubisin uyguladığımız swan 71 hücrelerine sadece doksorubisinle muamele ettiğimizde ortalama fark değeri $0,076$ bulunup, anlamlılık açısından anlamlı bulunmuştur ve Şekil 20'de gösterilmiştir.



Şekil 20. MTT canlılık deneyinde dördüncü deney sonuçlarının grafiği.

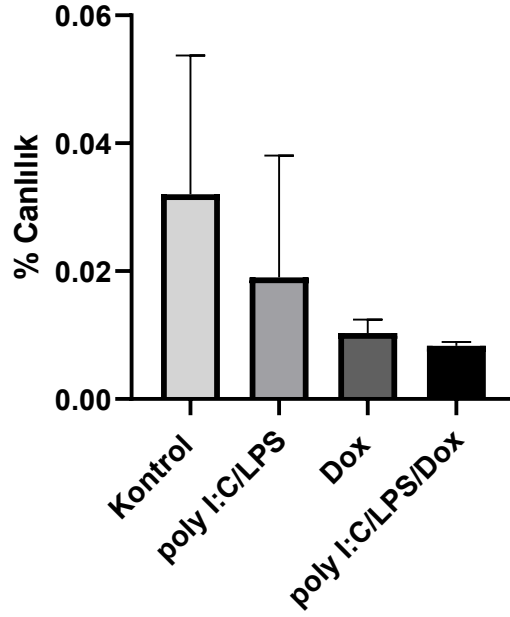
İkinci metot yöntemindeki dört grup birinci deney sonucunda istatistiksel verilere göre, kontrol grubunda $0,029 \pm 0,016$, Poly I:C ve LPS grubunda $0,032 \pm 0,018$, Dox grubunda $0,008 \pm 0,004$ ve Poly I:C, LPS ve Dox grubunda ise $0,010 \pm 0,005$ ortalama ve standart hata değeri bulunmuştur. Kontrol grubun Poly I:C ve LPS grubuna göre ortalama fark değeri $0,003$ olup anlamlılık açısından anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubun Dox grubuna göre ortalama fark değeri $0,021$ olup anlamlılık açısından anlamlı bulunmuştur. Kontrol grubun Poly I:C, LPS ve Dox grubuna göre ortalama fark değeri $0,019$ olup anlamlılık açısından anlamlı bulunmamıştır. Swan 71 hücrelerine Poly IC ve LPS uyguladığımızda ve PKR aktive ettiğimizde doksorubisin uyguladığımız swan 71 hücrelerine sadece doksorubisinle muamele ettiğimizde ortalama fark değeri $0,002$ bulunup anlamlılık açısından anlamlı bulunmamıştır ve Şekil 21’de gösterilmiştir.



Şekil 21. MTT canlılık deneyinde ikinci metot birinci deney sonuçlarının grafiği.

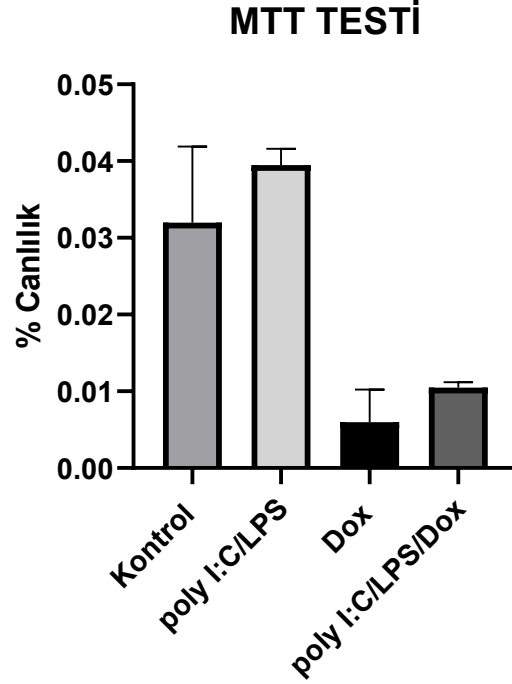
İkinci metot yöntemindeki ayırdığımız dört grup ikinci deney sonucunda istatistikî verilere göre, kontrol grubunda $0,032\pm 0,018$, Poly I:C ve LPS grubunda $0,019\pm 0,010$, Dox grubunda $0,010\pm 0,005$ ve Poly I:C, LPS ve Dox grubunda ise $0,008\pm 0,004$ ortalama ve standart hata değeri bulunmuştur. Kontrol grubunda Poly I:C ve LPS grubuna göre ortalama fark değeri $0,013$ olup, değerlendirildiğinde anlamlılık açısından bir fark bulunmamıştır. Kontrol grubunda Dox grubuna göre ortalama fark değeri $0,021$ olup, değerlendirildiğinde anlamlılık açısından anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubun Poly I:C, LPS ve Dox grubuna göre ortalama fark değeri $0,023$ olup değerlendirildiğinde anlamlılık açısından bir fark bulunmamıştır. Swan 71 hücrelerine Poly IC ve LPS uyguladığımızda ve PKR aktive ettiğimizde doksorubisin uyguladığımız swan 71 hücrelerine sadece doksorubisinle muamele ettiğimizde ortalama fark değeri $0,002$ değerlendirildiğinde anlamlılık açısından bir fark bulunmamıştır ve Şekil 22'de gösterilmiştir.

MTT TESTİ



Şekil 22. MTT canlılık deneyinde ikinci metot ikinci deney sonuçlarının grafiği.

İkinci metot yöntemindeki ayırdığımız dört grup üçüncü deney sonucunda istatistiki verilere göre, kontrol grubunda $0,032\pm 0,022$, Poly I:C ve LPS grubunda $0,039\pm 0,027$, Dox grubunda $0,006\pm 0,004$ ve Poly I:C, LPS ve Dox grubunda ise $0,010\pm 0,007$ ortalama ve standart hata değeri bulunmuştur. Kontrol grubun Poly I:C ve LPS grubuna göre ortalama fark değeri $0,007$ olup değerlendirildiğinde anlamlılık açısından bir fark bulunmamıştır. Kontrol grubunda Dox grubuna göre ortalama fark değeri $0,026$ olup değerlendirildiğinde anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Kontrol grubun Poly I:C, LPS ve Dox grubuna göre ortalama fark değeri $0,021$ olup değerlendirildiğinde anlamlılık açısından bir fark bulunmamıştır. Swan 71 hücrelerine Poly IC ve LPS uyguladığımızda ve PKR aktive ettiğimizde doksorubisin uyguladığımız swan 71 hücrelerine sadece doksorubisinle muamele ettiğimizde ortalama fark değeri $0,004$ değerlendirildiğinde anlamlılık açısından bir fark bulunmamıştır ve Şekil 23’de gösterilmiştir.



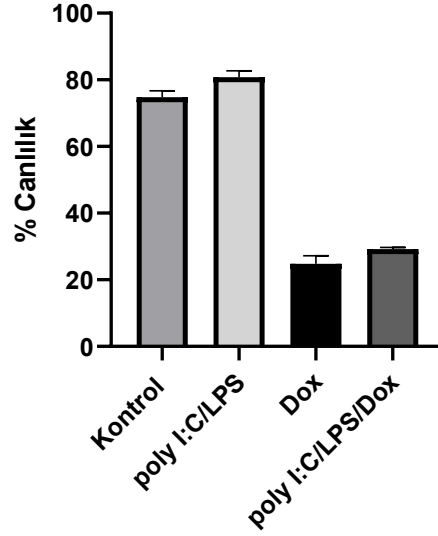
Şekil 23. MTT canlılık deneyinde ikinci metot üçüncü deney sonuçlarının grafiği.

4.3. Flow Sitometri Metodu Bulguları

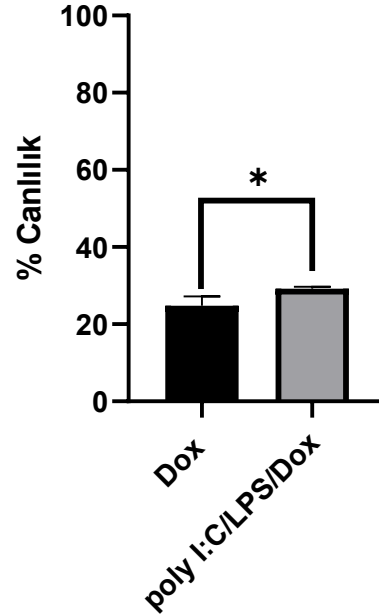
Swan 71 hücrelerine kontrol, poly I:C ve LPS grubu, Doksorubisin grubu ve , poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubu olarak dört grupta incelendi. Hücrelerde PKR aktivasyonunu oluşturmak için poly I:C ve LPS ile muamele edildi. poly I:C ve LPS ile muamele ettiğimiz hücreler 48 saat ve 72 saatte inkübe edildi. Hücelere kullandığımız doksorubisin 24 ve 48 saatte inkübe edildi ve canlılık değerlerine, apoptoz ve nekroz yollarına bakıldı.

Swan 71 hücrelerinde poly I:C ve LPS uyguladığımız 48 saat muamele edilen ve doksorubisin 24 muamele edilen canlılık bulguları sonuçlarına göre kontrol grubun, poly I:C ve LPS grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $50,990 \pm 1,481$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Kontrol grubun doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $50,05 \pm 1,481$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Kontrol grubun, poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $45,60 \pm 1,481$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Poly I:C ve LPS grubun doksorubisin grubun göre ortalama fark ve standart hata değeri $56,04 \pm 1,481$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Poly I:C ve LPS grubun poly I:C, LPS ve doksorubisin grubun göre ortalama fark ve standart hata değeri $51,59 \pm 1,481$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Doksorubisin grubun poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $-4,450 \pm 1,481$ ' dir ve

anlamli olmayip Şekil 24’de gösterilmiştir. Doksorubisin gubun ortalama değeri 24,76, poly I:C, LPS ve doksorubisin grubun ortalama değeri 29,76’ dir ve istatistiksel olarak anlamli bulunmuştur ve Şekil 25’ de gösterilmiştir.

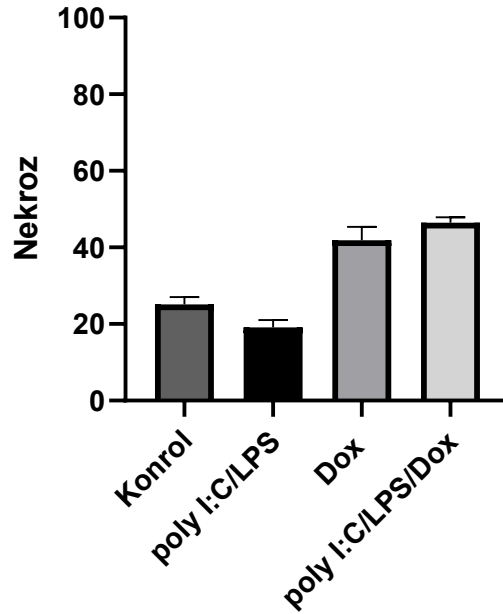


Şekil 24. Grublara göre canlilik yüzdeleri (Dox 24 saat ve poly I:C/LPS 48 saat).

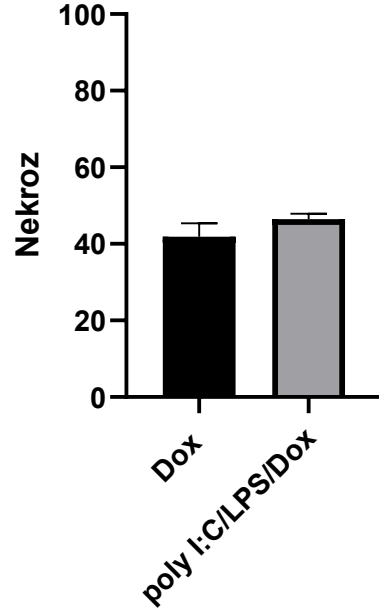


Şekil 25. Dox grubu ve poly I:C, LPS ve dox grubunun canlilik yüzdesi (Dox 24 saat ve poly I:C/LPS 48 saat).

Swan 71 hücrelerinde poly I:C ve LPS uyguladığımız 48 saat muamele edilen ve doksorubisin 24 muamele edilen hücre ölüm yolağı olan nekroz bulgularına göre kontrol grubun, poly I:C ve LPS grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $6,007 \pm 1,887'$ dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunamamıştır. Kontrol grubun doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $-16,70 \pm 1,887'$ dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Kontrol grubun, poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $-21,27 \pm 1,887'$ dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Poly I:C ve LPS grubun doksorubisin grubun göre ortalama fark ve standart hata değeri $-22,71 \pm 1,887'$ dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Poly I:C ve LPS grubun poly I:C , LPS ve doksorubisin grubun göre ortalama fark ve standart hata değeri $-27,28 \pm 1,887'$ dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Doksorubisin grubun poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $-4,570 \pm 1,887'$ dir ve anlamlı değildir ve Şekil 26'da gösterilmiştir. Doksorubisin grubun ortalama değeri 41,85, poly I:C, LPS ve doksorubisin grubun ortalama değeri 46,42' dir ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ve Şekil 27'de gösterilmiştir.

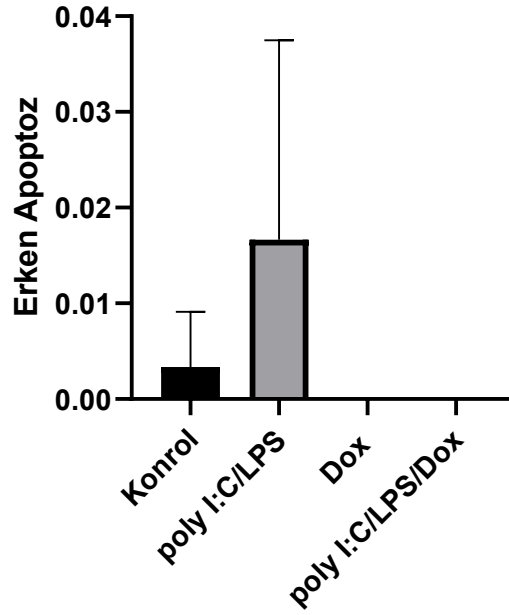


Şekil 26. Gruplara göre nekroz yüzdeleri (Dox 24 saat ve poly I:C/LPS 48 saat).



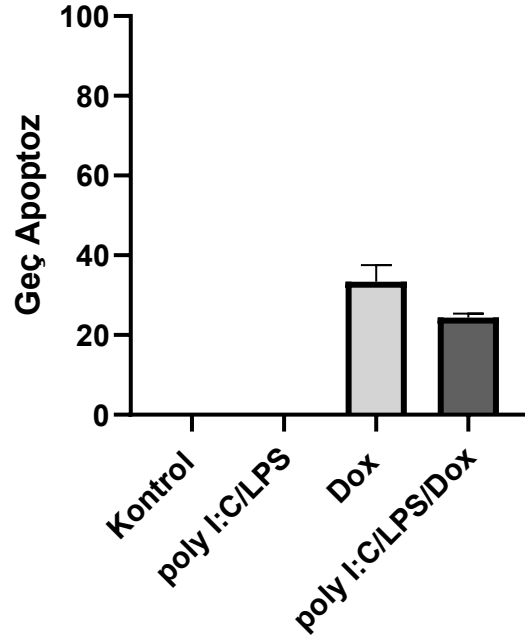
Şekil 27. Dox grubu ve poly I:C, LPS ve dox grubunun nekroz yüzdesi (Dox 24 saat ve poly I:C/LPS 48 saat).

Swan71 hücrelerinde poly I:C ve LPS uyguladığımız 48 saat muamele edilen ve doksorubisin 24 muamele edilen hücre ölüm yolağı olan erken apoptoz bulgularına göre kontrol grubun, poly I:C ve LPS grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $-0,013 \pm 0,008$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunamamıştır. Kontrol grubun doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $0,003 \pm 0,008$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunamamıştır. Kontrol grubun, poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $0,003 \pm 0,008$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmamıştır. Poly I:C ve LPS grubun doksorubisin grubun göre ortalama fark ve standart hata değeri $0,016 \pm 0,008$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmamıştır. Poly I:C ve LPS grubun poly I:C, LPS ve doksorubisin grubun göre ortalama fark ve standart hata değeri $0,016 \pm 0,008$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunamamıştır. Doksorubisin grubun poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $0,000 \pm 1,887$ ' dir ve anlamlı değildir ve Şekil 28'da gösterilmiştir. Doksorubisin grubun ve poly I:C, LPS ve doksorubisin grubun erken apoptoz görülmemiştir.

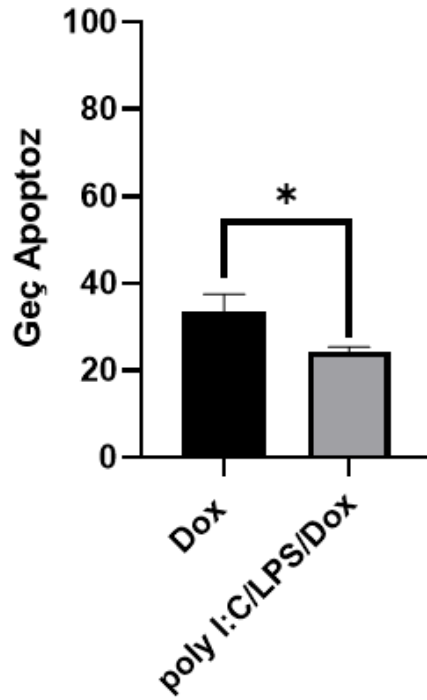


Şekil 28. Gruplara göre erken apoptoz yüzdesi (Dox 24 saat ve poly I:C/LPS 48 saat).

Swan 71 hücrelerinde poly I:C ve LPS uyguladığımız 48 saat muamele edilen ve doksorubisin 24 muamele edilen geç apoptoz bulguları göre kontrol grubun, poly I:C ve LPS grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $0,006 \pm 1,739$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmamıştır. Kontrol grubun doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $-33,36 \pm 1,739$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Kontrol grubun, poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $-24,33 \pm 1,739$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Poly I:C ve LPS grubun doksorubisin grubun göre ortalama fark ve standart hata değeri $-33,35 \pm 1,739$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Poly I:C ve LPS grubun poly I:C, LPS ve doksorubisin grubun göre ortalama fark ve standart hata değeri $-24,33 \pm 1,739$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Doksorubisin grubun poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $9,023 \pm 1,739$ ' dir ve anlamlıdır ve Şekil 29'da gösterilmiştir. Doksorubisin grubun ortalama değeri 33,39, poly I:C, LPS ve doksorubisin grubun ortalama değeri 24,37' dir ve istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ve Şekil 30'da gösterilmiştir. Kontrol grubunda ve poly I:C ve LPS grubunda geç apoptoz görülmemiştir.



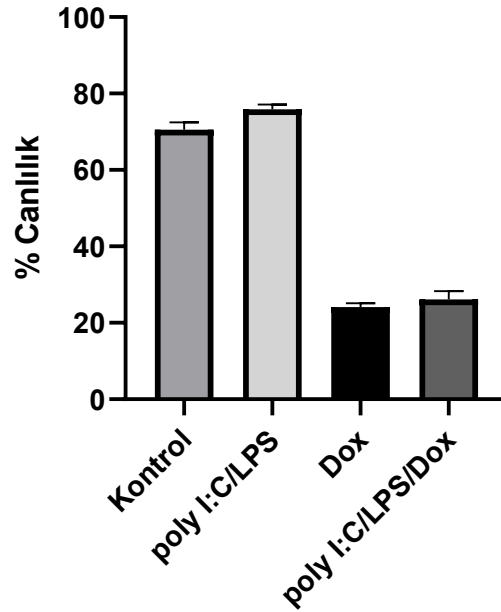
Şekil 29. Gruplara göre geç apoptoz yüzdeleri (Dox 24 saat ve poly I:C/LPS 48 saat).



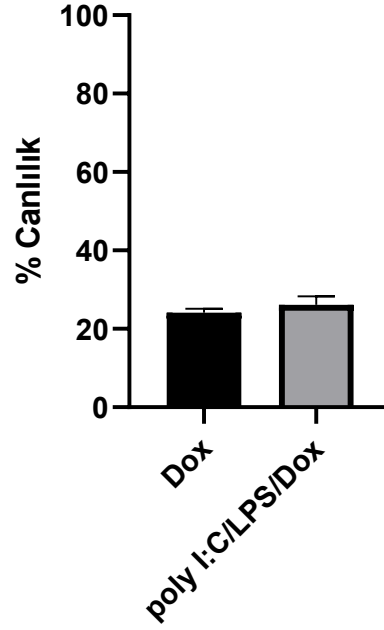
Şekil 30. Dox grubu ve poly I:C, LPS ve dox grubunun geç apoptoz yüzdesi (Dox 24 saat ve poly I:C/LPS 48 saat).

Swan 71 hücrelerinde poly I:C ve LPS uyguladığımız 72 saat muamele edilen ve doksorubisin 48 muamele edilen canlılık bulguları sonuçlarına göre, kontrol grubun, poly I:C

ve LPS grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $5,343 \pm 1,366$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Kontrol grubun doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $46,40 \pm 1,366$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Kontrol grubun, poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $44,42 \pm 1,366$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Poly I:C ve LPS grubun doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $51,75 \pm 1,366$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Poly I:C ve LPS grubun, poly I:C, LPS ve doksorubisin grubun göre ortalama fark ve standart hata değeri $49,76 \pm 1,366$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Doksorubisin grubun poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $-1,987 \pm 1,366$ ' dir ve anlamlı olmayıp Şekil 31'de gösterilmiştir. Doksorubisin grubun ortalama değeri 24,13, poly I:C, LPS ve doksorubisin grubun ortalama değeri 26,11' dir ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ve Şekil 32'de gösterilmiştir.

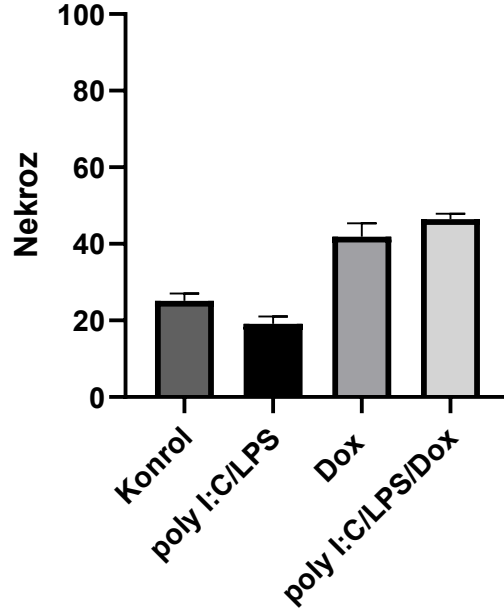


Şekil 31. Gruplara göre canlılık yüzdeleri (Dox 48 saat ve poly I:C/LPS 72 saat).

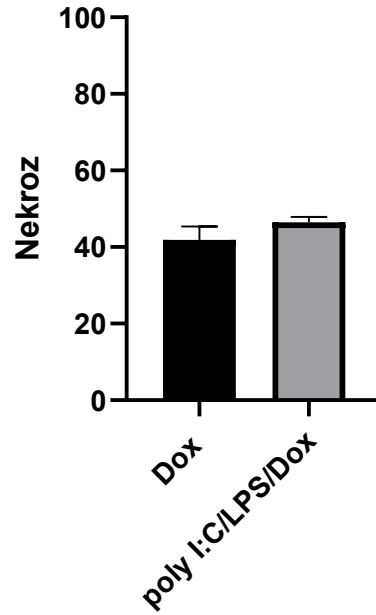


Şekil 32. Dox grubu ve poly I:C, LPS ve dox grubunun canlılık yüzdesi (Dox 48 saat ve poly I:C/LPS 72 saat).

Swan 71 hücrelerinde poly I:C ve LPS uyguladığımız 72 saat muamele edilen ve doksorubisin 48 muamele edilen hücre ölüm yolağı olan nekroz bulgularına göre, kontrol grubun, poly I:C ve LPS grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $5,327 \pm 1,474$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Kontrol grubun doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $-28,93 \pm 1,474$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Kontrol grubun, poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $-26,82 \pm 1,474$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Poly I:C ve LPS grubun doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $-34,26 \pm 1,474$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Poly I:C ve LPS grubun, poly I:C, LPS ve doksorubisin grubun göre ortalama fark ve standart hata değeri $-32,15 \pm 1,474$ ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Doksorubisin grubun poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $2,113 \pm 1,474$ ' dir ve anlamlı değildir. Şekil 33'de gösterilmiştir. Doksorubisin grubun ortalama değeri 58,34 poly I:C, LPS ve doksorubisin grubun ortalama değeri 56,23' dir ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ve Şekil 34' de gösterilmiştir.



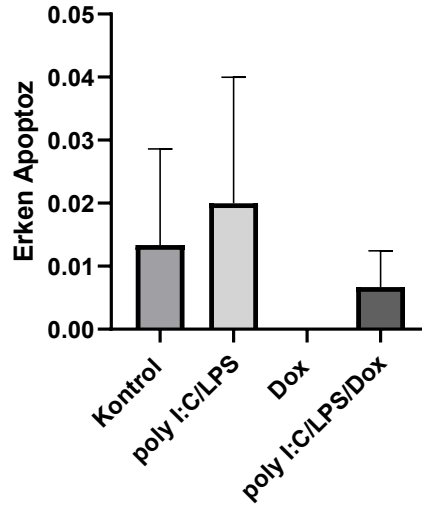
Şekil 33. Gruplara göre nekroz yüzdeleri (Dox 48 saat ve poly I:C/LPS 72 saat).



Şekil 34. Dox grubu ve poly I:C, LPS ve dox grubunun canlılık yüzdesi (Dox 48 saat ve poly I:C/LPS 72 saat).

Swan 71 hücrelerinde poly I:C ve LPS uyguladığımız 72 saat muamele edilen ve doksorubisin 48 muamele edilen erken apoptoz bulguları göre, kontrol grubun, poly I:C ve LPS grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $-0,006 \pm 0,010$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunamamıştır. Kontrol grubun doksorubisin grubuna göre ortalama fark

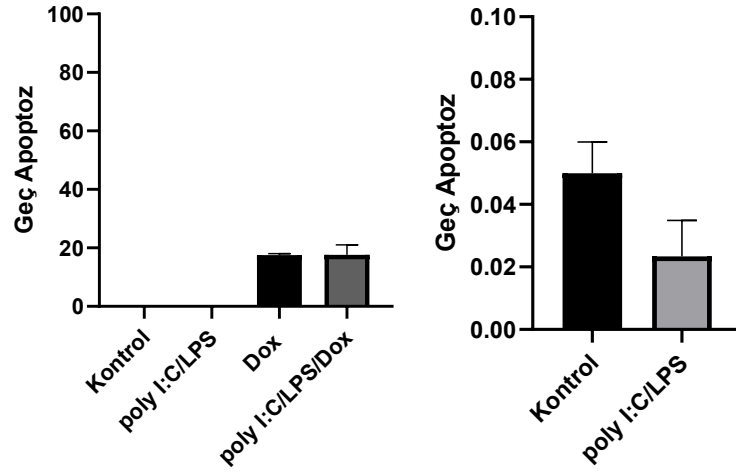
ve standart hata değeri $0,013 \pm 0,010$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunamamıştır. Kontrol grubun, poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $0,006 \pm 0,010$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunamamıştır. Poly I:C ve LPS grubun doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $0,020 \pm 0,010$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunamamıştır. Poly I:C ve LPS grubun poly I:C, LPS ve doksorubisin grubun göre ortalama fark ve standart hata değeri $0,013 \pm 0,010$ ve anlamlılık açısından bir fark bulunamamıştır. Doksorubisin grubun poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $-0,006 \pm 0,010$ ' dir ve anlamlı değildir. Şekil 35'de gösterilmiştir. Doksorubisin grubun ortalama değeri 0,000, poly I:C, LPS ve doksorubisin grubun ortalama değeri 0,006' dir ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Doksorubisin grubunda erken apoptoz safhası görülmemiştir.



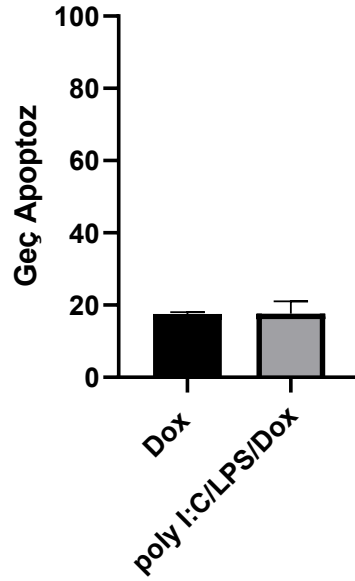
Şekil 35. Gruplara göre erken apoptoz yüzdesi (Dox 48 saat ve poly I:C/LPS 72 saat).

Swan 71 hücrelerinde poly I:C ve LPS uyguladığımız 72 saat muamele edilen ve doksorubisin 48 muamele edilen geç apoptoz bulgularına göre kontrol grubun, poly I:C ve LPS grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $0,026 \pm 1,391$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunamamıştır. Kontrol grubun doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $-17,48 \pm 1,391$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Kontrol grubun, poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $-17,60 \pm 1,391$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Poly I:C ve LPS grubun doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $-17,51 \pm 1,391$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Poly I:C ve LPS grubun poly I:C, LPS ve

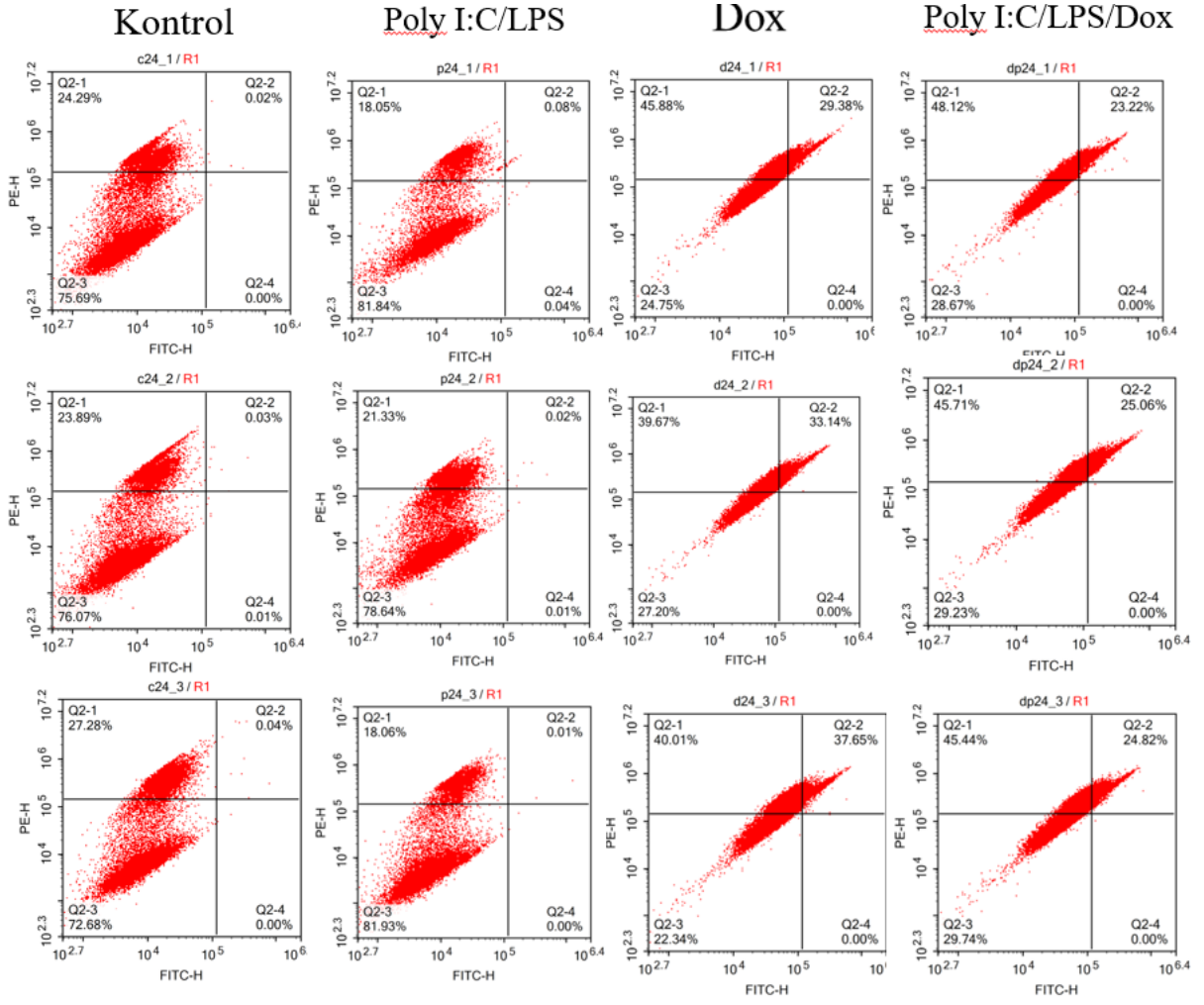
doksorubisin grubun göre ortalama fark ve standart hata değeri $-17,63 \pm 1,391$ ' dir ve anlamlılık açısından bir fark bulunmuştur. Doksorubisin grubun poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve standart hata değeri $-0,116 \pm 1,391$ ' dir ve anlamlı değildir. Şekil 36'da gösterilmiştir. Doksorubisin grubun ortalama değeri 17,53, poly I:C, LPS ve doksorubisin grubun ortalama değeri 17,65' dir ve istatistiksel olarak da anlamlı bulunmamıştır ve Şekil 37' de gösterilmiştir.



Şekil 36. Gruplara göre geç apoptoz yüzdesi (Dox 48 saat ve poly I:C/LPS 72 saat).

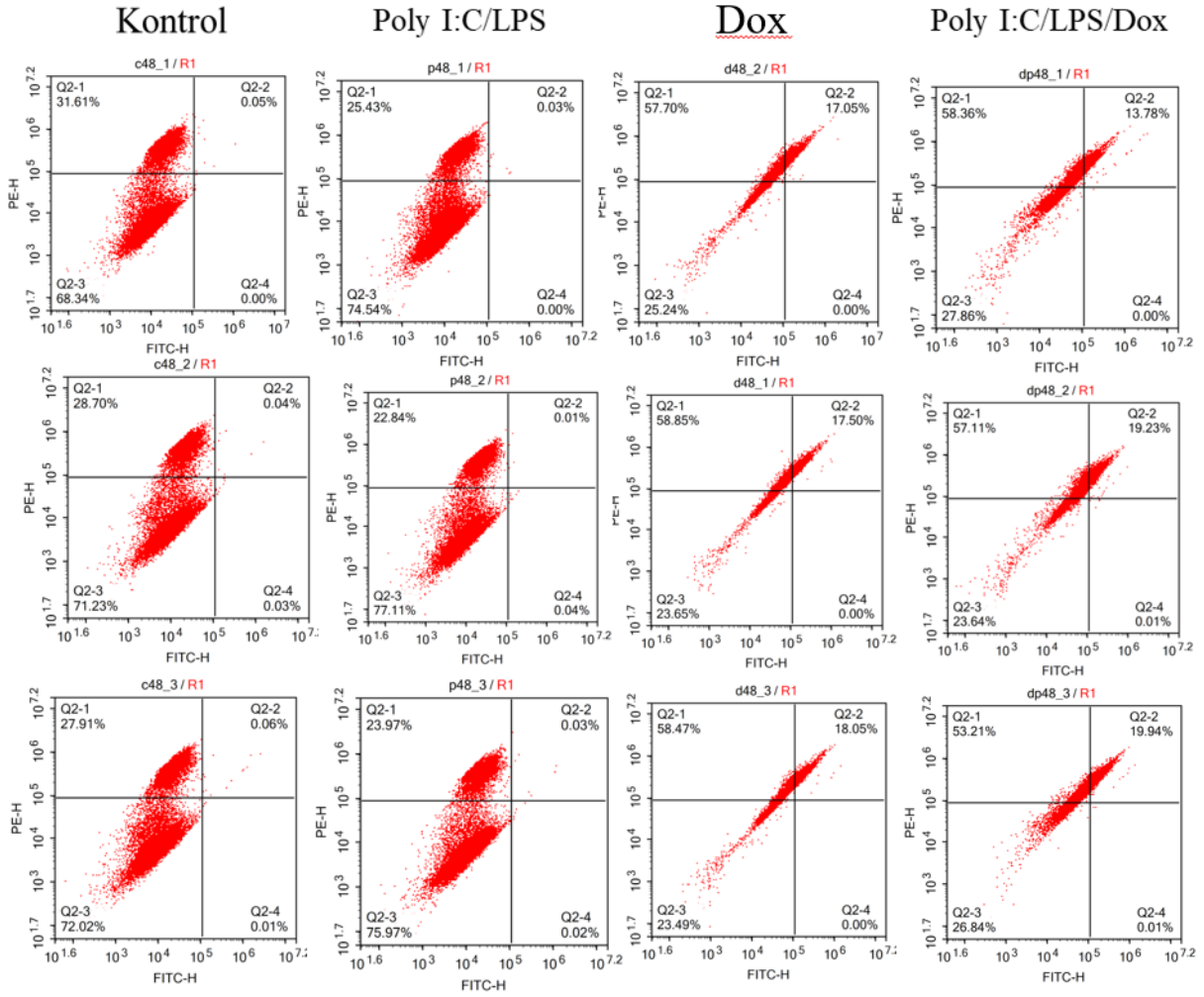


Şekil 37. Dox grubu ve poly I:C, LPS ve dox grubunun geç apoptoz yüzdesi (Dox 48 saat ve poly I:C/LPS 72 saat).



Poly I:C/LPS: 48 SAAT
Dox: 24 SAAT

Şekil 38. Kontrol grubun, poly I:C ve LPS grubun, Doksorubisin grubu ve poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubuyla canlılık, nekroz, geç apoptoz ve erken apoptoz sonuçlarının değerlendirilmesi ve yüzde değerleri. Poly I:C/ LPS 48 saat, Doksorubisin 24 saat histogramları (Q1: Nekroz, Q2: Geç Apoptoz, Q3 :% Canlılık, Q4:Erken Apoptoz).

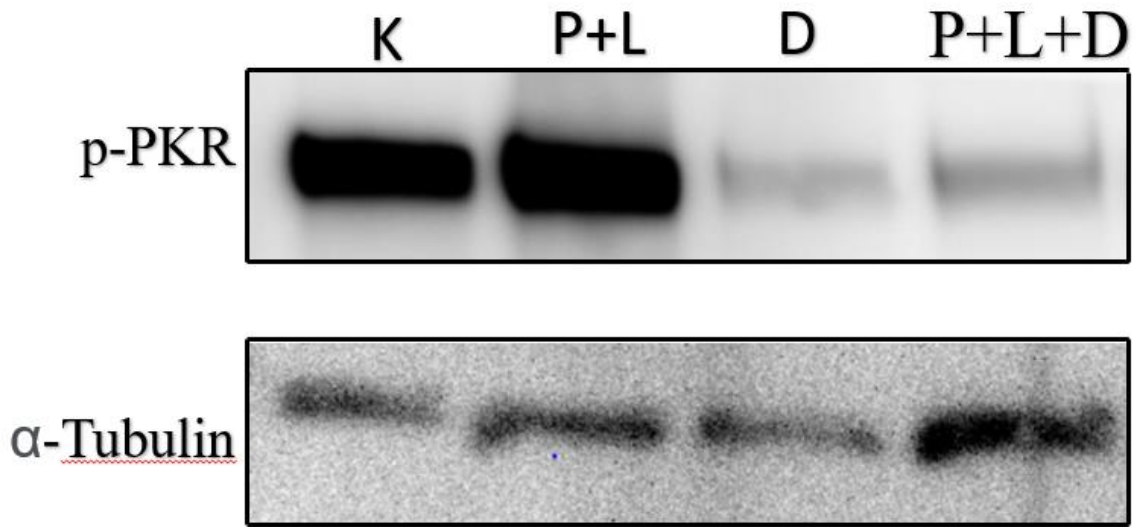


Poly I:C/LPS: 72 SAAT
Dox: 48 SAAT

Şekil 39. Kontrol grubun, poly I:C ve LPS grubun, Doksorubisin grubu ve poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubuyla canlılık, nekroz, geç apoptoz ve erken apoptoz sonuçlarının değerlendirilmesi ve yüzde değerleri. Poly I:C/ LPS 72 saat, Doksorubisin 48 saat histogramları (Q1: Nekroz, Q2: Geç Apoptoz, Q3 :% Canlılık, Q4:Erken Apoptoz).

4.4. Western Blot Deneyi Bulguları

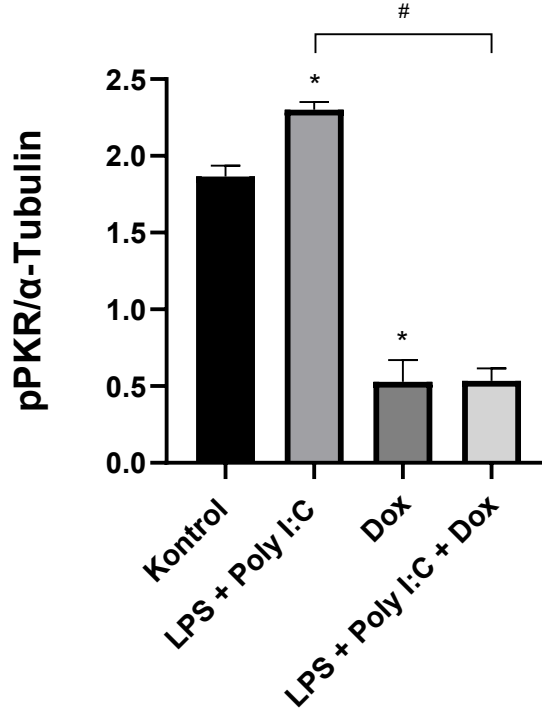
Swan 71 hücrelerinde kontrol, poly I:C ve LPS grubu, Doksorubisin grubu ve , poly I:C, LPS ve Doksorubisin grubu olarak dört grupta incelendi. Swan 71 hücrelerine poly I:C ve LPS ile muamele edilerek PKR aktivasyonunu gerçekleştirildi. Poly I:C ve LPS ile muamele ettiğimiz hücreler 48 saat muamele edilirken kemoterapi ilacı doksorubisin için 24 saat muamele edildi. Western blot deneyinde protein düzeyindeki p-PKR belirlenmesi ve a-tubulin antikoru her grup için ayrı ayrı belirlendi. p-PKR antikoru a-tubulin antikoru göre normalize edildi. p-PKR ve α -tubulin bant görüntüleri Şekil 38’de gösterilmiştir.



Şekil 40. p-PKR ve a-tubulin bant görüntüleri.

Swan 71 hücrelerinin kontrol grubun poly I:C ve LPS grubuna göre bulguları ortalama fark ve ortalama standart hata değeri $-0,435 \pm 0,130$ ' dir. Protein düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kontrol grubun doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve ortalama standart hata değeri $1,336 \pm 0,130$ ' dir ve protein düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kontrol grubun poly I:C, LPS ve doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve ortalama standart hata değeri $1,330 \pm 0,130$ ' dur ve protein düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Poly I:C ve LPS grubun doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve ortalama standart hata değeri $1,772 \pm 0,130$ ' dur ve protein düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Poly I:C ve LPS grubun poly I:C, LPS ve doksorubisin grubuna göre ortalama fark ve ortalama standart hata değeri $1,766 \pm 0,130$ ' dur ve protein düzeyinde

istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Dokсорubisin grubun poly I:C, LPS ve dokсорubisin grubuna göre ortalama fark ve ortalama standart hata değeri $-0,006 \pm 0,130$ dur ve protein düzeyinde istatistiksel olarak düşük düzeyde anlamlı bulunmuştur ve Şekil 39'da gösterilmiştir.



Şekil 41. Gruplara göre p-PKR ve α -tubulin oranları.

5. TARTIŞMA

Koryokarsinom, gebelikle ilişkili olup trofoblast hücrelerden köken alan oldukça kötü huylu bir tümördür ve metastaz yapabilen bir gastasyonel troblastik hastalıklardan biridir. Koryokarsinom hastalığı, insan koryonik gonadotropini (HCG) belirteciyle tanısı koyularak cerrahi işlem, radyoterapi ve kemoterapiyle tedavi edilir. Koryokarsinom hastalığının nedeni hala bilinmemekte olup kemoterapiye cevap vermesine rağmen kötü prognozlu olması sebebiyle teşhisi geç konulmaktadır (Mangla ve diğerleri, 2017).

PKR'yı aktive etmek için yapılan bir çalışmada Li ve diğerleri (2009), murin pankreatik beta TC3 ve alfa TC3 hücrelerine poly I:C'yi farklı konsantrasyonlarda muamele ederek PKR aktivasyonu oluşturmuşlar fakat beta TC3 ve alfa TC3 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görememişlerdir. Mevcut çalışmada ise PKR'yı aktive etmek için koryokarsinom hücrelerine poly I:C ve LPS uygulanmış ve PKR'nın aktive edildiği gösterilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise Corbet ve diğerleri (2022), PKR aktivatörü olan poly I:C'yi kullanarak akciğer kanseri hücrelerinde PKR'nın aktive olup olmadığını gözlemlemişlerdir ve PKR' nin aktif formu olan p-PKR'ye bakarak PKR aktivasyonunun olduğunu tespit etmişlerdir.

2015 yılında Soininen ve diğerleri tarafından gerçekleştirilen farklı bir çalışmada koryokarsinom BeWO hücrelerinde doksorubisin, lizomal doksorubisin ve pegile lizomal doksorubisinin toksisitesi araştırılmıştır. Doksorubisin, pegile lizomal doksorubisin ve lizomal doksorubisinin toksisite ve hücre sel alımı karşılaştırıldığında, pegile lizomal doksorubisinin önemli ölçüde daha düşük olduğu belirlenmiştir. Başka bir yapılan çalışmada ise Erol ve diğerleri (2020), koryokarsinom JAR ve JEG-3 hücrelerinde pegile lizomal doksorubisin, beta-karoten, doksorubisin ve beta-karoten kombinasyonlarının duyarlılığı araştırılmıştır. JEG-3 ve JAR hücrelerinde pegile lizomal doksorubisinin apoptozu arttırdığı, beta-karotenin ise JAR hücrelerinde apoptozu artırırken JEG-3 hücrelerinde azalttığı gösterilmiştir. Pegile lizomal doksorubisin ve beta karoten kombinasyonunun ise hücrelerde apoptozu arttırdığı saptanmıştır. Çalışmamızda, doksorubisinin farklı doz konsantrasyonlarında koryokarsinom swan 71 hücrelerini öldürdüğü gösterilerek doksorubisine duyarlılığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda, doksorubisinin MTT canlılık analizinde fenol kırmızı renk vermesinden dolayı hücrelerin absorbans değerlerinin yüksek olduğu düşünülmüştür ve bu nedenle farklı metot denenmiştir. Swan 71 hücreleri, doksorubisin ve poly I:C, LPS ve doksorubisin grubu ile muamele edilmiş ve canlılık etkisi tam olarak bulunamamıştır. MTT testinin tekniğinin

çalışmamızda sonuç vermediği gözlenmiştir. MTT testinin çıkmamasının teknik hatalardan dolayı olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada Luis ve diğerleri (2019), MCF-7 meme kanseri hücre hattını kullanarak doksorubisinin etkisini değerlendirmek için MTT canlılık testini farklı bir metod ile hücelere uygulamışlardır. DMEM ve MTT solüsyonunun karışımının doksorubisin ve formozan kristalleri ile aynı dalga boyunda en yüksek absorbansta olduğunu göstermişlerdir. Doksorubisinin, DMEM ve MTT solüsyonunda inkübasyon sürecinde MTT' ye müdahale ettiğini savunmuşlardır. DMEM'i PBS'le yer değiştirerek MTT solüsyonunu PBS içinde inkübe ettiklerinde ise DMEM yıkanarak ortadan kalktığı için böyle bir müdahalenin olmadığını ortaya koymuşlardır. Hücelere doksorubisin ile muamele edildiğinde tedavi ortamının PBS ile yer değiştirdiğinde DMEM' e göre metabolik aktivitenin doğru sonuç verdiği gösterilmiştir. PBS' deki sonuçların canlı ve net sonuçlar olduğu belirtilmiştir.

PKR aktivasyonu eIF2 α fosforilasyon yoluyla protein sentezini inhibe ederek hücre streslerine cevap olarak hücre ölümüne yol açmaktadır. Yapılan bir çalışmada Peidis ve diğerleri (2011), fare embriyonik fibroblast hücrelerinde (MEF) DNA hasarına cevap olarak PKR'nin biyolojik rolünü incelemişlerdir. MEF hücrelerinde PKR aktivesi olmadığı görülmüş, doksorubisin ile muamele edildiğinde ise yanıt olarak hücre ölümünün PKR için gerekli olduğu gösterilmiştir. MEF hücrelerinin doksorubisinin öldürücü etkisine karşı daha duyarlı olduğu ve PKR'nin hücre ölümünü başlatmasında spesifik bir rolü olduğunu ifade etmişlerdir. Daha sonra MEF hücrelerinin doksorubisine duyarlılığına karşı hücre ölümünde eIF2 α fosforilasyonunu indüklediğini ve hücre ölümünü arttırdığını saptamışlardır. PKR'nin doksorubisinle tedavi edildiğinde MEF hücrelerinde tümör baskılayıcı p73 yoluyla hücre ölümünün indüklenmediği gösterilerek PKR'nin doksorubisine yanıt olarak kanser tedavilerinde potansiyel etkilere sahip olabileceği gösterilmiştir. Gerçekleştirilen mevcut çalışmada ise swan 71 hücrelerinde PKR'nin doksorubisinle tedavisine yanıt olarak hücre proliferasyonunu az miktarda arttırdığı bulunmuştur. Poly I:C ve LPS'nin doksorubisine maruz bırakılmış swan 71 hücrelerinde hücre ölümünü indüklemediği görülmüştür.

Yapılan bir diğer çalışmada Lee ve diğerleri (2022), triple negatif meme kanseri (TNBC) hücrelerinin eIF2 α ve CHK1'in fosforilasyonu yoluyla doksorubisinle tedavi edildiğinde apoptozu indüklediğini göstermişlerdir. PKR, doksorubisinle ile tedavi edilen TNBC hücrelerinde eIF2 α fosforilasyonunu önemli oranda etkilediği ve TNBC hücrelerinde apoptoz sırasında PKR aktivasyonunun terapötik bir hedef olarak hizmet edebileceği gösterilmiştir. Başka bir çalışmada, Bawaneh ve diğerleri (2022), TNBC modeli farelerde

tedavi için LPS, doksorubisin ve LPS ve doksorubisin kullanılmıştır. LPS' nin ve doksorubisinin etkisini araştırmak için farelere tek başına LPS verilip ayrı zamanda LPS ve doksorubisin uygulanmıştır. LPS ve doksorubisin ve LPS ile muamele edilen farelerde tümör hacminde hiçbir fark görülmemiştir ve LPS'nin doksorubisinin etkisini azalttığını gözlemlemişlerdir. LPS ve doksorubisine yanıt verenler karşılaştırıldığında ise, tümör proliferasyonunda artış olduğu bulunmuştur. Bu sonuca göre TNBC hücreleri LPS ile muamele edildiğinde kemoterapinin etkisinin düştüğu belirtilebilir. Çalışmamızda ise poly I:C ve LPS doksorubisin ile muamele edildiğinde hücre proliferasyonunda azalma olmadığı bunun da LPS'nin etkisinden olabileceği düşünölmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, koryokarsinom hücrelerinde PKR aktivasyonunun kemoterapötik ajan doksorubisine karşı hücre proliferasyonunda duyarlı olduğu tespit edildi. PKR aktivasyonunun doksorubisin üzerindeki etkileri belirlenip anlamlı olduğunun tespiti yapılmıştır.

PKR aktivasyonunu izlemek için swam 71 hücrelerine poly I:C ve LPS uygulandı. Swam 71 hücrelerine kontrol, poly I:C / LPS, doksorubisin, doksorubisin/poly I:C/LPS grupları muamele edilerek, hücrelerde hücre canlılığı, apoptoz ve nekroz yollarına bakıldı. Ayrıca protein düzeyindeki değerlendirme için p-PKR ve α -tubulin antikoru her grup için ayrı ayrı ölçüldü.

İlk olarak hücre sayım cihazıyla yapılan deneyden elde edilen sonuçlara göre, koryokarsinom hücrelerine doksorubisin farklı dozlarda (0.39 μ g/ml, 1.56 μ g/ml, 6.25 μ g/ml, 25 μ g/ml, 100 μ g/ml) 24 saat muamele edildiğinde, hücrelerde kontrole oranla doza ve zamana bağlı istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi ($p < 0,05$, $p < 0,001$). Kemoterapi ilacı doksorubisinin doza bağlı olarak hücre canlılığını inhibe ettiği tespit edildi. PKR'yı aktive etmek için poly I:C ve LPS uyguladığımız hücrelere, farklı dozlarda doksorubisinle birlikte 24 saat muamele edildi ve poly I:C/LPS kontrolüne göre doksorubisin uygulanmış gruplarda doza ve zamana bağlı istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi ($p < 0,05$, $p < 0,001$). Çalışmada, doksorubisini en yüksek dozda uyguladığımız swan 71 hücrelerinde ve PKR aktive edilmiş doksorubisin uygulanmış hücrelerde anlamlı bir farklılık gözlemlenmiş ve istatistiksel olarak bu farklılık anlamlı bulunmuştur. PKR aktivasyonu doksorubisine duyarlılıkta direnç oluşturmuştur.

Kontrol, LPS/poly I:C, Dox ve LPS/poly I:C/dox gruplarında hücredeki canlılığı ölçmek için MTT testi uygulanmış ve deney sonuçlarına göre kontrolün poly I:C ve LPS gruplarına göre hem arttığı ve hem de azaldığı bulunmuştur ve bu nedenle ve tam net sonuç elde edilememiştir. Doksorubisin ve poly I:C/LPS grubuyla karşılaştırdığımız da çoğunlukla PKR aktivasyonunun doksorubisine duyarlılığında direnç gösterdiği görülmüştür. Ancak bazı sonuçlarda ise PKR aktivasyonu olduğunda doksorubisin duyarlılığında hücre canlılığında azalma gözlemlenmiş ve bu sonuçlara bakıldığında yapılan MTT testi deneyinde teknik hatalardan dolayı sonuç alınmadığı belirlenmiştir.

Çalışmada, flow sitometri sonuçlarına göre, koryokarsinom hücrelerine doksorubisin 24 ve 48 saat, poly I:C/LPS 48 ve 72 saat muamele edilmiş, PKR aktive edilen hücrelerde doksorubisine karşı hücre canlılığına direnç gözlenmiş ve doksorubisinin hücreleri apoptoz yoluyla öldürdüğü belirlenmiştir. Çalışmada western blot sonuçlarına göre ise, p-PKR antikoruna bakıldı. Doksorubisinle muamele edilen hücrelerde p-PKR aktivasyonunun çok düşük olduğu görülmüştür. İlginç bir şekilde bizim hipotezimizde PKR aktivasyonunun doksorubisini engelleyeceği düşünülürken; aslında doksorubisinin PKR aktivasyonunu engellediği ortaya çıkmıştır.

Mevcut çalışmanın sonucuna göre, PKR ile aktive olan hücreler, kontrole kıyasla doksorubisine orta derecede daha az duyarlıydı. İlginç bir şekilde, Poly I:C ve LPS tedavisi üzerine doksorubisin ile tedavi edilen hücrelerde PKR fosforilasyonunun büyük ölçüde inhibe edildiği gözlemlendi. İleri çalışmalarla doksorubisinin koryokarsinom hücrelerinde PKR aktivasyonuna neden direnç kazandığıyla ilgili çalışmalar yapılabilir ve mevcut çalışma genişletilebilir. Böylece daha anlamlı sonuçlar elde edilebileceğinin kaaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Akşit, H., Bildik, A. (2008). Apoptozis. *YYÜ Vet Fak Derg*, 19(1), 55–63.
- Bawaneh, A., Wilson, A. S., Levi, N., Howard-McNatt, M. M., Chiba, A., Soto-Pantoja, D. R., Cook, K. L. (2022). Intestinal Microbiota Influence Doxorubicin Responsiveness in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers*, 14 (19). <https://doi.org/10.3390/CANCERS14194849>
- Bleiblo, F, Michael, P, Brabant, D, Ramana, C V, Saleh, T T M, Parrillo, J E, Kumar, A. (2013). JAK kinases are required for the bacterial RNA and poly I:C induced tyrosine phosphorylation of PKR. *Int J Clin Exp Med*, 6(1):16-25.
- Cesaro, T., & Michiels, T. (2021). Inhibition of PKR by Viruses. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.757238>
- Cole, J. L. (2007). Activation of PKR: an open and shut case? *Trends in Biochemical Sciences*, 32(2), 57–62. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2006.12.003>
- Corbet, G. A., Burke, J. M., Bublitz, G. R., Tay, J. W., & Parker, R. (2022). dsRNA-induced condensation of antiviral proteins modulates PKR activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(33). <https://doi.org/10.1073/PNAS.2204235119>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Erkekoğlu, P., Baydar, T. (2021). Güncel In Vitro Sitotoksikite Testleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 41(1), 45–63.
- Erol, S. A., Sel, G., Harma, M. İ., Harma, M., & Tekin, İ. Ö. (2020). The comparison of pegylated liposomal doxorubicin and beta-carotene effects on JAR and JEG-3 choriocarcinoma human cell culture models. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*, 21(3), 171–179. <https://doi.org/10.4274/JTGGA.GALENOS.2020.2019.0199>
- Feng, G. (1992). Identification of double-stranded RNA-binding domains in the interferon-induced double-stranded RNA-activated p68 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 5447-5451.

- Fiore, R., Suleiman, S., Felix, A., O'toole, S. A., O'leary, J. J., Ward, M. P., Beirne, J., Sabol, M., Ozretić, P., Yordanov, A., Vasileva-Slaveva, M., Kostov, S., Nikolova, M., Said-Huntingford, I., Ayers, D., Ellul, B., Pentimalli, F., Giordano, A., Calleja-Agius, J. (2021). An Overview of the Role of Long Non-Coding RNAs in Human Choriocarcinoma. *International Journal of Molecular Sciences* 22(12).
- García, M. A., Meurs, E. F., & Esteban, M. (2007). The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie*, 89(6–7), 799–811. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2007.03.001>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>
- Hesler, S., Angeliadis, M., Husain, B., & Cole, J. L. (2021). Contribution of dsRBD2 to PKR Activation. *ACS Omega*, 6(17), 11367–11374. <https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.1C00343>
- Lee, S., Jee, H. Y., Lee, Y. G., Shin, J. il, Jeon, Y. J., Kim, J. B., Seo, H. E., Lee, J. Y., & Lee, K. (2022). PKR-Mediated Phosphorylation of eIF2a and CHK1 Is Associated with Doxorubicin-Mediated Apoptosis in HCC1143 Triple-Negative Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24). <https://doi.org/10.3390/IJMS232415872>
- Li, M., Zheng, D. J., Field, L. L., & Bonnevie-Nielsen, V. (2009). Murine pancreatic beta TC3 cells show greater 2', 5'-oligoadenylate synthetase (2'5'AS) antiviral enzyme activity and apoptosis following IFN-alpha or poly(I:C) treatment than pancreatic alpha TC3 cells. *Experimental Diabetes Research*, 2009, 631026. <https://doi.org/10.1155/2009/631026>
- Luis, C., Castaño-Guerrero, Y., Soares, R., Sales, G., & Fernandes, R. (2019). Avoiding the Interference of Doxorubicin with MTT Measurements on the MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Methods and Protocols*, 2(2), 1–5. <https://doi.org/10.3390/MPS2020029>
- Kaur, B. (2021). Pathology of gestational trophoblastic disease (GTD). *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 74, 3–28. <https://doi.org/10.1016/J.BPOBGYN.2021.02.005>

- Lurain, J. R. (2010). Gestational trophoblastic disease I: epidemiology, pathology, clinical presentation and diagnosis of gestational trophoblastic disease, and management of hydatidiform mole. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 203(6), 531–539. <https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2010.06.073>
- Mangla, M., Singla, D., Kaur, H., & Sharma, S. (2017). Unusual clinical presentations of choriocarcinoma: A systematic review of case reports. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, 56(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.TJOG.2015.05.011>
- Ngan H. Y. S., Seckl M. J., Berkowitz R. S., Xiang Y., Golfier F., Sekharan P. K., Lurain J. R., Massuger L. (2021) Diagnosis and management of gestational trophoblastic disease: 2021 update.
- Peidis, P., Papadakis, A. I., Muaddi, H., Richard, S., & Koromilas, A. E. (2011). Doxorubicin bypasses the cytoprotective effects of eIF2 α phosphorylation and promotes PKR-mediated cell death. *Cell Death and Differentiation*, 18(1), 145–154. <https://doi.org/10.1038/CDD.2010.76>
- Roy, P. S., & Saikia, B. J. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian Journal of Cancer*, 53(3), 441–442. <https://doi.org/10.4103/0019-509X.200658>
- Seckl, M. J., Sebire, N. J., & Berkowitz, R. S. (2010). Gestational trophoblastic disease. *Lancet* (London, England), 376(9742), 717–729. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60280-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60280-2)
- Silva, A. L. M. da, Monteiro, K. do N., Sun, S. Y., & Borbely, A. U. (2021). Gestational trophoblastic neoplasia: Novelties and challenges. *Placenta*, 116, 38–42. <https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2021.02.013>
- Soininen, S. K., Repo, J. K., Karttunen, V., Auriola, S., Vähäkangas, K. H., & Rupunen, M. (2015). Human placental cell and tissue uptake of doxorubicin and its liposomal formulations. *Toxicology Letters*, 239(2), 108–114. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2015.09.011>
- Soper, J. T. (2021). Gestational Trophoblastic Disease: Current Evaluation and Management. *Obstetrics and Gynecology*, 137(2), 355–370. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000004240>

- Sotto, A., Irannejad, H., Eufemi, M., Mancinelli, R., Abete, L., Mammola, C. L., Altieri, F., Mazzanti, G., & di Giacomo, S. (2020). Potentiation of Low-Dose Doxorubicin Cytotoxicity by Affecting P-Glycoprotein through Caryophyllane Sesquiterpenes in HepG2 Cells: an in Vitro and in Silico Study. *International Journal of Molecular Sciences*. 21 (2). <https://doi.org/10.3390/IJMS21020633>
- Wang, Y., Wang, Z., Zhu, X., Wan, Q., Han, P., Ying, J., & Qian, J. (2022). Intestinal metastasis from choriocarcinoma: a case series and literature review. *World Journal of Surgical Oncology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/S12957-022-02623-0>
- Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z. C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, 39(1).

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“PKR kinaz aktivasyonunun koryokarsinom hücrelerinde kemoterapötik ajana duyarlılığına etkisi” başlıklı Yüksek Lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Büşra BİLEN
Öğrencinin Adı ve Soyadı
07 / 08 / 2023

ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı, Adı : BİLEN Büşra

Uyruk : T.C.

Yabancı dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Y. Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD	Devam ediyor
Lisans	Bursa Uludağ Üniversitesi Fen/Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü	2019