

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SELEKTİF RXR LİGANDI BEKSAROTEN'İN
TİROİD KANSER HÜCRE HATLARI ÜZERİNE
ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

PINAR DAŞIYICI

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2013

TEZ KODU: DEU.HSI-MSc-2009970212

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SELEKTİF RXR LİGANDI BEKSAROTEN'İN
TİROİD KANSER HÜCRE HATLARI ÜZERİNE
ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

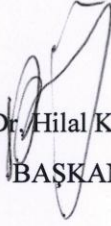
PINAR DAŞIYICI

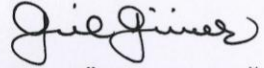
Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Hilal KOÇDOR

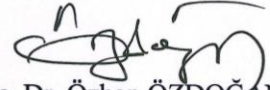
Projemiz Tıbbi Bilimsel Aktiviteleri Destekleme Derneği tarafından desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI-MSc-2009970212

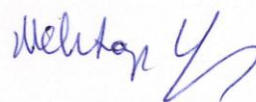
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim
Dalı Yüksek Lisans programı öğrencisi Pınar Daşyıcı, "Selektif RXR Ligandı
Beksaroten'in Tiroid Kanseri hücre hatları üzerine etkinliğinin incelenmesi"
konulu Yüksek Lisans tezini 30/04/2013 tarihinde başarılı olarak
tamamlamıştır.


Doç. Dr. Hilal KOÇDOR
BAŞKAN


Prof. Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN
ÜYE


Doç. Dr. Özhan ÖZDOĞAN
ÜYE


Yrd. Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR
ÜYE


Yrd. Doç. Dr. Mehtap Yüksel EĞRİLMEZ
ÜYE

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER	i
TABLO DİZİNİ.....	iii
ŞEKİL DİZİNİ	iv
KISALTMALAR.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	5
1.2. Araştırmanın Amacı	6
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	6
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Tiroid Bezinin Yapısı	7
2.1.1. Tiroid Bezinin Anatomisi	7
2.1.2. Tiroid Bezinin Histolojisi	7
2.1.3. Tiroid Bezinin Fizyolojisi.....	8
2.2. Tiroid Kanseri.....	13
2.2.1. Tiroid Kanseri insidansı ve epidemiyolojisi.....	13
2.2.2. Tiroid Kanserlerinin etiyolojisi	14
2.2.3. Tiroid Tümörlerinin Sınıflaması.....	16
2.2.3.1. Diferansiye Tiroid Kanserleri.....	17
2.2.3.1.1. Papiller Tiroid Kanserleri	17
2.2.3.1.2. Foliküler Tiroid Kanserleri.....	18
2.2.3.1.3. Az Diferansiye Tiroid Karsinomları.....	19
2.2.3.1.4. Anaplastik Tiroid Kanserleri	19
2.2.3.1.5. Medüller Tiroid Kanserleri.....	19
2.2.4. Tiroid Tümörlerinde Evreleme Sistemleri.....	20
2.2.5. Tiroid kanserlerinde hücre döngüsü ve apoptoz çalışmaları	23
2.2.6. Tiroid Kanserlerinde Tedavi stratejileri	24
2.2.6.1. Retinoidler	24
2.2.6.1.1. Selektif RXR Ligandı Beksaroten	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1. Araştırmanın Tipi	30
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	30
3.3. Çalışma Materyali	30
3.4. Araştırmanın Değişkenleri.....	30

3.5. Veri Toplama Araçları.....	31
3.5.1. Kullanılan Cihazlar.....	31
3.5.2. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Diğer Gereçler.....	32
3.5.3. Uygulanan Yöntemler.....	33
3.5.3.1. Hücre Kültürü.....	33
3.5.3.1.1. Hücre Hattı Özellikleri.....	33
3.5.3.1.2. Hücrelerin Kültürde İdamesi.....	33
3.5.3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması.....	34
3.5.3.1.4. Hücrelerin Dondurulması.....	34
3.5.3.1.5. Hücrelerin Çözülmesi.....	35
3.5.3.1.6. Hücrelerin Sayılması.....	35
3.5.3.2. Hücre Canlılık Testi.....	35
3.5.3.2.1. Yöntemin Prensibi.....	35
3.5.3.2.2. Beksaroten Çözeltilerinin Hazırlanması.....	36
3.5.3.2.3. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü.....	37
3.5.3.3. Akım Sitometrik Analizler.....	38
3.5.3.3.1. Apoptoz Analizi (Annexin V Yöntemi).....	38
3.5.3.3.1.1. Yöntemin Prensibi.....	38
3.5.3.3.1.2. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü.....	39
3.5.3.3.2. Hücre Döngüsü Analizi.....	39
3.5.3.3.2.1. Yöntemin Prensibi.....	39
3.5.3.3.2.2. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü.....	40
3.6. Araştırma Planı ve Takvimi.....	42
3.7. Verilerin Değerlendirilmesi.....	43
3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	43
3.9. Etik Kurul Onayı.....	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. Hücre Canlılık Testi Bulguları.....	44
4.2. Akım Sitometrik Analiz Bulguları.....	52
4.2.1. Apoptoz Analizi Bulguları.....	52
4.2.1.1. BCPAP Hücre Hattı Apoptoz Analizi Bulguları.....	53
4.2.1.2. CGTH-W-1 Hücre Hattı Apoptoz Analizi Bulguları.....	55
4.2.1.3. 8505C Hücre Hattı Apoptoz Analizi Bulguları.....	57
4.2.1.4. CAL-62 Hücre Hattı Apoptoz Analizi Bulguları.....	59
4.2.2. Hücre Döngüsü Analizi Bulguları.....	61
4.2.2.1. BCPAP Hücre Hattı Hücre Döngüsü Analizi Bulguları.....	61
4.2.2.2. CGTH-W-1 Hücre Hattı Hücre Döngüsü Analizi Bulguları.....	62
4.2.2.3. 8505C Hücre Hattı Hücre Döngüsü Analizi Bulguları.....	64
4.2.2.4. CAL-62 Hücre Hattı Hücre Döngüsü Analizi Bulguları.....	66
5. TARTIŞMA.....	68
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	73
7. KAYNAKLAR.....	74
8. EKLER.....	86

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 2.1. WHO Tiroid Tümörlerinin Histolojik Sınıflaması (2004)	16
Tablo 2.2. Tiroid Kanseri için TNM Sınıflaması	22
Tablo 2.3. TNM Evrelemesi	23
Tablo 3.1. Projede kullanılan makine ve teçhizat listesi	31
Tablo 3.2. Projede kullanılan sarf malzemeler ve diğer gereçler	32
Tablo 3.3. Hücre hatları ve Hücre kültürü ortam içerikleri	33
Tablo 3.4. Hücre Canlılık testi-96 kuyucuklu kültür kabındaki doz dağılımı	37
Tablo 3.5. Akım Sitometrik analizlerde hücre hatları için oluşturulan gruplar	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Tiroid bezi anatomisi	7
Şekil 2.2. Tiroid bezinin histolojik görüntüsü.....	8
Şekil 2.3. Tiroid hormon sentezinin fizyolojisi.....	9
Şekil 2.4. Tiroid hormon reseptörü çalışma mekanizması	11
Şekil 2.5. Tiroid hormon regülasyonuna genel bakış.....	12
Şekil 2.6. Retinoik asitlerin etki mekanizması.....	25
Şekil 2.7. Bekсарoten'in etki mekanizması	26
Şekil 2.8. Hücre döngüsü aşamaları ve kontrol noktaları	27
Şekil 3.1. WST-8'in formazana indirgenme mekanizması	36
Şekil 4.1. BCPAP hücre hattı 24 saatlik doz-hücre canlılık oranı eğrisi	44
Şekil 4.2. BCPAP hücre hattı 48 saatlik doz- hücre canlılık oranı eğrisi	45
Şekil 4.3. BCPAP hücre hattı 72 saatlik doz- hücre canlılık oranı eğrisi	45
Şekil 4.4. BCPAP hücre hattı 96 saatlik doz- hücre canlılık oranı eğrisi	46
Şekil 4.5. CGTH-W-1 hücre hattı 24 saatlik doz- hücre canlılık oranı eğrisi.....	46
Şekil 4.6. CGTH-W-1 hücre hattı 48 saatlik doz- hücre canlılık oranı eğrisi.....	47
Şekil 4.7. CGTH-W-1 hücre hattı 72 saatlik doz- hücre canlılık oranı eğrisi.....	47
Şekil 4.8. CGTH-W-1 hücre hattı 96 saatlik doz- hücre canlılık oranı eğrisi.....	48
Şekil 4.9. 8505C hücre hattı 24 saatlik doz- hücre canlılık oranı eğrisi	48
Şekil 4.10. 8505C hücre hattı 48 saatlik doz- hücre canlılık oranı eğrisi	49
Şekil 4.11. 8505C hücre hattı 72 saatlik doz- hücre canlılık oranı eğrisi	49
Şekil 4.12. 8505C hücre hattı 96 saatlik doz- hücre canlılık oranı eğrisi	50
Şekil 4.13. CAL-62 hücre hattı 24 saatlik doz- hücre canlılık oranı eğrisi.....	50
Şekil 4.14. CAL-62 hücre hattı 48 saatlik doz- hücre canlılık oranı eğrisi.....	51
Şekil 4.15. CAL-62 hücre hattı 72 saatlik doz- hücre canlılık oranı eğrisi.....	51
Şekil 4.16. CAL-62 hücre hattı 96 saatlik doz- hücre canlılık oranı eğrisi.....	52
Şekil 4.17. BCPAP hücre hattı akım sitometrik apoptoz analizi bulguları	53
Şekil 4.18. BCPAP hücre hattı akım sitometrik apoptoz analizi bulguları grafiği	54
Şekil 4.19. CGTH-W-1 hücre hattı akım sitometrik apoptoz analizi bulguları	55
Şekil 4.20. CGTH-W-1 hücre hattı akım sitometrik apoptoz analizi bulguları grafiği.....	56

Şekil 4.21. 8505C hücre hattı akım sitometrik apoptoz analizi bulguları	57
Şekil 4.22. 8505C hücre hattı akım sitometrik apoptoz analizi bulguları grafiği	58
Şekil 4.23. CAL-62 hücre hattı akım sitometrik apoptoz analizi bulguları	59
Şekil 4.24. CAL-62 hücre hattı akım sitometrik apoptoz analizi bulguları grafiği.....	60
Şekil 4.25. BCPAP hücre hattı hücre döngüsü analizi bulguları	61
Şekil 4.26. BCPAP hücre hattı hücre döngüsü analizi bulguları grafiği.....	62
Şekil 4.27. CGTH-W-1 hücre hattı hücre döngüsü analizi bulguları.....	63
Şekil 4.28. CGTH-W-1 hücre hattı hücre döngüsü analizi bulguları grafiği	63
Şekil 4.29. 8505C hücre hattı hücre döngüsü analizi bulguları	64
Şekil 4.30. 8505C hücre hattı hücre döngüsü analizi bulguları grafiği.....	65
Şekil 4.31. CAL-62 hücre hattı hücre döngüsü analizi bulguları.....	66
Şekil 4.31. CAL-62 hücre hattı hücre döngüsü analizi bulguları grafiği	67

KISALTMALAR DİZİNİ

RXR	Retinoid X Reseptör
RAR	Retinoik Asit Reseptör
TSH	Tiroid Uyarıcı Hormon
T3	Triiyodotironin
T4	Tiroksin
NIS	Sodyum iyot Kotransport proteini
TPO	Tiroid peroksidaz
MIT	Mono-iyodotirozin
TSHR	TSH-Reseptörü
Tg	Tiroglobulin
TBG	Tiroksin Bağlayan Globulin
TBPA	Tiroksin Bağlayan Prealbümin
ATP	Adenozin Trifosfat
TR	Tiroid Hormon Reseptörleri
DNA	Deoksiribonükleik Asit
TRE	Tiroid Yanıt Element
TRH	Tirotropin Salgılatıcı Faktör
TK	Tirozin kinaz
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
RB	Retinoblastom
TGF- α	Transforme Edici Büyüme Faktörü-alfa
TRK	Tirozin Kinaz Reseptörü
MAP Kinaz	Mitojen Aktive Protein Kinaz
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
MEN	Çoklu (Multiple) Endokrin Neoplazi
CEA	Karsinoembriyogenik antijen
ACTH	Adrenokortikotropik Hormon
VIP	Vazoaktif İntestinal Peptid
TNM	Tümör-Nod-Metastaz
BT	Bilgisayarlı Tomografi
MR	Manyetik Rezonans Görüntüleme
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
TGF- β	Transforme Edici Büyüme Faktörü- β
RAI	Radyoaktif İyot Tedavisi
PPAR	Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptörler
RARE	Retinoik Asit Yanıt Element
CDK	Siklin-Bağımlı Kinaz

IGFBP	İnsülin Benzeri Büyüme Faktör Bağlayan Protein
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
TRAIL	Tümör Nekroz Faktör-ilışkili Apoptoz indükleyici Ligand
PARP	Poli-ADP-Riboz Polimeraz
IAP	Apoptoz Protein inhibitör
CTCL	Kutanöz T-Hücreli Lenfoma
AML	Akut Miyeloid Lösemi
MDR	Çoklu İlaç Direnci
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörleri
PDGF	Platelet-türevli Endotelyal Büyüme Faktörü
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
PS	Fosfatidilserin
PI	Propidyum iyodür
FITC	Fenil izotiyosiyanat

TEŞEKKÜR

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimim süresince bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan Danışman hocam Doç. Dr. Hilal KOÇDOR, tüm değerli hocalarım ve tüm Sağlık Bilimleri Enstitüsü ailesine, Tezimin yazım aşamasında yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR ve Yrd. Doç. Dr. Mehtap YÜKSEL EĞRİLMEZ'e;

Akım Sitometrik analizlerin gerçekleştirilmesinde Uzm. Dr. Halil ATEŞ'e;

Moleküler Tıp Anabilim Dalı başkanımız; duruşu, kişiliği, başarıları ile hepimiz için örnek teşkil eden değerli hocamız Prof. Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN'a, Anabilim Dalımızın bugünlere gelmesinde verdiği emekler ve katkıları için teşekkür ederim.

Tezimin laboratuvar çalışmaları gerçekleştirebilmek için olanak sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı ve Hematoloji Anabilim Dalı'nın çok değerli öğretim üyelerine ve tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimim süresince birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli yol arkadaşım Fırat SOYARAT'a, bana her konuda destek olan ve güzel bir arkadaşlık ortamı yaratan başta Dr. Yasemin SAYGIDEĞER KONT olmak üzere tüm yakınlarıma teşekkür ediyorum.

İstatistiksel analizlerin gerçekleştirilmesinde bana yardımcı olan Ege Üniversitesi Fen Fakültesi İstatistik Bölümü Öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Hakan Savaş SAZAK ve değerli arkadaşım Nida DEMİRÇAK'a teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında bana destek olan özverili ailem ve eşime hayatıma kattıkları anlamdan dolayı teşekkür ederim.

Pınar DAŞIYICI

SELEKTİF RXR LİGANDI BEKSAROTENİN TİROİD KANSERİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Pınar DAŞIYICI, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı,
pinarkemanli@hotmail.com, pinarkemanli@gmail.com

ÖZET

Tiroid kanseri, dünyada tüm kanser tiplerinin yaklaşık olarak %1'ini oluşturmakla birlikte endokrin sistemin en sık görülen malignitesidir. Son dekatlarda görülme sıklığı en hızlı artan kanserlerden birisidir ve etkili tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Vitamin A'nin biyolojik türevleri olan retinoidler, hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz gibi hücre davranışlarını düzenleyici rol oynamaktadırlar. Etkilerini, retinoik asit reseptörleri (RAR) ve retinoid X reseptörleri (RXR) olarak adlandırılan hücre içi reseptörlere bağlanarak gösterirler.

Selektif RXR ligandı Beksaroten (LGD1069) 'in, Kutanöz T-hücre lenfoma (CTCL)'da tedaviye tepkisiz hastaların yanıtını, minimal toksisite ile %50 artırdığı ve solid tümörlerde migrasyon, invazivite ve anjiogenezi azalttığı saptanmış ve FDA tarafından CTCL tedavisinde 2000 yılında onaylanmıştır.

Çalışmamızda; beksarotenin diferansiye ve andiferansiye özellikli olan BCPAP (insan papiller tiroid karsinomu), CGTH-W-1 (insan foliküler tiroid karsinomu sternal metastaz), 8505C (insan andiferansiye-anaplastik tiroid karsinomu) ve CAL-62 (insan anaplastik tiroid karsinomu) hücre hatlarında, hücre canlılığı, hücre döngüsü, apoptoz ve nekroz üzerine olası etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Hücre hatları uygun koşullarda kültüre edildi ve hücre canlılık testi CCK-8 kullanılarak her hücrenin beksaroten ajanı ile hücre canlılığının %50'sini inhibe eden doz (IC_{50}) belirlendi. IC_{50} dozları, BCPAP hücre hattında 34 μ M, CGTH-W-1 hücre hattında 50 μ M, 8505C hücre hattında 48 μ M ve CAL-62 hücre hattında 46 μ M olarak saptandı.

Hücrelerin canlılığının %50'sini inhibe eden doz en düşük olarak papiller tiroid kanseri hücre hattı olan BCPAP hücrelerinde, en yüksek olarak ise metastatik foliküler tiroid kanseri hücre hattı CGTH-W-1 hücrelerinde saptandı.

Belirlenen IC₅₀ dozları ile hücrelerde akım sitometrik olarak apoptoz ve hücre döngüsü analizleri gerçekleştirildi. 48 saatlik beksaroten uygulamasından sonra elde edilen bulgular, beksarotenin 8505C hücrelerini hücre döngüsünün sentez fazında tutulumunu istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalttığını, 8505C ve CAL-62 hücrelerinin Sub-G1 fazında tutulumunu anlamlı olarak artırdığını göstermiştir (p<0,05). Apoptoz analizleri, beksaroten bileşiğinin, çalışmada ele alınan hücre hatlarında canlılık oranını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalttığını, apoptotik ve nekrotik hücre ölümü oranlarını artırdığını göstermektedir (p<0,05).

Sonuç olarak *in vitro* çalışmamızda, beksaroten ajanının diferansiye ve andiferansiye tiroid kanseri hücre hatları olan BCPAP, CGTH-W-1, 8505C ve CAL-62 hücreleri üzerine hücre canlılığını azaltıcı, hücre döngüsünü durdurucu, apoptotik ve nekrotik hücre ölümünü artırıcı yönde etkinliği gösterilmiştir. Bulgularımız eşliğinde *in vitro* çalışmamız ileri *in vivo* çalışmalara ışık tutacaktır.

Anahtar sözcükler: Tiroid Kanseri Hücre Hattı, Kemoprevansiyon, Reksinoid, Beksaroten, Apoptoz, Hücre Döngüsü

INVESTIGATION ON THE EFFECTS OF SELECTIVE RXR LIGAND BEXAROTENE ON THYROID CANCER CELL LINES

Pınar DAŞIYICI, Dokuz Eylül University, Health Science Institute, Department of Molecular Medicine,
pinarkemanli@hotmail.com pinarkemanli@gmail.com

ABSTRACT

Thyroid cancer is the most common malignant tumor of the endocrine system and accounts for approximately 1% of all newly diagnosed cancer cases. It has been one of the most rapidly increasing cancer type in recent years. Effective therapies are urgently needed.

Retinoids are biological derivatives of vitamin A and they have regulatory effects on cell proliferation, differentiation and apoptosis. Retinoids bind to their inner cell receptors, retinoic acid receptors (RARs) and retinoid X receptors (RXRs).

Selective RXR ligand, Bexarotene (LGD1069) was shown to increase the clinical responses of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) patients refractory to treatment by 50% with minimum toxicity. Bexarotene was also demonstrated to decrease migration, invasion and metastasis of solid tumors. It was approved by FDA in the treatment of CTCL in January 2000.

In this study, the human papillary thyroid carcinoma (BCPAP), human follicular thyroid carcinoma originated from sternal metastasis (CGTH-W-1), human undifferentiated-anaplastic thyroid carcinoma (8505C) and human anaplastic thyroid carcinoma (CAL-62) cell lines were studied. We aimed to investigate the effects of bexarotene on cell viability, cell cycle, apoptosis and necrosis on these differentiated and undifferentiated thyroid cancer cell lines.

The cell lines were cultured and grown as recommended. The cells were treated with different concentrations of bexarotene. The concentration of bexarotene inhibiting 50% of the cell viability (IC_{50}) was determined by using CCK-8 assay. IC_{50} values are 34 μ M in BCPAP cell line, 50 μ M in CGTH-W-1 cell line, 48 μ M in 8505C cell line and 46 μ M in CAL-62 cell line.

The cells were treated with IC₅₀ values of bexarotene and the ratio of the cells that undergo apoptosis and arrested in different phases of cell cycle were analysed by flow cytometry.

After 48-hour treatment of bexarotene, our results showed that the cell ratio arrested in S phase was significantly reduced in 8505C cell line while the cell ratio arrested in Sub-G1 phase was considerably increased when compared to the control group in 8505C and CAL-62 cell lines ($p < 0,05$).

The results of apoptosis analysis demonstrated that bexarotene increased the apoptotic and necrotic cell death significantly in these cell lines ($p < 0,05$).

In conclusion, our *in vitro* study suggests that bexarotene has the ability to decrease cell viability, arrest cell cycle in Sub-G1 phase, trigger cells to apoptotic and necrotic cell death in differentiated and undifferentiated thyroid cancer cell lines. The present work will provide new insights into the future *in vivo* studies.

Keywords: Thyroid Cancer Cell Line, Chemoprevention, Rexinoid, Bexarotene, Apoptosis, Cell Cycle

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Tiroid kanseri, dünyada tüm kanser tiplerinin yaklaşık olarak %1'ini oluşturmakla birlikte endokrin sistemin en sık görülen malignitesidir (1,2). Son dekatlarda görülme sıklığı ABD ve diğer ülkelerde en hızlı artan kanserlerden birisidir. En sık genç ve orta yaşlı erişkinlerde görülür ve kadınlarda erkeklere oranla 3-4 kat daha sıktır (3).

Tiroid bezi, iyodu kullanarak tiroksin ve triiyodotironin sentezleyen folikül hücreleri ve kalsitonin sekrete eden parafoliküler hücreler olmak üzere iki değişik epitelyum içermektedir. Diferansiye tiroid kanserleri (papiller ve foliküler) yavaş büyüme eğiliminde ve prognozları oldukça iyidir. Andiferansiye (anaplastik) tiroid kanserleri ise daha nadir görülür, ancak kısa süre içinde fatal seyrederler. Tiroid kanserlerinin çoğunluğu diferansiye histolojik özellikler göstermekte olup en sık görülen tipi papiller tiroid kanserleri (%80)'dir (4).

Vitamin A'nin biyolojik türevleri olan Retinoidler, hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz gibi hücre davranışlarını düzenleyici rol oynamaktadırlar. Etkilerini, Retinoik Asit Reseptörleri (RAR) ve Retinoid X Reseptörleri (RXR) olarak adlandırılan hücre içi reseptörlere bağlanarak gösterirler (5).

Tiroid kanseri ile ilgili *in vitro* çalışmalarda, retinoidlerin farklılaşma belirteçlerinin ifadesinde düzenleme rolü olması bakımından etkili olduğu belirtilmiştir (6). Tiroid kanser dokuları ve hücre hatlarında RAR ve RXR gen ifadelerinde farklılıklar olduğu gösterilmesi, bu reseptörlerin ligandlarının yanıtının buna bağlı olarak değişebileceğini düşündürmüştür (7,8). RXR gen ifadesi ile retinoid yanıtı arasındaki ilişkinin önemi daha sonra, Haugen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada gösterilmiştir (8). Bu çalışmada, RAR ve RXR gen ifadelerine göre, hücre büyümesi baskılanması bakımından retinoid yanıtı değişmektedir.

Beksaroten, Spesifik sentetik RXR ligandı olup, hayvan çalışmalarında minimal toksisite ile meme tümör gelişimini RXR'lerini aktive ederek (9); ileri meme ve prostat kanserleri ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri gibi tümörlerde edinilmiş ilaç direncini genomik bütünlüğü koruyarak baskıladığı belirlenmiştir (10,11,12). Beksaroten'in, T-hücre lenfomada tedaviye tepkisiz hastaların yanıtını, minimal toksisite ile %50 artırdığı ve solid tümörlerde migrasyon, invazivite ve anjiogenezi azalttığı da saptanmıştır (13).

Anaplastik tiroid kanseri özellikli ARO, FRO ve DRO hücre hatlarında yapılan çalışmada Beksaroten, DRO hücre hattında hücre büyümesi üzerine baskılayıcı etki gösterirken, ARO ve FRO hücre hatlarında hücre büyümesi üzerine anlamlı etki göstermemiştir (14).

Tüm bu çalışmalar, Beksarotenin hücre döngüsünü durdurma, apoptotik ve nekrotik hücre ölümünü artırma, metastaz üzerine inhibe edici etki göstererek umut verici kemoprevantif bir ajan olduğuna işaret etmektedir. Ancak, Beksarotenin diferansiye, andiferansiye ve anaplastik tiroid kanseri hücre hatları BCPAP, CGTH-W-1, 8505C ve CAL-62 hücre hatlarında araştırıldığına dair literatür mevcut değildir. Çalışmamızda, ele alınan hücre hatları üzerinde Beksaroten bileşiğinin hücre canlılığı, hücre döngüsü, apoptoz ve nekroz üzerine olası etkilerinin incelenmesi hedeflenmektedir.

1.2. Araştırmanın Amacı

Çalışmanın amacı; RXR selektif ligandı Beksarotenin diferansiye ve andiferansiye özellikli foliküler, papiller ve anaplastik tiroid kanser tiplerinde, hücre canlılığı, hücre döngüsü, apoptoz ve nekroz üzerine olası etkilerinin incelenmesidir.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

H 1: Beksaroten, BCPAP, CGTH-W-1, 8505C ve CAL-62 tiroid kanseri hücrelerinin canlılığını azaltmaktadır.

H 2: Beksaroten, diferansiye ve andiferansiye tiroid kanseri hücrelerinin hücre döngüsünü durdurucu etki göstermektedir.

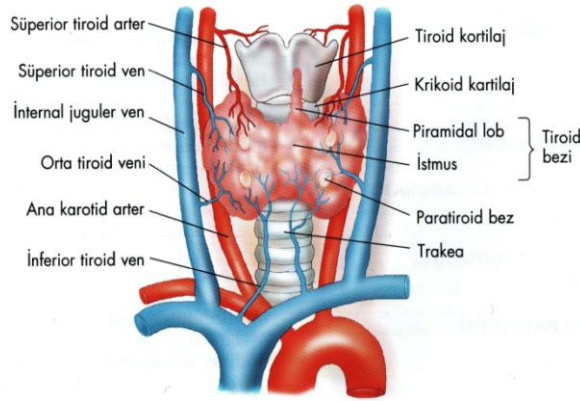
H 3: Beksaroten, diferansiye ve andiferansiye tiroid kanseri hücrelerini apoptotik ya da nekrotik hücre ölümüne yönlendirerek bu tip kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.TİROİD BEZİNİN YAPISI

2.1.1.Tiroid Bezinin Anatomisi

Tiroid bezi, en büyük endokrin organdır ve C5-T1 vertebralar arasında, boynun ön-alt kısmında, trakeanın ön yüzünde, larinksin altında ve tiroid ön grup kaslarının arkasına yerleşmiştir (15). Yenidoğanda yaklaşık 1,5 gram olan tiroid, 16 yaşına kadar yavaş yavaş büyür ve erişkin ağırlığı olan 15-20 grama ulaşır (16). Tiroid bezinin anatomisi Şekil 2.1 'de gösterildiği gibidir (17).

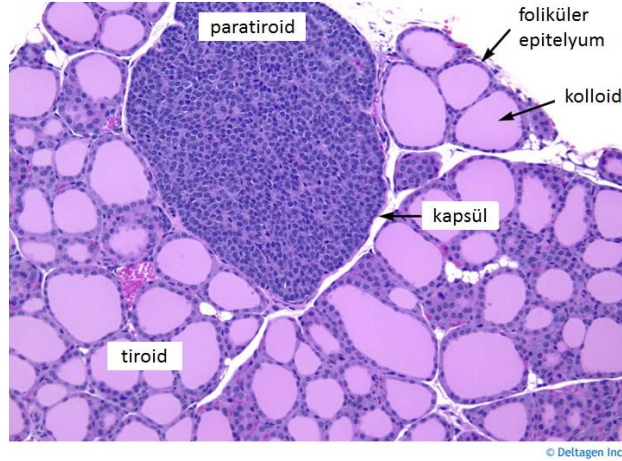


Şekil 2.1. Tiroid bezi anatomisi (17).

2.1.2.Tiroid Bezinin Histolojisi

Embriyonik gelişim sırasında dilin foramen çekum kısmından gelişip tiroglossal kanaldan geçerek fetal hayatın yaklaşık 7. haftasında erişkin yerine yerleşen tiroid bezini çevreleyen fibröz bir kapsül bulunmaktadır (18). Bu kapsül, parankim içine septalar gönderen gevşek bir bağ dokusudur ve bezi içerisinde lobüllerin oluşmasına yol açar.

Tiroid bezini histolojik olarak 3 bileşen oluşturur. Bunlar tirozit olarak adlandırılan foliküler hücreler, C hücreleri olarak adlandırılan parafoliküler hücreler ve stroma'dır. Dokuda jelatinimsi bir madde olan kolloid lümenini folikül hücreleri çevreler. Foliküller tiroid bezinin en küçük birimleri olup 2-40 sayıda folikül, lobülleri oluşturur (19,20). Tiroid bezinin histolojisi Şekil 2.2 'de gösterildiği gibidir (21).



Şekil 2.2. Tiroid bezinin histolojik görüntüsü (21).

2.1.3.Tiroid Bezinin Fizyolojisi

Tiroid dokusundan sentezlenen hormonlar 2 farklı endokrin sistemi etkilemektedir. Triiyodotironin (T3) ve Tetraiyodotironin (T4, Tiroksin) hormonları tiroid foliküler hücrelerinden sentezlenir. Kalsiyum metabolizmasında etkili olan kalsitonin hormonu parafoliküler hücrelerden sentezlenirken, tiroid bezinin posterolateralinde yerleşmiş olan paratiroid bezinden ise parathormon sentezlenir. Kalsitonin ve parathormon, vitamin D ile birlikte serum kalsiyum seviyesini düzenler (22).

Foliküler hücrelerden sentezlenen T3 ve T4 hormonları genel olarak metabolizmayı düzenleyen, büyüme, fetal gelişim gibi yaşamsal olguları etkileyen hormonlardır. Mitokondride oksidasyonu hızlandırır, hücrenin nükleus reseptörlerine bağlanarak protein ekspresyonunu düzenler, membranda yer alan bazı enzimlerin aktivitelerini kontrol ederler (23).

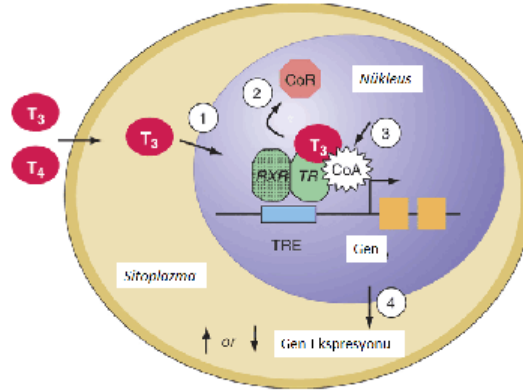
Tiroid hormon sentezi ekzojen iyot alımına bağlıdır. Oral yolla alınan iyot sindirim kanalında emilir ve çoğu böbreklerden hızla atılır. İyotun yaklaşık olarak 5'te 1'i tiroid hücreleri tarafından alınarak tiroid hormon sentezinde kullanılır. İyotun tiroid hücresi içine alınması "iyot yakalama" olarak adlandırılan enerji bağımlı bir mekanizmayı gerektirir. Bu mekanizma tiroid foliküler hücresi bazolateral membranında bulunan Sodyum-iyot kotransport (simport) proteini (NIS) tarafından gerçekleştirilir. Membranda bulunan sodyum-potasyum ATPaz'lar tarafından oluşturulan bir elektrokimyasal gradient enerjisi difüzyona karşı kullanılır ve bu şekilde NIS proteini dolaşımda bulunan iyotun yaklaşık olarak 20-40

Serbest hormon şeklinde dolaşıma katılan tiroid hormonlarının hemen tamamı plazma proteinlerine bağlanır. Tiroksin bağlayan globulin (TBG) molekülü tiroid hormonlarının büyük kısmını bağlarken diğer bir kısımda tiroksin bağlayan prealbümin (TBPA) ve Albümin molekülleri tarafından bağlanır. TBG molekülünün T4 hormonuna afinitesi T3 hormonuna göre yaş ve cinsiyetle değişmekle beraber genellikle oldukça yüksektir. Tiroid bezinden salgılanan hormonun %90'ı T4, %10'u ise T3 olmasına rağmen T4 molekülünün önemli bir bölümü kanda T3'e dönüştürülür. Bu durum T4'ün T3'e deiyodinasyonu olarak adlandırılır ve plazmada T3 miktarı T4 miktarına göre 10-20 kat daha düşük olsada T4'ten yaklaşık olarak 4 kat daha aktif bir hormon olduğundan bu dönüşüm çok önemlidir (29). TBG molekülünün yalnız tiroid hormon bağlaması ve yarı ömrünün yaklaşık olarak 5 gün olması plazma tiroid hormon seviyelerinin sabit tutulması açısından önemlidir. TBPA ve Albümin moleküllerinin tiroid hormonlarına afinitesi daha düşük olmasından dolayı daha az miktarda hormon bağlama kapasitesine sahiptirler. T3 ve T4 hormonları bağlı oldukları taşıyıcı proteinlerden ayrılarak plazma membranlarından doğrudan difüzyon yolu ile ya da hormon transportunu sağlayan plazma membran reseptörlerine bağlanarak ATP (Adenozin Trifosfat) bağımlı aktif transportla doku hücrelerine alınırlar. Yüksek plazma hormon seviyeleri ve taşıyıcı proteinlerin düşük afiniteleri, hormon sekresyonunun ya da metabolizmanın değiştiği durumlarda sabit bir tiroid hormon desteği sağlamaktadır (30).

Tiroid hormonunun hücre içine alımı doku spesifiktir ve farklı hücrelerin plazma membranlarında bulunan hormon reseptörleri tarafından kontrol edilmektedir (31). Söz konusu transport molekülleri son yıllarda "organik anyon" ya da "amino asit" transport molekülleri olarak kategorize edilmiştir. Tiroid hormonlarının hedef hücrelerdeki kontrol mekanizmalarından bir tanesi iyot alım ve kullanım kapasitesi olmakla beraber bir diğer mekanizma ise hedef hücre içi tiroid hormon seviyelerini kontrol eden ve "iyodotironin deiyodinaz" olarak adlandırılan enzimler tarafından sağlanmaktadır (32,33,34).

Tiroid hormonları etkisini hücre nükleusundaki tiroid hormon reseptörlerine bağlanarak gösterirler. Tiroid hormon reseptörleri (TR) dimer oluşturarak DNA'da hedef genlerin promotor bölgelerinde lokalize olan tiroid yanıt element (TRE)'e bağlanarak ekspresyonu düzenlerler (32). Böylece hedef hücre fonksiyonunu etkileyen belirli proteinlerin

ekspresyonları baskılanır ya da indüklenir. Tiroid hormon reseptörlerinin çalışma mekanizması Şekil 2.4.' de gösterilmektedir (35).



Şekil 2.4. Tiroid Hormon Reseptörü çalışma mekanizması.

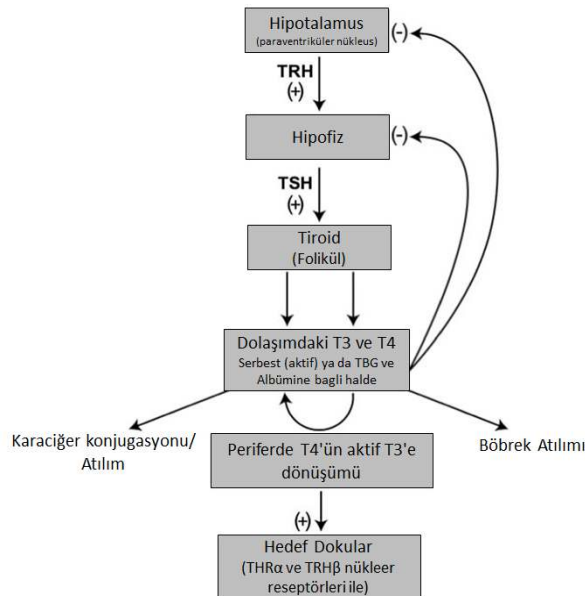
Tiroid Hormon Reseptörü (TR) ve Retinoid X Reseptörü (RXR), hedef genlerin promotor bölgelerindeki Tiroid hormon yanıt elementlerine (TRE) spesifik olarak bağlanabilmek için heterodimer oluşturur. Hormon yokluğunda, TR, gen ekspresyonunu susturan ko-represör (CoR) protein bağlıdır. Numaralar tiroid hormonuna yanıt olarak oluşan olayları belirtmektedir. 1) T4 ve T3 nükleusa girer; 2) T3 bağlanması ile CoR, TR'den ayrılır; 3) Koaktivatörler (CoA), T3-bağlı reseptörü aktive eder; 4) gen ekspresyonu değişir ve düzenlenir (35).

Tiroid hormon nükleer reseptörleri steroid ve Vitamin D reseptörlerinin de içeren nükleer hormon reseptör süperailisi üyesinden olmakla beraber oldukça korunmuş hormon ve DNA bağlanma bölgeleri bulunur (22).

Tiroid bezinde hormon sentezinin uyarımında en etkili faktör TSH'dur ve hastalık, açlık, soğuk gibi koşullar altında tiroid hormon gereksiniminin karşılanması amacıyla hipotalamus-hipofiz-tiroid ekseninden oluşan son üründür. Bu kontrol döngüsü tirotropin salgılatıcı faktör (TRH) 'ün hipotalamustan salgılanıp ön hipofizi uyarması ile başlar ve ön hipofiz bezinden bu uyarı ile TSH salgılanır. TSH salgısı sabah erken saatlerde ve akşam geç saatlerde oluşur ve tipik olarak pulsatil'dir. Tirositlerin bazal membranlarında bulunan TSH reseptörlerine bağlanıp adenilat siklaz'ı aktive ederek tiroid hormon sentezinin ve salınımının her adımının düzenlenmesini sağlayan bir kaskat etkisi oluşturur.

Artan T3 ve T4 seviyelerinde tiroid hormonlarının negatif geri besleme yolu ile hipotalamik hipofizer-tiroid eksenini inhibe edilerek TRH ve TSH salınımı azalır. Tiroid hormon üretimi serum iyot konsantrasyonu ile de artabilir. Membranda lokalize olmuş NIS

proteininin aktivitesinin azalması ile hücre içine iyot alımı azalır ve hormon sentezinde azalması ile hücrenin yeni plazma iyot seviyesine adaptasyonu sağlanmış olur. Bu etki "Wolff-Chaikoff" etkisi olarak adlandırılmaktadır (36).



Şekil 2.5. Tiroid Hormon regülasyonuna genel bakış.

2.2.TİROİD KANSERİ

2.2.1.Tiroid Kanserinin İnsidansı ve Epidemiyolojisi

Tiroid kanserleri endokrin kanserler arasında en sık görüleni olmakla beraber tüm kanser türlerinin yaklaşık olarak %1'ini oluşturmaktadır. ABD ve diğer ülkelerde görülme sıklığı son yıllarda artmaktadır ve son 3 dekatta ortalama olarak %50 oranında artış görülmektedir (39, 40, 41, 42). En sık genç ve orta yaşlı yetişkinlerde görülmekle beraber kadınlarda erkeklere oranla 2-4 kat daha sıktır. Yaş artışı ile birlikte bu oran azalmakta, mortalite bakımından ise erkeklerde daha kötü prognoz görülmektedir. Pediatrik dönemde nadir görülür ve çocukluk dönemi malignitelerinin %3'ünü oluşturur (43).

Tiroid dokusunda 4 tip hücre bulunmaktadır. Bu hücreler, tiroid hormonunun üretilip salgılandığı tiroid foliküler hücreleri, kalsitonin salgısından sorumlu parafoliküler hücreler, bağ dokusu ve bağışıklık sistemi hücreleridir. Primer maligniteye neden olabilecek bu hücre tiplerinden foliküler hücreler iyi diferansiye, az diferansiye ve andiferansiye tiroid karsinomlarına, parafoliküler hücreler medüller tiroid karsinomlarına, bağışıklık sistemi hücreleri lenfomalara ve bağ dokusu hücreleri sarkomlara yol açmaktadır (44).

Foliküler hücrelerden oluşan Foliküler ve Papiller Tiroid karsinomları diferansiye tiroid tümörleri olup hücrenin diferansiye özelliklerini taşımaktadırlar. İnvasyon, metastaz ve rekürrens özellikleri bakımından diğer tiroid tümörlerinden ayrılarak "iyi diferansiye" olarak bahsedilirler. Sağlıklı tiroositlerdeki gibi tiroglobulin molekülünü eksprese edebilirler, NIS proteini barındırarak hücre içine iyot alımını gerçekleştirebilirler. Bu sayede radyoaktif iyot tedavisine yanıt verebilmektedirler. Bu hastalarda sağkalım oranı ortalama olarak %90 düzeyinde olmasının yanı sıra; hastaların %5-24'ünde rekürrens görülebilmektedir. Rekürren ve metastatik hastalık oluşan olguların yaklaşık olarak %20-30'unda iyot yakalama yeteneği kaybolduğundan, bu özellik temel alınarak gerçekleştirilen radyoiyot tedavisi yanıt verememektedir (45).

Anaplastik tiroid kanserleri ise diferansiye özelliklerini kaybettiklerinden andiferansiye tiroid tümörleri olarak adlandırılıp agresif seyirleri dolayısı ile kötü prognozla ilişkilendirilmiştir.

Majör fenotipik özellikler bakımından medüller tiroid karsinomlarında nöroendokrin aktivasyonlar, az diferansiye ya da andiferansiye tiroid karsinomlarında yüksek mitoz oranı ve anaplastik özellikler, papiller tiroid kanserlerinde özgün nükleer yapılar, foliküler kanserlerde invazyon gibi özellikler baskındır (46).

Tiroid bezine klinik olarak önem arz eden metastazların primer dokuları; meme, akciğer, larenks, kolon karsinomları, renal hücreli karsinom ve malign melanomlardır (44).

2.2.2.Tiroid Kanserinin Etiyolojisi

Tiroid kanserleri etiyopatogenezinde ilk sırada eksternal olarak radyasyona maruziyet bulunmaktadır. Bu ilişki ilk olarak Duff ve Fitzgerald tarafından 1956 yılında tanımlanmıştır (47). Radyasyon DNA kırıklarına yol açmakta ve en sık papiller, daha sonrada foliküler tiroid tümör oluşumunda etkili olmaktadır (48). Winship ve Rosvoll yaptıkları çalışmada tiroid kanserli çocukların %76'sında timik hiperplazi, skalp hemanjiomları ve adenoid vejetasyon gibi nedenlerle radyasyon öykülerinin olduğunu göstermişlerdir (49). Radyasyona maruziyetin tiroid kanser oluşumunda etkisinin en önemli örneğini Çernobil felaketi oluşturmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalar sıklıkla çocukluk çağı tiroid tümör oluşumuna neden olduğunu göstermektedir (50).

Tiroid kanserleri etiyopatogenezinde etkili mutasyonlar tanımlanmıştır. Mutasyonlar herediter geçişli ya da sonradan oluşan mutasyonlardır. RET onkogeni Takahashi tarafından 1985 yılında onkogen olarak tanımlanmış, 10q11.2 bölgesinden elde edilen ve 21 eksonu bulunan bir gen bölgesidir. Tirozin kinaz (TK) reseptörünü kodlayan bu gen bölgesi ve reseptör kinaz protoonkogenlerinin gen düzenlenmeleri papiller histotip için spesifik olarak gösterilmektedir. Bu gen bölgelerinde inversiyon ve translokasyon, papiller tip kanserlerde saptanmaktadır. RET-TK bölgesi genlerinden RET-PTK onkogeni oluşur (42). RET-PTK düzenlemelerin yanı sıra PAX8/PPAR γ gibi kromozomal yeniden düzenlenmeler ve ras, BRAF genlerinde nokta mutasyonları da özellikle diferansiye tiroid tümörleri ile ilişkilendirilmiştir (51,52). Tümör baskılayıcı genlerden genomun gardiyanı olarak adlandırılan p53 gen ürününün her iki allelinde görülen mutasyon sıklıkla andiferansiye özellik gösteren anaplastik tiroid kanserleride saptanmıştır (53). RB (retinoblastom) tümör baskılayıcı geninde mutasyon ya da delesyon tiroid tümörlerinde görülmektedir (54). PAX8/PPAR γ yeniden düzenlenmeleri foliküler tiroid kanser tiplerinde malign fenotiple ilişkili bulunmuştur (55).

Diyet, tiroid kanser gelişiminde diğer kanser türlerinde olduğu gibi önemli rol oynamaktadır. Özellikle beslenmede iyot yetersizliği, yapılan deneysel hayvan çalışmalarında

başlangıçta foliküler hiperplazi, daha sonra da adenom gelişiminde artış olduğunu ortaya koymuştur (56).

Endemik guatr bölgelerinde papiller tiroid kanseri oranının daha düşük, foliküler tiroid kanserlerinin ise daha yüksek olduğu bulunmuştur (57). İsviçre ve Paraguay'da iyot yetersizliğinden dolayı yaygın olan endemik guatr için iyodinizasyon programları yapılmış, ve bunun sonrasında foliküler ve anaplastik kanser görülme oranlarında azalış, papiller tiroid kanser görülme oranlarında artış saptanmıştır. Bu çalışmaların yanı sıra Norveç, Hawaii ve kuzey İtalyada da yapılan araştırmalar diyetle alınan iyot miktarındaki artışın tiroidit ve papiller tiroid kanser görülme sıklığında artışa yol açtığını göstermektedir (58). İyot eksikliğinde kronik TSH uyarısının yol açtığı tiroid dokusun hiperplazisinin uzun süre tedavi alınmadığı durumlarda olası karsinogenez risk faktörü olduğu öne sürülmektedir (59).

Diğer hormonlar ve büyüme faktörleri de TSH gibi tiroid kanser etiyolojisinde önemli rol oynamaktadır. Tiroid kanserlerinin kadınlarda erkeklere göre özellikle reproduktif dönemde daha sık görülmesi dikkatleri hormonal faktörlerin üzerine çekmektedir. Gebelik sayısı, ilk gebelik yaşı, abortus, oral kontraseptif kullanımı ve fertilite problemleri olası nedenler arasında görülmektedir (60). Bununla birlikte, hormon replasman tedavisi ya da fertilite ilaçlarının risk artırmadığı yapılan bir çalışmada belirtilmiştir (61). Kontraseptif kullanımı ile de bir ilişki saptanmamıştır (62).

Tiroid kanserli olguların %3'ünde aile öyküsü bulunduğu ve genetik olarak aktarımının inkomplet otozomal dominant olduğu yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (63). Fokal ya da Diffüz Tiroiditler, Cowden hastalığı, Pendred Sendromu, Paratiroid Adenomu, Meme Kanseri, Ailesel Adenomatöz Polipozis, Gardner Sendromu, Papiller Renal Neoplazi ve Ailesel Medüller olmayan Tiroid Karsinomu gibi hastalıklar ile birlikte görülebilir (44).

Moleküler patogenezinde artmış büyüme faktörleri üretimi, sinyal adaptasyon moleküllerinin aktivasyonu, artmış hücre yüzey reseptörleri üretimi, DNA metilasyonu, genomik bütünlüğü kontrol eden nükleer proteinlerin inaktivasyonu, nükleer transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarında artış ve hücre yüzey adezyon moleküllerinin düşük ya da yüksek seviyelerde üretimleri gibi moleküler anomaliler tanımlanmıştır (64). DNA metilasyonu hem malign hemde benign tümör oluşumunda görülür (42). Diferansiye tiroid kanserlerinde insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve transforme edici büyüme faktörü-alfa (TGF- α) artmış düzeylerdedir. Özellikle papiller tiroid kanserlerinde hücre yüzey reseptörlerinden RET, TRK, c-erbB ve c-erbB2 düzeyleri yüksek bulunmuştur (65). Ras

protein aktivasyonu ise sinyal yollarından Mitojen Aktive Protein kinaz (MAP Kinaz) 'ı uyarak artmış proliferasyona, fenotipik diferansiyasyonda kayıplara ve kararsız genomik yapıya neden olur (64,65).

2.2.3.Tiroid Tümörlerinin Sınıflaması

Tirositlerden gelişen diferansiye tiroid kanserleri, gösterdikleri terminal diferansiyasyona yakınlık derecelerine göre "iyi diferansiye", "az diferansiye" ya da "andiferansiye" tümörler olarak tanımlanmaktadır. Parafoliküler hücrelerden ise medüller karsinom gelişmektedir. Tümörün patolojik özellikleri hastalığın prognozu açısından önemli bir göstergedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 'ne göre 2004 yılında düzenlenen tiroid tümörlerinin histolojik sınıflandırılması Tablo 2.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. WHO Tiroid Tümörlerinin Histolojik Sınıflaması (2004) (47).

Tiroid Kanserleri	Diğer Tiroid Tümörleri	Tiroid Adenomları ve İlişkili Tümörler
Papiller karsinom	Teratom	Foliküler adenom
Foliküler karsinom	Primer lenfoma ve Plazmasitom	Hiyelinizan trabeküler Tümör
Az diferansiye karsinom	Ektopik timoma	
Andifransiye (anaplastik) karsinom	Anjiosarkom	
Medüller karsinom	Düz kas tümörü	
Skuamöz hücreli karsinom	Periferik sinir kılıfı tümörü	
Mukoepidermoid karsinom	Paraganglioma	
Sklerozan epidermoid karsinom ile eozinofili	Soliter fibröz tümörler	
Müsinöz karsinom	Foliküler dendritik hücreli tümörler	
Medüller- foliküler mikst karsinom	Langerhans hücreli histiyositozis	
İğsi hücreli tümör ile timus benzeri diferansiyasyon	Sekonder tümörler (metastaz)	
Timus benzeri diferansiyasyon gösteren karsinom		

Bu sınıflamada, onkositik (Hürthle hücreli ya da oksifilik hücreli) tiroid kanseri yerine; onkositik özellik taşıyan papiller, foliküler, medüller ve az diferansiye tiroid karsinomlarının alt tiplerinden bahsedilmektedir (47).

2.2.3.1.Diferansiye Tiroid Kanseri

2.2.3.1.1.Papiller Tiroid Kanseri

Tüm Tiroid kanserlerinin %70-80'ini oluşturmaktadır (66). Genellikle 3. , 4. ve 5. dekatlarda ortaya çıkan papiller tiroid tümörleri toplumlara göre değişkenlik göstermekle beraber kadınlarda erkeklere oranla daha sık görülür (67). Çocukluk çağında radyasyona maruziyet sonrası görülen başlıca tiroid kanser tipidir. İyot açısından zengin bölgelerde yaşayan insanlarda siktir. Etiyolojisinde Ret onkogen aktivasyonu bulunmaktadır (68). Servikal lenf nodu yayılımına eğilimi olmasına rağmen düşük malignite potansiyeline sahiptir ve 10 yıllık sağkalım uygun tedavi uygulandığında %80-90 oranındadır (50).

Dünya Sağlık Örgütü; 'papiller ve foliküler yapıların yanı sıra tipik nükleer değişikliklerin de olduğu, foliküler hücre diferansiyasyonu gösteren malign epitelyal tümördür' şeklinde tanımlamıştır. Söz konusu nükleer değişiklikler sitoplazmik invajinasyonlar şeklinde eozinofilik inklüzyon benzeri yapılar, derin, geniş ve berrak girintiler ile birlikte düzensiz sınırlı ve buzlu cam görünümleridir. Nükleer yarıklar papiller karsinom için tanı koydurucudur. Nükleuslarda üst üste gelme özellikleri görülür ve Kalın, düzensiz bir nükleus zarı ile çevrilidirler. Nükleus hipokromatiktir ve nükleol içermez. Bu tanımlamada kapsüller ve vasküler invazyon koşulu aranmamış, nükleer değişimler dikkate alınmıştır (69).

Makroskopik olarak okült, enkapsüle (intratiroidal) ya da masif (ekstratiroidal) olarak ayrılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü 1 cm altındaki tümörler için 'okült' yerine 'mikropapiller kanser' terimini önermiştir. Klinik önem arz eden ve papiller tiroid kanserlerinin yaklaşık olarak %70'ini oluşturan intratiroidal kanserlerin çapı genellikle 1,5 cm ve daha fazladır (66). Lezyonlar, düzensiz sınırlı bir şekilde gri-beyaz-kahverengi renkli bir kitle şeklindedir. %10'unda kapsül bulunur. Nekrotik alandaki tümör hücrelerinin üzerinde kalsiyum birikimi sonucu "Psammoma cisimcikleri" olarak adlandırılan konsantre kalsifikasyon görüntüleri içerir. Mikroskopik olarak; azalmış kolloid çevreleyen genellikle tek ya da çok sıralı küboidal alçak kolumnar epitelden oluşan fibrovasküler septalar bulunmaktadır. Kolloid azalmış olmakla beraber

foliküller sıkça görülmektedir (68). Foliküler tiroid karsinomlarında %18 oranında görülen hyalin fibröz, papiller tiroid kanserlerinden %89 oranında görülmektedir (69).

Yerleşimi Tiroid dokusunda olabildiği gibi ektopik tiroid dokusunda da olabilir. Tiroid kapsülüne ve komşu dokulara invazyon eğilimi oldukça yüksektir. Lenfatik sistem yolu ile yayılma eğilimindedirler (70). Prognoza etkisi tartışmalı olmakla birlikte olguların %75'inde görülen lenf nodu infiltrasyonu karakteristiktir (68,71). Santral, lateral ve mediasten lenf nodlarına metastazı sık görülür. Tanı anında olguların yaklaşık olarak %50'sinde lenf nod metastazı görülmektedir. Noguchi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, mikroskop altında incelenen papiller tiroid kanserli olgulardan alınan örneklerde bölgesel lenf nodu metastazı %84 olarak bulunmuştur. Tümör boyutu ile lenf nodu metastazı artmakta ve tümörün bulunduğu bölge ile invaziv yeteneği kötü prognoz kriterlerini oluşturmaktadır (72, 73) .

Hematojen yol ile Akciğer, Karaciğer, Beyin ve Kemik dokularına uzak metastaz yapabilir ancak çok sık görülmez (%5-10 oranında) (51). p53 tümör baskılayıcı gen mutasyonu ile ilişkilendirilmiş şekilde anaplastik tiroid tümör transformasyonu oluşabilir (%1 oranında) (74).

2.2.3.1.2.Foliküler Tiroid Kanseri

Tiroid kanserleri arasında Papiller kanserlerden sonra en yaygın görülenidir. Tüm tiroid kanserlerinin yaklaşık olarak %10-20'sini oluşturmaktadır. Endemik iyot eksikliği olan bölgelerde sıklığı Papiller karsinomların aksine artmaktadır. Klasik Foliküler Tiroid Karsinomu tipi daha sık olarak kadınlarda görülür 5. dekatta ortaya çıkmaktadır. Çocukluk çağında çok nadir görülmektedir. Papiller karsinoma benzer şekilde tiroid dokusunda ya da ektopik tiroid dokusunda (struma overi) gelişebilir. Hematojen yayılım ve metastazlar olguların %20'sinden fazla oranda görülmektedir ve özellikle akciğer ve kemik metastazları yapar (46).

Makroskopik olarak genellikle kapsüllü, oval-yuvarlak- beyaz-kahverengi ve tümör çapı 1 cm'den büyük olarak görülmektedir. Daha invaziv türlerinde kapsül görülmeyebilir ya da tümör kapsülü aşmıştır. İnvaziv özelliği daha az olan türlerinde ise kapsül kalın ya da düzensizdir (46).

Mikroskopik olarak foliküler yapılar birbirlerine çok yakındır ve solid ya da trabeküler şeritler halindedir. Hücre tipleri genellikle küboidal ya da alçak kolumnar tipte olup nükleolusları belirsizdir. Papiller kanserlerin nükleus özelliklerini göstermez.

2.2.3.1.3.Az Diferansiye Tiroid Kanseri

Diferansiye tiroid karsinomları ile andiferansiye (anaplastik) karsinomlar arasında tanımlanan bu tür tümörlerde lokal invazyon görülür. Nadiren kapsülleri bulunmaktadır ve küçük, hiperkromatik yapıda nükleusları bulunur. Mitoz oranı yüksektir, nekrotik alanlar sıkça görülür (46).

2.2.3.1.4.Anaplastik Tiroid Kanseri

Tüm tiroid kanserlerinin yaklaşık olarak %5'inden sorumludur ancak oldukça malign tümörlerdir ve mortalite oranı %100'dür. Tanı konduktan sonra ortalama yaşam süresi 6 aydır. Kadınlarda daha sık olmakla beraber yaşlılarda görülmektedir. Olgularda tiroid hastalıkları ya da özellikle papiller olmak üzere diferansiye tümör hikayesi bulunmaktadır. Karsinogenez sırasında tiroid bezinden direkt olarak anaplastik tümör gelişebilir ya da diferansiye tiroid tümörlerinden, özellikle p53 gen mutasyonu ile anaplastik tümörler oluşabilir (19). Diferansiye özelliklerini kaybetmiş oldukları için "dediferansiye" tümör hücreleri olarak da bahsedilir. Radyoaktif iyot konsantre etme yeteneği azalmış olduğundan tedaviye yanıtı düşüktür (74).

Makroskopik olarak oldukça büyük bir kitle olup nekroz ve hemorajik alanlar içerir (46). Tiroid ve çevre dokulara invaze olduğu görülür.

Mikroskopik olarak iğsi/pleomorfik hücrelerle karakterizedir. Koagülatif nekrotik odaklar vardır ve mitotik aktivite artmıştır (46).

2.2.3.1.5.Medüller Tiroid Kanseri

Tiroid dokusunda nöral krest'ten köken alan parafoliküler (C hücreleri) hücrelerden oluşan nöroendokrin tümörlerdir. Solid karsinom, C hücreli karsinom ya da Hyalin karsinom olarak da bilinmektedirler. Tüm tiroid tümörlerinin %5-10'undan sorumludur. Sporadik ya da ailesel olarak görülebilir. %80'i sporadik, %20'si ailesel olarak görülmektedir. Ailesel görülen tipleri MEN (*Multiple Endokrin Neoplazi*) IIA ya da IIB'dir. Tanı konulduğunda olguların %50'sinde lenf nodu, %15'inde ise, akciğer, karaciğer, beyin, kemik gibi

organlarda uzak metastaz saptanmaktadır. Kalsitonin salgılanır ve serum kalsitonin seviyesi yükselir. Serum kalsitonin seviyesi teşhis ve operasyon sonrası izlem sürecinde önemlidir (75). Bazı olgularda tümör hücreleri tarafından somatostatin, karsinoembriyogenik antijen (CEA), serotonin, nörotensin, Adrenokortikotropik Hormon (ACTH) ve vazoaaktif intestinal peptid (VIP) gibi hormonlar salgılanabilir. Etiyolojisinde RET protoonkogeninin mutasyonu vardır. RET onkogen aşırı aktivasyonu hem sporadik hem de ailesel medüller kanserlerin gelişiminde rol oynamaktadır (75).

Tiroidin C hücreleri bakımından zengin bölgelerinde gelişen tümörlerdir. Kapsül genellikle bulunmaz ve fokal nekrotik odaklar görülür. Sınırları belirgindir. Ailesel olan tümörler genellikle multisentrik ve bilateral, sporadik olanlar genellikle unilateraldir. Tümör boyutu ile birlikte çeşitli peptid ürünler ve aminlerin salgılarının artışı ile klinik tablolar gelişebilir ve paraneoplastik sendromlar oluşabilir (76).

Histopatolojik özellikleri değişken olmakla beraber stromada amiloid birikimi sık görülür (%50-80) (77). Tümör infiltrasyon gösteren içsi ya da poligonal hücrelerin birikimi karakteristiktir. Yuvarlak ya da poligonal ve eozinofilik hücre kümeleri bulunmaktadır (66). Uniform nükleusda mitotik aktivite sık gözlenmez.

2.2.4.Tiroid Tümörlerinde Evreleme Sistemleri

Tümör davranışını öngörebilmek, yüksek ve düşük riskli hasta gruplarını ayırt ederek uygun tedavi protokollerini düzenleyebilmek amacı ile prognostik evreleme sistemleri oluşturulmaktadır (78). Bu nedenle tümörler; hastanın cinsiyeti, yaşı, tümörün invaziv ya da metastatik karakteri, tümör boyutu, rezeksiyon büyüklüğü gibi kriterler göz önüne alınarak sınıflandırılmaktadır.

Evreleme sistemlerinden *European Organization for Research on Treatment of Cancer* (EORTC), 1979 yılında bir prognostik indeks tanımlamış, evrelemeyi çoklu değişkenlik analizine dayandırmıştır. Ancak tiroid tümör tipleri farklı diferansiasyon ve farklı biyolojik karakter özellikleri gösterdiklerinden; bu değerlendirme yaygın olarak kullanılmamıştır. EORTC sisteminde dikkate alınan kriterler tümörün histolojik varyantları, tiroid dışı yayılım, metastatik karakter, hastanın yaşı ve cinsiyeti olmuştur. Mayo Kliniğinden Hay ve arkadaşları 1987 yılında; Yaş (*Age*), Yaygınlık (*Extension*), Evre (*Grade*) ve Tümör Büyüklüğü (*Size*) ‘nü dikkate alarak "AGES" skorumu sistemini öne sürmüştür. Cody ve Rossi 1988 yılında

"AMES" sistemini tanımlamış; ancak bu sistemde tiroid dışı yayılım, metastatik karakter, tümör boyutu ve hastanın yaşı değerlendirilmemiştir. Bu sistemlere alternatif olarak "MACIS" sınıflaması oluşturulmuş ve invazyon, metastaz, hasta yaşı ve tümör boyutu değerlendirilmiştir. Bu skorlama sistemlerinde Multisentrisite ve lenf nodu metastazı önemsiz kabul edilmiştir (79,80).

Tiroid kanserlerinde yaygın olarak kullanılan skorlama sistemi Tümör-Nod-Metastaz (TNM) sınıflamasıdır. Bu sınıflamada tümörün yayılma eğilimi ve klinik değerlendirmeler esastır. Tümör Patolojiside önemli bir kriter olarak kabul edilmektedir (81). Klinik değerlendirmede özellikle Bilgisayarlı Tomografi (BT) ve Manyetik Rezonans Görüntüleme (MR) daha yararlı olarak kullanılmaktadır. PET Scan ise henüz standardize edilmemiştir.

Tümör-Nod-Metastaz (TNM) sistemi; *The International Union Against Cancer* (IUCC) tarafından tanıtılmış ve *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) tarafından desteklenmiştir (46,47). 2010 Yılında IUCC ve AJCC tarafından yeniden düzenlenmiştir (82). Tiroid kanserleri TNM sınıflaması Tablo 2.2.'de ve Tablo 2.3.'de gösterilmektedir (82).

Tablo 2.2. Tiroid kanserleri için TNM Sınıflaması (82)

Primer Tümör (T)	Lenf Nodu (N)	Metastaz (M)
T1: Tümör 2 cm veya altında ve tiroide sınırlı T1a: Tümör 1 cm veya altında, tiroide sınırlı T1b: Tümör 1 cm'in üstünde fakat 2 cm ve daha altında, tiroide sınırlı.	N0: Rejyonel lenf nodu metastazı yok	M0: Uzak metastaz Yok
T2: Tümör 2 cm'den büyük fakat 4 cm ve altında, tiroide sınırlı.	N1: Bölgesel lenf nodu metastazı N1a: Level VI lenf nodlarına metastaz (pretreakeal, paratrakeal, ve prelaringeal / Delphian lenf nodları) N1b: Unilateral, bilateral, veya contralateral servikal (Level I, II, III, IV, or V) veya retrofaringeal or superior mediastinal lenf nodlarına (Level VII) metastaz.	M1: Uzak metastaz Var
T3: Tümör 4 cm'den büyük tiroide sınırlı veya herhangi bir boyutta minimal ektratiroidal yayılımı mevcut (sternotiroid kasa veya peritiroid yumuşak dokulara yayılım)		
T4a: Orta derecede ileri hastalık herhangi boyutta tümör tiroid kapsülünü aşmış subkutan yumuşak doku, larinks, trakea, özafagus veya rekürren laringeal sinir tutulumu. T4b: Çok ileri derecede hastalık Tümör prevertebral fasya, karotid arter yada mediastinal damarları tutmuş.		

Tablo 2.3. TNM Evrelemesi (82)

Evre (45 yaş üstü)	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
III	T1	N1a	M0
III	T2	N1a	M0
III	T3	N1a	M0
IVA	T4a	N0	M0
IVA	T4a	N1a	M0
IVA	T1	N1b	M0
IVA	T2	N1b	M0
IVA	T3	N1b	M0
IVB	T4a	N1b	M0
IVC	T4b	Herhangi N	M0
IVC	Herhangi T	Herhangi N	M1
Evre (45 yaş altı)			
I	Herhangi T	Herhangi N	M0
II	Herhangi T	Herhangi N	M1

2.2.5. Tiroid Kanserlerinde Hücre Döngüsü ve Apoptoz çalışmaları

Bryan ve arkadaşları, tiroid kanseri hücre hatları üzerinde RAR ligandı 9-cis RA, ve selektif RXR ligandı LG346 ile yaptıkları çalışmada her iki bileşiğinde anaplastik özellikli DRO hücrelerinin S fazında tutulumunu azaltma ve G2+M fazında tutulumunu artırma etkisi olduğunu göstermişlerdir (8). *All Trans Retinoik Asit* (ATRA) ile yapılan bir çalışmada papiller tiroid kanser hücre hattı NPA hücrelerinin S ve G2+M fazında tutulumu anlamlı ölçüde artmış ve G0/G1 aşamasında tutulumları azalmıştır (83). Audrey ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, Beksaroten, folliküler tiroid kanseri hücre hattı olan FTC-238 hücre hattının hücre döngüsünün G1 fazında tutulumun artırmış, S ve G2+M fazında tutulumunu ise azaltmıştır (84). Beksaroten, FDA onaylı olduğu CTCL hücre hatları üzerinde hücre döngüsünün Sub-G1 aşamasında tutulumu artırmış, G0/G1, S ve G2+M aşamalarında tutulumu azaltmıştır (85).

Joshua ve arkadaşları, yaptıkları *in vitro* ve *in vivo* çalışmada, anaplastik tiroid kanseri hücre hatları olan DRO, ARO ve FRO hücreleri üzerinde Beksaroten bileşiğinin etkisini incelenmişlerdir. Bu çalışmada, DRO hücre hattının canlılığı Beksaroten uygulaması ile anlamlı olarak azalmış, bağışıklık sistemi baskılanmış farelerde DRO hücreleri ile oluşturulan

zenograft modelinde ise tümör boyutu, Beksaroten uygulaması altında anlamlı ölçüde doza bağlı olarak azalmıştır. FRO ve ARO hücre hatlarında anlamlı yanıt oluşmamıştır (14).

Beksaroten bileşiğinin, çalışmamızda ele aldığımız hücre hatları üzerinde hücre döngüsüne ve apoptotik/nekrotik hücre ölümüne olan etkisi ile ilgili literatür mevcut değildir.

2.2.6.Tiroid Kanserlerinde Tedavi Stratejileri

Tiroid kanserlerinde tedavi; primer tümör tedavisi, yardımcı (adjuvan) tedavi ve nüks ve metastazların tedavisi hedeflenerek gerçekleştirilir. Yüksek riskli hastalarda eksik, düşük riskli hastalarda ise agresif tedaviden kaçınılır ve uygun tedavi yöntemi seçimi nüks ve mortaliteyi azaltmak açısından oldukça önemlidir (70). Tiroid kanser tedavilerinde “European Consensus”, “American Thyroid Cancer” ve “National Comprehensive Cancer Network” gibi kılavuzlar kullanılarak tedaviler şekillenmektedir (53,86,87). Primer tedavi olarak cerrahi müdahale uygulanır.

Cerrahi, radyoaktif iyot ve tiroid replasman tedavilerine rağmen metastatik tiroid karsinomunun progrese olma ihtimali bulunmaktadır. Doksorubisin ile ilgili yapılan çalışmalarda metastatik papiller ve foliküler tiroid karsinomlu hastaların Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre %5’inde parsiyel yanıt saptanmış, 84 kişiden oluşan ileri evre tiroid kanserli hasta grubunda yapılan bir çalışmada ise hastalar yalnız doksorubisin yalnız sisplatin ve kombine tedavilerinde sadece doksorubisinle tedavi gören hastalardan tam yanıt alınamamış ve sisplatin ile kombine tedavi gören hastaların %11’inde tam yanıt alınabilmiştir (88).

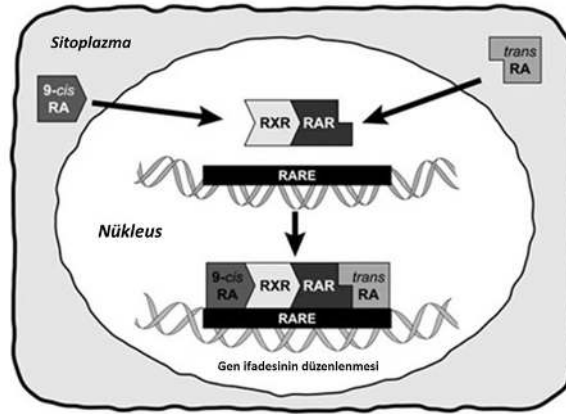
Metastatik rekküren tiroid karsinomlarında zamanla dediferansiyasyon görülmektedir. Dediferansiye olmuş tiroid karsinomlarında rediferansiye ajanların kullanımı amacıyla uzun zamandır çalışmalar yapılmaktadır. Rediferansiye edici ajanların kullanımı başarılı olursa hem radyoaktif iyot hem de levotiroksin süpresyon tedavisi başarılı olacaktır.

2.2.6.1.Retinoidler

Retinoidler vitamin A’nın biyolojik aktif türevleridir ve hücrenin proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptoz davranışlarında düzenleyici rol oynamaktadır. Retinoidler biyolojik aktivitelerini; Retinoik Asit Reseptörleri (RAR) ve Retinoid X Reseptörleri (RXR)

olarak adlandırılan hücre içi reseptör ailelerine bağlanarak göstermektedirler. RAR ve RXR reseptörlerinin 3 izotipi bulunmaktadır ve bunlar; RAR α , RAR β , RAR γ , RXR α , RXR β ve RXR γ 'dır. Bu hücre içi reseptör aileleri ligand bağlanması ile aktive olan transkripsiyon faktörleri gibi davranan nükleer steroid reseptör süperailesi üyeleridir (89).

RAR'leri RXR'ler ile homodimerize ve heterodimerize olabilir ve bu yolla diferansiyasyon ve hücre büyümesini etkileyebilirler. RXR'ler ise Vitamin D Reseptörleri, Tiroid Hormon Reseptörleri (TR) ve Peroksizom Proliferatör aktive Reseptörler (PPAR) gibi diğer nükleer hormon reseptörleri ile heterodimer oluşturur ve DNA'nın Retinoik Asit Yanıt Element (RARE) gen bölgesi ifadelerini etkileyerek görev yapmaktadırlar (89). Retinoik asitlerin etki mekanizması Şekil 2.6.'da gösterilmektedir (90).



Şekil 2.6. Retinoik asitlerin etki mekanizması.

All-trans-RA (ATRA) ve 9-cis-RA, sitoplazmik retinoik asit bağlayan proteinlere bağlanarak hücre nükleusuna alınır. Nükleusta, ATRA, RAR'lerine ve 9-cis-RA ise RXR'lerine bağlanır. RAR ve RXR'ler heterodimer oluşturur ve kromozomun retinoik asit yanıt bölgesine bağlanır ve gen ifadesi düzenlenir (90).

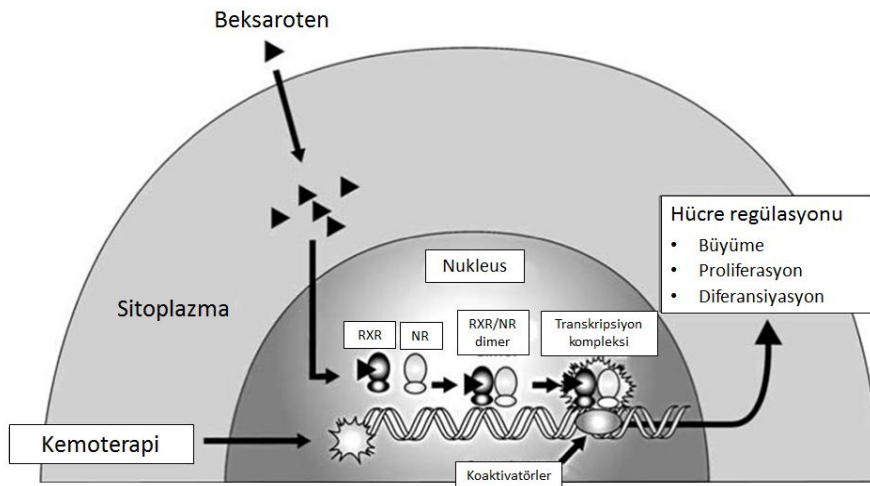
Preklinik, klinik ve epidemiyolojik olarak retinoidlerin kanser kemoprevansiyonunda ve tedavisinde rol oynadığına dair çalışmalar bulunmaktadır (91,92,93). Çok merkezli bir çalışmada retinoik asit sonrası radyoaktif iyot verilen hastalarda radyoaktif iyot tutulumundaki artış %42 olarak ve olumlu klinik yanıt %20 olarak belirtilmiştir (94).

RAR ligandlarının *in vitro* ve *in vivo* preklinik çalışmalarda umut verici özelliklerine dayanarak RAR selektif ligand geliştirme ve klinik uygulamaları ile ilgili çok sayıda çalışma

vardır. Yine de; RAR ligandlarının klinik uygulamalarında görülen etkisi sınırlıdır. Bunun olası nedenleri, terapötik etkinliğe ulaşabilmek için yüksek doz uygulama gereksiniminden kaynaklanan çoklu yan etkileri ya da pek çok kanser türünde RAR ekspresyonu kaybı ya da azalması olabilir (95,96). Buna karşı, RXR ligandları pek çok kanser türünde düşük toksisite göstererek umut verici bir kemopreventif ve kemoterapötik ajan olarak düşünülmekte ve RXR ekspresyon kaybı insan tümörlerinde daha nadir olarak bulunmaktadır. Pek çok yolağın aktive olması hedefiyle geliştirilen çeşitli reksinoidler prelinik ve klinik çalışmalarda umut verici olarak düşünülmektedir (97).

2.2.6.1.1. Selektif RXR Ligandı Beksaroten

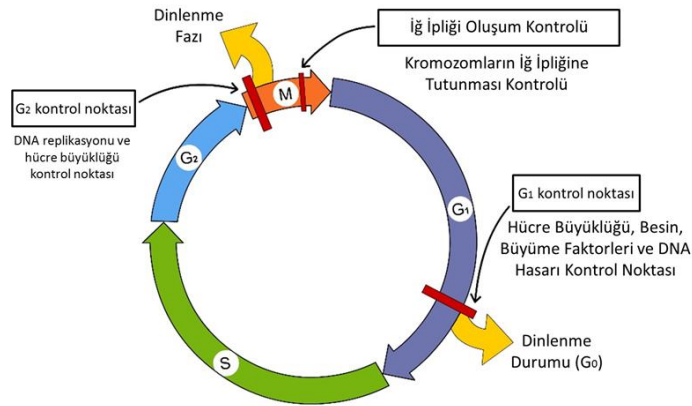
Beksaroten, Spesifik sentetik RXR ligandır. Etkisini, Sekil 2.7.'de gösterildiği gibi RXR'ne bağlanarak gen ifadesi değişikliğine yol açarak gösterirler (98). Yapılan hayvan çalışmalarında minimal toksisite ile meme tümör gelişimini RXR'lerini aktive ederek (9); ileri meme ve prostat kanserleri ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri gibi tümörlerde edinilmiş ilaç direncini genomik bütünlüğü koruyarak baskıladığı belirlenmiştir (10,11,12). Beksaroten'in, T-hücre lenfomada tedaviye tepkisiz hastaların yanıtını, minimal toksisite ile %50 artırdığı ve solid tümörlerde migrasyon, invazivite ve anjiogenezi azalttığı da saptanmıştır (98).



Şekil 2.7. Beksaroten'in etki mekanizması (98).

Hücre döngüsünün çeşitli fazları arasındaki geçişlerde pek çok siklin, siklin-bağımlı kinazlar (CDK'lar) ve hücre döngüsü inhibitörleri tarafından kontrol edilir. Bekсарoten ile yapılan bir çalışmada akciğer kanseri hücrelerinin, kritik kontrol noktaları proteinlerinin düzenlenmeleri yolu ile hücre döngüsünün G1 ve/veya G2/M aşamalarında hapsedildiği, beraberinde canlılık kaybı ile belirgin proliferasyon inhibisyonu, siklin D1 ekspresyonunda azalma ve sonuç olarak hücre büyümesi inhibisyonu gerçekleşmiştir (99).

Bekсарoten p53 proteinini Ser15 aminoasitinden fosforilleyerek aktive eder, Ser15 aminoasiti p53'ü hücre döngüsü durması için promotor bölgesine bağlanmasında etkilidir. Bununla birlikte p73 *upregulasyonu* ile p21, Bax, Survivin ve cdc2 gibi hedef genler düzenlenir (100). Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri ile ilgili yapılan bir çalışmada Bekсарoten'in doz bağımlı olarak siklin D1, siklin D3, Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR) ve fosfo-EGFR ekspresyonunu baskıladığı bulunmuştur (101). Buna ek olarak, Bekсарoten, hem östrojen reseptör negatif hem de pozitif meme kanseri oluşumunu prelinik modellerde inhibe ettiği, ve insülin benzeri büyüme faktör bağlayan protein 6 (IGFBP-6), RAR- β ya da Siklin D1 gibi büyümeyi düzenleyici biyobelirteçlerin ekspresyonlarını kontrol ettiği belirtilmiştir (100). Hücre Döngüsü Aşamaları ve kontrol noktaları Şekil 2.8.'de gösterilmektedir (102).



Şekil 2.8. Hücre Döngüsü Aşamaları ve kontrol noktaları (102).

Apoptotik hücre ölümü çok adımlı ve kontrolünde pek çok gen ürününün katılımı olan bir prosestir. Kaspazlar apoptozda kritik rol oynamaktadır. Kaspazlar başlatıcı (Kaspaz-2, -8, -9 ve -10) ve sonlandırıcı (Kaspaz-3, -6, ve -7) olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır (103).

Apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3 gibi efektör kaspazların aktivasyonuna yol açan 2 klasik yolak vardır. İlk yolak Kaspaz-8'in aktivasyonuna yol açan olum reseptörü tümör nekroz faktör-ilişkili apoptoz indükleyici ligandın aktivasyonunu kapsar (104). Mitokondriyal hasar yolu ile başlayan diğer yolak kaspaz-9'un aktivasyonu ile sonuçlanır. Aktive olduğu zaman başlatıcı kaspaz efektör kaspazları aktive eder ve olarak poli-ADP-riboz polimeraz (PARP) yıkımı ile sonuçlanarak apoptosis gerçekleşir. PARP molekülünün yıkımı çeşitli antitümör ajanları tarafından apoptosisin karakterize özelliği olarak kullanılır. Survivin, hücreleri, kaspaz aktivitesini baskılayan ve çeşitli ajanlar tarafından indüklenen apoptosisten koruyan apoptoz protein inhibitör (IAP) ailesi üyesidir (105). Zhang ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında CTCL hücre hatlarında Beksaroten uygulamasının kaspaz-3 aktivasyonu ve PARP yıkımı ile Survivin ekspresyonunun azaltılması ile apoptosise yol açtığını rapor etmişlerdir. Akut miyeloid lösemi (AML) hücre hattı KG1a hücreleri apoptoza dirençli olma özelliğindedir ve Beksaroten kaspaz-8'i aktive etmiştir. Apoptoza duyarlı AML hücre hattı olan ML-1 hücreleri Bid proteini kesimi ve sitokrom-c salınması yolu ile programlı hücre ölümünü güçlendirmiştir (85). Alyaquob ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında fare akciğer tümörlerinde Beksarotenin kaspaz-3 mRNA'sını, Dnmt-3a, EP3 ve Survivin, Siklin E1, östrojen reseptör-alfa ve iNOS genlerinin ekspresyonlarını azalttığını göstermişlerdir (106).

Bir hücrenin doğal gelişimi bölünme, fonksiyonel özelliklerine diferansiye olma ve sonunda hücre ölümüne gitmesi süreçlerini izler. Kanseroz durumda hücrenin doğal gelişimi kesilir ve kontrolsüz hücre bölünmesi oluşur. Böylece, hücre büyümesi inhibisyonu ve diferansiyasyon indüksiyonu malignitelere tedavi için anahtar olabilir. Beksaroten, kolon kanseri hücrelerinde *in vitro* ve *in vivo* büyüme inhibisyonu ve diferansiyasyon indüksiyonu şeklinde etkisini göstermektedir (107). Beksaroten'in, uzun zamandır HL-60 lösemi hücre hattında ve AML hastalarının lösemi hücrelerinde klonal büyüme inhibisyonu ve diferansiyasyonu indüklemeye etkisi bilinmektedir (108).

Beksaroten, prelinik meme, prostat ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri modellerinde kemoprevantif ve kemoterapötik ajan olarak etkili bulunmaktadır (11,109,10). Yen ve arkadaşları Beksarotenin, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri hücre hattı olan Calu3'de paklitaksel direnç gelişimini engellediğini göstermişlerdir (12). Beksaroten, rat karsinojen indüklü meme tümör hücre hatlarında paklitakselle kombine kullanıldığında sinerjistik büyüme inhibisyonu etkisi göstermiş ve *in vivo*'da tek ajan kullanımına göre tedaviye yanıtı önemli ölçüde artırmıştır (110).

Spesifik sentetik reksinoid Beksaroten, tedaviye yanıtı CTCL’da oral ya da topikal uygulamalarda inhibitör yanıtını minimal toksisite ile %50 oranında artırmış ve bu klinik çalışmalar sonucunda FDA onayı almıştır (13). Reksinoid indüklü antitümör etkisi altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılmış olmamakla birlikte RXR’ların karsinogenezde olası rollerine dair bulgular artmaya devam etmektedir. Yapılan bazı çalışmalar RXR- α artmış ekspresyonunun, reksinoidlerin hem *in vitro*’da embriyonik F9 hücrelerinde morfolojik farklılaşmada bozulma gibi, hem de *in vivo*’da RXR- α yoksun fare prostat modelinde kısa sürede prostat bezinde çok odaklı hiperplazi oluşması gibi hücresel diferansiyasyon indüksiyonu ve kontrolsüz hücre büyümesi gibi etkilerine karşı tümörü duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (111, 112).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi :

Araştırma invaziv olmayan deneysel çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Araştırma Kasım 2011- Mart 2013 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Onkoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.3.Çalışma Materyali:

Araştırmada çalışma materyali olarak BCPAP (insan papiller tiroid karsinomu), CGTH-W-1 (insan foliküler tiroid karsinomu sternal metastaz), 8505C (insan andiferansiye-anaplastik tiroid karsinomu) ve CAL-62 (insan anaplastik tiroid karsinomu) hücre hatları kullanıldı. Hücre hatları ticari olarak Mart-2011’de DSMZ firmasından temin edildi.

3.3. Araştırmanın Değişkenleri:

Araştırmanın bağımlı değişkenleri tiroid kanseri hücre hatlarının canlılığı, apoptotik ve nekrotik hücre ölümü ve hücre döngüsünün S ve Sub-G1 aşamalarında durdurma oranları; bağımsız değişkeni ise Beksaroten’dir.

3.4. Veri Toplama Araçları:

3.4.1. Kullanılan Cihazlar

Projede kullanılan makine ve teçhizat listesi Tablo 3.1.'de gösterilmektedir.

Tablo 3.1. Projede kullanılan mevcut makine - teçhizat listesi

ADI/MODELİ	PROJEDE KULLANIM AMACI
Hava Akış kabineti/Kojair	Hücre kültürü çalışmaları için kullanılmıştır.
CO ₂ inkübatörü/Thermo Forma Steri-cycle	Hücrelerin belli sıcaklık ve CO ₂ içeren ortamda saklanması amacıyla kullanılmıştır.
Otoklav/Hirayama Hiclave	Pipet vb. malzemelerin sterilizasyonu amacıyla kullanılmıştır.
ELİSA Plak okuyucu/Thermo Multiskan Ascent	Hücre canlılık testi sonuçlarının alınması için kullanılmıştır.
Distile su cihazı/uv plus ultra pure water system	Su banyosunda kullanım ve temizlik amacıyla kullanılmıştır.
Inverted mikroskop/Olympus CKX41	Hücrelerin kontrolü ve hücre sayımı amacıyla kullanılmıştır.
Su Banyosu/GFL	Hücre ortamları ve kimyasalların 37 °C ısıya gelmesi için kullanılmıştır.
Soğutmalı Santrifüj/Sigma 3-16K	Hücre kültürü ve Akım sitometrik çalışmalarda kullanılmıştır.
Etüv/Thermo Heraeus	Steril edilmiş malzemeleri kurutmak için kullanılmıştır.
Buzdolabı (-20,+4)/ Siemens	Kimyasalların saklanması için kullanılmıştır.
Sıvı Azot Depolama Tankı	Hücre hatlarının saklanması için kullanılmıştır.
Derin dondurucu (-80) / Indesit	Hücre hatlarının saklanması için kullanılmıştır.
Akım Sitometrik analiz Cihazı/BD FACS Calibur	Apoptoz ve Hücre Döngüsü analizinde kullanılmıştır.

3.4.2.Kullanılan Sarf Malzemeler ve Diğer Gereçler

Projede kullanılan sarf malzeme ve diğer gereçler Tablo 3.2.'de gösterilmektedir.

Tablo 3.2. Projede kullanılan sarf malzemeler ve diğer gereçler

Hücre Kültürü, Hücre Canlılık Testi, Hücre Döngüsü Analizi, Apoptoz Tayini için Kullanılan Malzemeler		
Maddenin Adı	Özelliği	Markası-Cat No:
DMEMF-12 (1:1) (1X)	500mL, Sıvı, L-Glutamin, 15 mM HEPES	Invitrogen
RPMI 1640 Ortam (1X)	500mL, Sıvı, L-Glutamin	Invitrogen
Fetal Sığır Serum (FBS)	500mL, Isı ile inaktive edilmiş.	Invitrogen
Tripsin-EDTA 0.25% (1X)	100mL, Sıvı	Invitrogen
Penisilin / streptomisin	5mL , liyofilize	Biochrom AG
Hücre canlılık testi (<i>Cell Counting Kit-8</i>)	3000 testlik	Dojindo Laboratories
96 Kuyucuklu Kültür kabı	Steril	Becton Dickinson
Akım Sitometri tüpü	5mL, 125 adet/steril	BD Falcon
Akım Sitometrik Apoptoz analiz Kiti (<i>Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I</i>)	40 Testlik	BD Pharmingen
Akım Sitometrik hücre döngüsü analiz Kiti (<i>CycleTEST PLUS DNA Reagent Kit</i>)	40 Testlik	Cycle TEST PLUS
Hücre ayırlama sistemi	35µm, steril hücre ayırlama tüpü	BD Biosciences
1000 µL 'lik filtreli pipet ucu	Steril, DNaz/RNaz yok	Expell Plus
200 µL 'lik filtreli pipet ucu	Steril, DNaz/RNaz yok	Expell Plus
100 µL 'lik filtreli pipet ucu	Steril, DNase/RNase yok	Expell Plus
10 µL 'lik filtreli pipet ucu	Steril, DNase/RNase yok	Expell Plus
Parafilm	4 x 125 FT	American National Can
Otoklav bandı	Beyaz çizgili	SUSSEX
12mL'lik steril tüp	Steril, DNaz/RNaz yok	Cell Star
Lateks Eldiven	Pudrasız	Beybi
10mL'lik pipet	Steril	Greiner bio-one
5mL'lik pipet	Steril	Greiner bio-one
25 cm ² 'lik steril hücre kültür kabı	Steril, Filtreli	Greiner bio-one
75 cm ² 'lik steril hücre kültür kabı	Steril, Filtreli	Greiner bio-one
50 mL'lik steril santrifüj tüpü	Gama ışınları ile steril edilmiş	Santa Cruz
2 mL'lik hücre dondurma tüpü	Steril, DNaz/RNaz yok	Cell Star
Tripan mavis	% 0.4 (v/v)	Sigma
DMSO	10x10mL, çoklu doz kabı	CryoSure-DMSO
L-Glutamin	100mL	Fresenius Kabi
Beksaroten	100 mg %99 saflıkta (toz)	LC Laboratories

3.5. Uygulanan Yöntemler

3.5.1. Hücre Kültürü

3.5.1.1. Hücre Hattı Özellikleri

Deneyler 4 adet iki boyutlu yüzeye bağımlı tiroid kanseri hücre hattı kullanılarak gerçekleştirildi. BCPAP hücre hattı insan papiller tiroid kanseri hücre hattıdır (113). Kültür ortamında yuvarlak şekilli ya da iğsi şekillerde tek tabaka halinde büyürler. CGTH-W-1 hücre hattı, insan foliküler sternal metastatik tiroid karsinomu hücre hatlarıdır (114). Kültür ortamında tek tabaka olup çoklu odaklar oluşturarak geniş epitelyal şekilde uzun sürede büyürler. CAL-62 anaplastik tiroid karsinomu hücre hatlarıdır (115). Kültür ortamında epitelyal benzeri tek tabakalar halinde büyürler. 8505C andiferansiye ve histolojik olarak iğsi papiller adenokarsinom yapısında çok büyük ve poligonal yapıda hücrelerdir (116). Her hücre için hücre kültüründe kullanılan ortamlar ve içerikleri Tablo 3.3.'de gösterilmektedir.

Tablo 3.3. Hücre hatları ve hücre kültüründe kullanılan ortam içerikleri

Hücre hattı	Ortam ve içeriği (%10 FBS+%1 penisilin streptomisin + %1 L-Glutamin) (v/v)
BCPAP	RPMI-1640
CGTH-W-1	RPMI-1640
8505C	RPMI-1640
CAL-62	DMEM-F12K

3.5.1.2. Hücrelerin Kültürde İdamesi

BCPAP, CGTH-W-1 ve 8505C hücre hatları %10 (v/v) oranında FBS, %1 (v/v) L-glutamin içeren RPMI-1640 ortamında kültüre edildi. Bakteri kontaminasyonunun önlenmesi amacıyla 100 IU/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisinden oluşan antibiyotik çözeltisinden %1 (v/v) oranında kültür ortamına ilave edildi. Hücreler 25 cm²'lik hücre kültür kaplarına ekildi ve 37 °C'de 5 % CO₂ içeren inkübatörde bekletilerek canlılıklarının devamı sağlandı. Kültür kaplarında üretilen hücre hatları %80 yoğunluğa ulaşana kadar iki günde bir beslendi. Bu yoğunluğa gelen kaplardaki hücrelerin çoğaltılması amacıyla pasajlama işlemi uygulandı. Pasajlama işlemi ile hücreler 75 cm² kültür kaplarına alınıp çoğaltıldı (117).

3.5.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

Steril cam pastör pipetleri kullanarak vakum yardımıyla ortam hücre kültür kabından uzaklaştırıldı. Kültür yüzeyi Tripsin-EDTA muamelesinin etkisini arttırmak için Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen steril PBS ile bir kez yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra 75 cm^2 'lik hücre kültür kapları için 5 mL, 25 cm^2 'lik hücre kültür kapları için 2 mL Tripsin-EDTA çözeltisi, hücreleri yapıştıkları hücre kültür kabının yüzeyinden kaldırmak amacıyla ilave edildi. Hücre kültür kapları 37 °C'de % 5 CO_2 içeren inkübatörde 1-2 dakika hücreler yüzeyden kalkana kadar bekletildi. Bu süre sonunda hücrelerin tamamen kap yüzeyinden kalktığından emin olmak amacıyla *inverted* mikroskop altında kontrol edildi. Hücreler hücre kültür kabı yüzeyinden ayrıldığında Tripsin-EDTA inhibisyonu amacıyla konulan ve Tripsin-EDTA hacminin en az 2 katı kadar ortam hücre kültür kabına ilave edildi. Kültür kabı içindeki ortam, Tripsin-EDTA ve hücre içeren süspansiyon aspire edilerek 15 mL'lik steril santrifüj tüpüne aktarıldı ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra üst faz (süpernatant) atıldı. Üst faz atıldıktan sonra steril santrifüj tüpü dibinde gözlenen hücre peleti üzerine 10 mL kültür ortamı ilave edildi ve pipet ucuyla hücreler süspanse edildi. Pasajlamanın 1:3 oranında olması amacıyla her kültür kabına 2 mL süspanse haldeki kültür ortamından paylaştırılarak üzerelerine 5 mL ortam eklendi ve çoğalması için 37 °C'de % 5 CO_2 içeren inkübatöre yerleştirildi (117).

3.5.1.4. Hücrelerin Dondurulması

Hücreler Tripsin-EDTA aracılığıyla kültür kabı yüzeyinden kaldırıldıktan sonra hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen pellet üzerine dondurma ortamı konularak resüspanse edildi ve 2mL'lik steril hücre dondurma tüplerine dağıtıldı. Hücrelerin dondurma ortamı içerisinde kademeli olarak dondurulması amacıyla önce -20 C°' de 2 saat, -80 C°'de 1 gün bekletildikten sonra -196 °C'deki sıvı azot tankına alındı. Her iki hücre hattı içinde dondurma ortamı olarak %10 (v/v) DMSO içeren ortam kullanıldı. Steril hücre dondurma tüpleri üzerine tarih, hücre hattı ismi, pasaj no, kişi adı yazıldı (117).

3.5.1.5. Hücrelerin Çözülmesi

Hazırlanan ortam 37 °C’de su banyosunda ısıtıldı. Kabinette steril ortamda hücre kültür kapları üzerine tarih, pasaj no, hücre hattı ismi, kişi adı yazıldı ve kültür kabı içine 37 °C’ ye getirilmiş kültür ortamından 10 mL konuldu. Hücre sıvı azot tankından çıkarılarak hızlı bir biçimde 37 °C’ ye getirilmiş olan su banyosunda çözüldü. Hücre dondurma tüpünün dış kısmı steril edildikten sonra kabinete alındı ve içindeki hücre süspansiyonu çekilerek hazırlanmış olan kültür kabı içine ilave edildi. Kültür kabı, 37 °C’de % 5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirilerek idamesi sağlandı (117).

3.5.1.6. Hücrelerin Sayılması

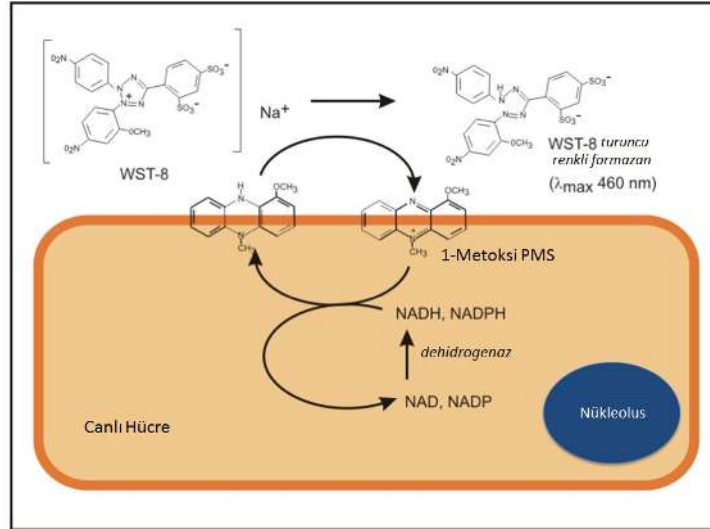
Thoma lamı distile su, alkol ve tekrar distile su sıralamasıyla temizlendi. Mikroskop altına konulan thoma lamının üzeri hafifçe ıslatılarak lamele yapıştırıldı. Santrifüj sonrası elde edilmiş olan pellet üzerine isteğe bağlı olarak (2,5-10 mL) ortam ile resüspanse edildi. 1:1 (v/v) oranında tripan mavisini ile steril ependorf içinde birleştirildi (50 µL:50 µL). Thoma lamının her iki tarafındaki lam ve lamelin birleştiği ortadaki kapiller boşluklara 10 µL tripan mavisini ile boyanmış hücre süspansiyonu verildi. 16 büyük kareyi barındıran thoma lamının yüzeyinde tüm hücreler sayıldı.(10x ‘lik büyütmede) Sayılma esnasında üst ve sol dahil sağ ve alt çizgi hariç olarak sayıldı. Thoma lamının her iki tarafındaki karelerde sayılan hücrelerin sayısının ortalaması alındı. Sayılan ortalama hücre sayısı x Dilüsyon Faktörü x 10⁴ formülü ile 1mL’deki hücre sayısı bulundu (117).

3.5.2. Hücre Canlılık Testi

3.5.2.1. Yöntemin Prensipleri

Bu çalışmada hücre canlılık testi olarak CCK-8 kullanıldı. Suda çözünebilir tetrazolyum tuzları (WST) suda çözünebilir formazanları oluşturmaktadır. WST-8 oldukça stabil bir tetrazolyum tuzudur ve CCK-8 testinde kullanılmaktadır. Elektron taşıyıcısı oldukça stabil olan 1-Metoksi-PMS’dir (118). WST-8, 1-Metoksi-PMS’nin indirgenmiş formuyla beraber reaksiyona girerek indirgenir. Bu taşıyıcı hücre membranında bulunmaktadır ve nikotinamid-adenin-dinukleotid indirgenmiş formu (NADH) ya da nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat indirgenmiş formu (NADPH) ile doğrudan reaksiyona girer. NADH ve NADPH ile laktat dehidrogenaz ve laktik asit gibi dehidrogenaz enzimleri ve substratlarının

reaksiyonları ile NAD^+ ve NADP^+ 'den oluşur. Bu nedenle tetrazolyum tuzu dehidrogenazın aktivitesinin ya da substratının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Canlı hücrelerde bulunan dehidrogenazlar tarafından WST-8'in indirgenip oluşturduğu formazan ürünü 450nm/650nm dalga boyunda pik absorbans veren güçlü bir turuncu renk oluşturur ve bu rengin yoğunluğu mikropalak okuyucuda ölçülür (118). WST-8'in formazana indirgenme mekanizması Şekil 3.1.'de gösterilmektedir (118).



Şekil 3.1. WST-8 ' in formazana indirgenme mekanizması (118).

3.5.2.2. Beksaroten Çözeltisinin hazırlanması

- Beksaroten'in moleküler ağırlığı 348,48 gram/mol'dür. Çözücüsü DMSO'dur. Toz halindeki Beksaroten 5 mg tartılıp 5 mL DMSO içerisinde çözülündüğünde 2500 μM stok çözeltisi elde edildi ve bu stok çözeltiden ara stok olarak 1000 μM çözeltisine ulaşıldı. Ara stoktan seri dilüsyonlar ile 10 μM , 20 μM , 30 μM , 40 μM , 50 μM ve 60 μM olmak üzere 6 farklı doz hazırlandı.
- Çözücü olarak DMSO kullanıldığından, hücre canlılık testi için en yüksek oranda (60 μM) DMSO içeren dilüsyonun içerdiği kadar oranda ortamla dilüe edilmiş bir kontrol çözeltisi hazırlandı. Akım sitometrik analizler için ise; belirlenen IC_{50} dozların içerdiği ile aynı oranda DMSO içeren kontrol grubu hazırlandı.
- Ana ve ara stok çözeltiler, DMSO içeren kontrol çözeltisi her bir deneyden hemen önce taze olarak hazırlandı.

3.5.2.3. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney prosedürü

Hücre Canlılık testi için; BCPAP, CGTH-W-1, 8505C ve CAL-62 hücreleri adheren (yüzeye yapışan) hücreler olduklarından dolayı tripsinizasyonla kültür kabından kaldırıldı. Hücre süspansiyonu tripan mavisi sayım yöntemi ile thoma lamında sayılarak 96 Kuyucuklu Kültür kabının her kuyucuğuna 200 μ L'de 10.000 ve 15.000'er hücre ekildi. Sonra hücrelerin yapışması için 37 °C'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde 72 saat ön inkübasyona bırakıldı.

96 kuyucuklu kültür kabının kuyucuklarından ortamlar çekilerek, yerine yukarıda belirtildiği gibi (10 μ M–60 μ M) konsantrasyonlardaki Beksaroten çözeltilerinden her kuyucuğa 200 μ L hacimde konuldu. Her grup için beş kuyucuk olacak şekilde gruplar hazırlandı. İlaç uygulanmayan, sadece hücre ve ortamdan oluşan bir kontrol gurubu yanı sıra birde ilacın çözündüğü DMSO içeren hücre ve ortam kontrol grubu oluşturuldu. Hücre canlılık testi için Tablo 3.4'de belirtildiği gibi, BCPAP, CGTH-W-1, 8505C ve CAL-62 hücrelerine, 96 kuyucuklu steril hücre kaplarında Beksaroten dozları uygulandı.

Tablo 3.4. Hücre Canlılık deneyi için BCPAP, CGTH-W-1, 8505C ve CAL-62 hücre hatlarına verilen Beksaroten'in 96 kuyucuklu kültür kabındaki doz dağılımı

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Kontrol	Kontrol (DMSO'lu)	10 μ M Beksaroten	20 μ M Beksaroten	30 μ M Beksaroten	40 μ M Beksaroten	50 μ M Beksaroten	60 μ M Beksaroten
B	Kontrol	Kontrol (DMSO'lu)	10 μ M Beksaroten	20 μ M Beksaroten	30 μ M Beksaroten	40 μ M Beksaroten	50 μ M Beksaroten	60 μ M Beksaroten
C	Kontrol	Kontrol (DMSO'lu)	10 μ M Beksaroten	20 μ M Beksaroten	30 μ M Beksaroten	40 μ M Beksaroten	50 μ M Beksaroten	60 μ M Beksaroten
D	Kontrol	Kontrol (DMSO'lu)	10 μ M Beksaroten	20 μ M Beksaroten	30 μ M Beksaroten	40 μ M Beksaroten	50 μ M Beksaroten	60 μ M Beksaroten
E	Kontrol	Kontrol (DMSO'lu)	10 μ M Beksaroten	20 μ M Beksaroten	30 μ M Beksaroten	40 μ M Beksaroten	50 μ M Beksaroten	60 μ M Beksaroten

Beksaroten ile muamele edilen hücreler 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca 37 °C'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi. 72 ve 96 saatlik grupların 48. saatte ortam değişimleri yapıldı. İlaça maruziyet sonucunda ilaç kalıntılarının CCK-8 ile girişim olasılığını ortadan kaldırmak için iki kere PBS ile yıkandı ve son olarak 100 μ L ortam eklendi ve 10 μ L CCK-8 verildikten sonra 3 saat 37 °C'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. 450nm (650nm

referans dalga boyu) dalga boyunda canlı hücrelerin ürünü olan formazanın oluşturduğu absorbans ölçümleri mikropak okuyucudan alındı. Elde edilen absorbans değerleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak canlı hücre oranı belirlendi. Kontrol grubu hücrelerinin canlılık oranı %100 olarak kabul edilip Beksaroten uygulanan grupların canlılık oranı buna göre hesaplandı. Formül aşağıdaki gibidir.

$$\% \text{ canlılık} = \frac{\text{absorbans değeri (beksaroten)}}{\text{absorbans değeri (kontrol)}} \times 100$$

Hücre canlılık testinde her doz grubu 5 kuyucuktan oluşturuldu ve birbirinden bağımsız deneyler olarak ise üç-dört farklı zamanda tekrarlandı. Yüzde canlılık oranları hesaplandıktan sonra %50 canlılık oranına karşılık gelen Beksaroten konsantrasyonları (μM) IC_{50} dozları olarak saptandı.

3.5.3. Akım Sitometrik Analizler

3.5.3.1. Apoptoz Analizi (Annexin V yöntemi)

3.5.3.1.1. Yöntemin Prensibi

Bu çalışmada apoptoz analizi BD Pharmingen firmasından temin edilen "*AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit I*" ile gerçekleştirildi. Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı, apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin-V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan PS'e bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde olan floresan izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilir. FITC-Anneksin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki PS'e bağlanma oranı Akım sitometrik olarak ölçüldü. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak Propidyum iyodür (PI) eklendi. Annexin V-FITC (yeşil floresan) ve ölü hücreleri boyayan boya olan PI ile boyanma farklılığına göre hücreler aşağıdaki gibi birbirinden ayrımlandı;

- Canlı hücreler (FITC-PI-),
- Erken apoptotik hücreler (FITC+PI-)
- Geç apoptotik (FITC+PI+)
- Nekrotik hücrelerin (FITC+PI+)

3.5.3.1.2. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü

BCPAP, CGTH-W-1, 8505C ve CAL-62 hücreleri tripsinizasyonla kültür kabından kaldırıldı. Hücre süspansiyonu tripan mavisi sayım yöntemi ile thoma lamında sayılarak 6 kuyucuklu kültür kabının her kuyucuğuna 160.000 hücre ekildi. 72 saatlik ön inkübasyondan sonra hücre canlılık testinde Beksaroten için belirlenen IC_{50} dozlar kuyucuklara verildi ve 48 saat inkübe edildi. 48 saatlik ilaca maruziyet sonrasında 6 kuyucuklu kültür kabının her kuyucuğundaki ortamlar çekilip 17x100 mm'lik tüplere aktarıldı. Kuyucuklara 500 μ L Tripsin-EDTA eklenip hücreler kaldırıldı. 1mL ortamla Tripsin-EDTA inaktivasyonu yapıldı ve çekilip 17x100 mm'lik tüplere ilave edildi. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Her tüpe 400 μ L bağlanma tamponu eklendi ve resüspanse edildi. Bağlanma tamponu; 0,1 M HEPES (pH:7.4), 1.4 M NaCl ve 25 mM $CaCl_2$ içermektedir. Tüplere önce 5 μ L Annexin V, daha sonra 5 μ L PI eklendi. Tüpler karanlık ortamda 20 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası tüplere 400'er μ L bağlanma tamponu eklendi ve cihaza verildi. Erken apoptoz, geç apoptoz, nekroz ve canlı hücre oranları çift lazerli akım sitometrisinde değerlendirildi. Apoptoz analizi için BCPAP, CGTH-W-1, 8505C ve CAL-62 hücrelerine, 6 kuyucuklu steril hücre kaplarında Beksaroten uygulandı (119).

3.5.3.2. Hücre Döngüsü Analizi

3.5.3.2.1. Yöntemin Prensibi

Bu çalışmada hücre döngüsü analizi "*Cycle Test Plus DNA Reagent Kit*" ile gerçekleştirildi. Bu analiz, hücrelerin hücre döngüsünün hangi aşamasında olduğunu belirlenmesi için yapılan işlemdir. PI boyasının hücrelerin DNA'sına bağlanıp ışımaya vermesi temeline dayanır. Bağlanan boya miktarı her bir hücredeki total DNA miktarı ile orantılıdır (120).

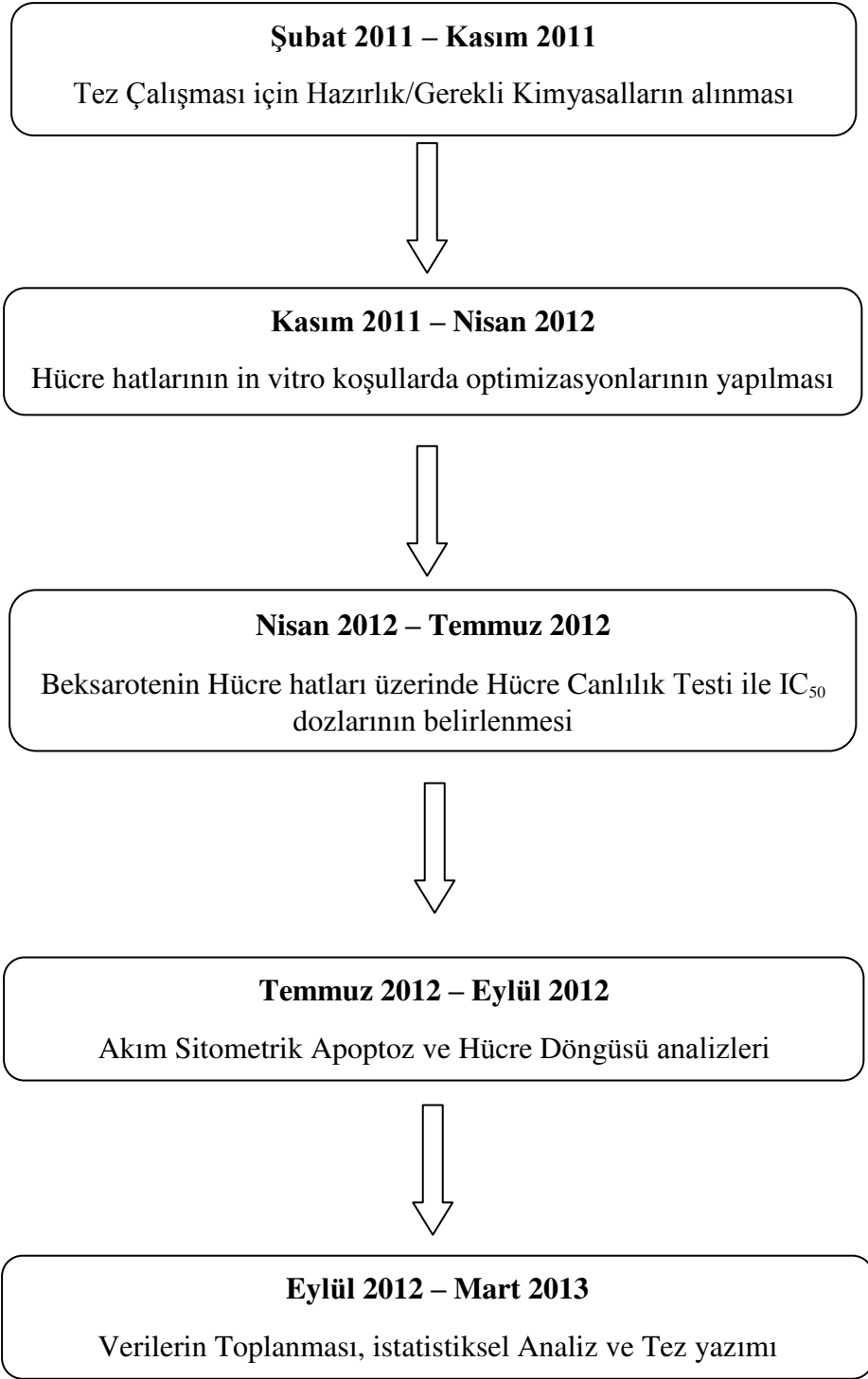
3.5.3.2.2. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü

BCPAP, CGTH-W-1, 8505C ve CAL-62 hücreleri tripsinizasyonla kültür kabından kaldırıldı. Hücre süspansiyonu tripan mavisi sayım yöntemi ile thoma lamında sayılarak 6 kuyucuklu kültür kabının her kuyucuğuna 160.000 hücre ekildi. 72 saatlik ön inkübasyondan sonra hücre canlılık testinde Beksaroten için belirlenen IC_{50} dozlar kuyucuklara verildi ve 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 6 kuyucuklu kültür kabının her kuyucuğundaki ortamlar çekilip 17x100 mm'lik tüplere aktarıldı. Kuyucuklara 500 μ L Tripsin-EDTA eklenip hücreler kaldırıldı. 1mL ortamla Tripsin-EDTA inaktivasyonu yapıldı ve çekilip 17x100 mm'lik tüplere ilave edildi. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 1 mL tampon çözeltisi (Dimetilsülfoksit içeren sükroz-sitrat tamponu) eklendi ve hücreler resüspanse edildi (yıkama işlemi). 1500 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi üç kez tekrarlandıktan sonra boyama işlemine geçildi ve bu aşamadan sonraki işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Yıkama işlemlerinin ardından tampon çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 250 μ L çözelti A (Tripsin içeren sitrat tamponu) her tüpe eklendi ve el ile hafifçe çalkalandı. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra çözelti A uzaklaştırılmadan 200 μ L çözelti B (Tripsin inhibitörü ve RNAz içeren sitrat tamponu) tüplere eklendi ve el ile hafifçe çalkalandı. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. +4 °C 'de muhafaza edilmiş olan çözelti C (PI boyama çözeltisi) her tüpe 200 μ L olacak şekilde eklendi. Buz üzerinde 10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. Çözelti C eklendikten sonra üç saat içerisinde örnekler çift lazerli akım sitometri cihazında analiz edildi. G0/G1, sentez fazı ve G2+Mitoz fazına ait hücreler *ModFitLT3.2* programı kullanılarak yüzde (%) olarak değerlendirildi. Hücre döngüsü ve apoptoz analizi için 6 kuyucuklu steril hücre kaplarında Tablo 3.4'de belirtilen dağılımda gruplar halinde uygulandı. Akım Sitometrik hücre döngüsü ve apoptoz analizlerinde BCPAP, CGTH-W-1, 8505C ve CAL-62 hücre hatları için oluşturulan gruplar Tablo 3.5.'de gösterilmektedir.

Tablo 3.5. Akım Sitometrik analizlerde tüm hücre hatları için oluşturulan gruplar

HÜCRE HATLARI	GRUPLAR (48 saatlik inkübasyon süresi)		
	KONTROL	KONTROL-DMSO	BEKSAROTEN (IC ₅₀ DOZU)
BCPAP	Kontrol	Kontrol-DMSO	Beksaroten (34 µM)
CGTH-W-1	Kontrol	Kontrol-DMSO	Beksaroten (50 µM)
8505C	Kontrol	Kontrol-DMSO	Beksaroten (48 µM)
CAL-62	Kontrol	Kontrol-DMSO	Beksaroten (46 µM)

3.6.Araştırma Planı ve Takvimi



3.7. Verilerin Değerlendirilmesi

Hücre canlılık analizlerinde her grup hücre için 5'er kuyucukta olacak şekilde ölçüm yapıldı. Çalışmalar farklı zamanlarda 3 kez tekrarlandı. İstatistiksel analizler SPSS 20.0 yazılımı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Post-hoc test olarak gruplar arasındaki varyans eşitliğine bakıldı. Varyans eşitliği varsayımı reddedilen (Leven's test $p < 0.05$) gruplarda Games-Howell testi yapıldı. Varyans eşitliğini sağlayan gruplarda ise Tukey testi uygulandı. p değeri 0.05'in altında olanlar anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi.

3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları

Normal tiroid epiteli hücre hattı hem satın alma hem de kültürde idame edilme maliyeti yüksek olduğundan dolayı araştırmaya alınmamıştır. Buna karşın her hücre tipi için etken maddenin eklenmediği gruplar 'kontrol' olarak değerlendirilmiştir.

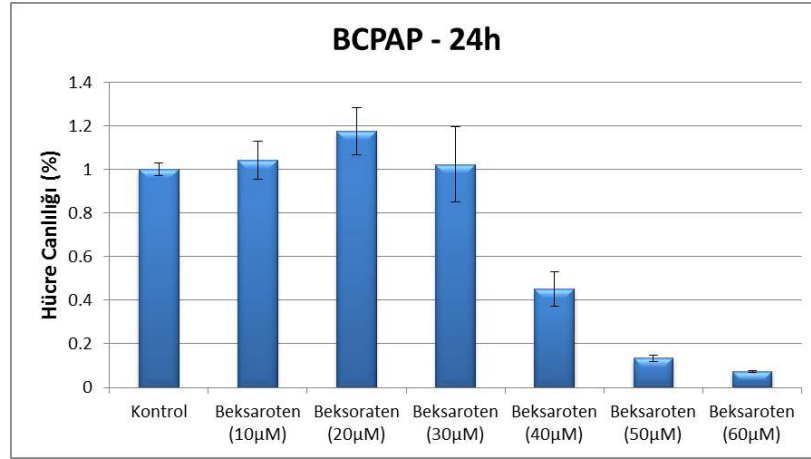
3.9. Etik Kurul Onayı

Araştırma, 25.02.2011 tarihinde 83-GOA protokol numaralı, 2011/05-04 karar numarası ile görüşülmüş ve etik kurul onayı alınmıştır.

4.BULGULAR

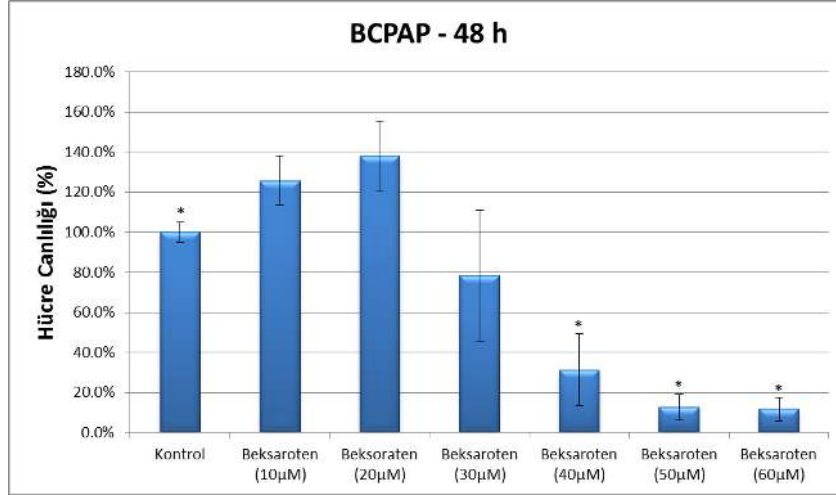
4.1. Hücre canlılık Testi Bulguları

BCPAP hücre hattı üzerinde 24 saat süresince Beksarotenin artan konsantrasyonları uygulanarak elde edilen Beksaroten konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi Şekil 4.1.'de gösterilmektedir. 24 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu BCPAP hücrelerinin canlılığının %50 oranda azaldığı IC₅₀ dozu 42 µM olarak belirlenmiştir.



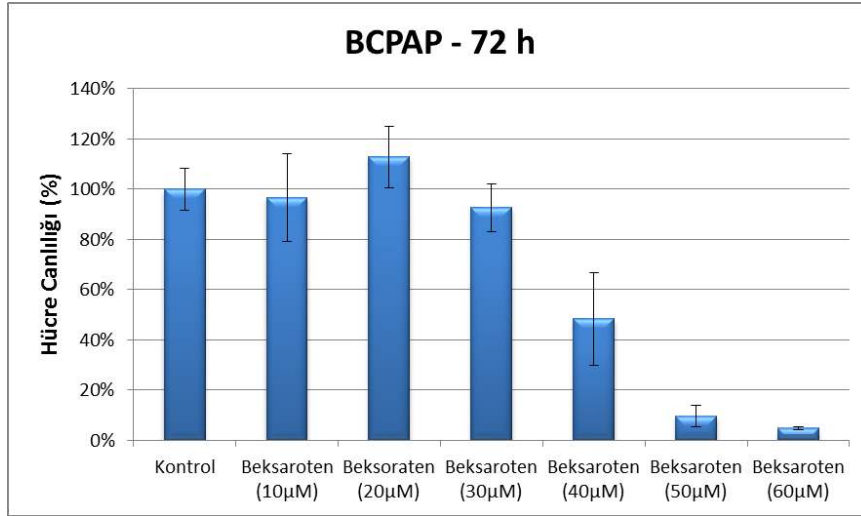
Şekil 4.1. BCPAP hücre hattı üzerinde farklı dozlarda 24 saatlik Beksaroten uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

BCPAP hücre hattı üzerinde 48 saat süresince Beksarotenin artan konsantrasyonları uygulanarak elde edilen Beksaroten konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi Şekil 4.2.'de gösterilmektedir. 48 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu BCPAP hücrelerinin canlılığının %50 oranda azaldığı IC₅₀ dozu 34 µM olarak belirlenmiştir.



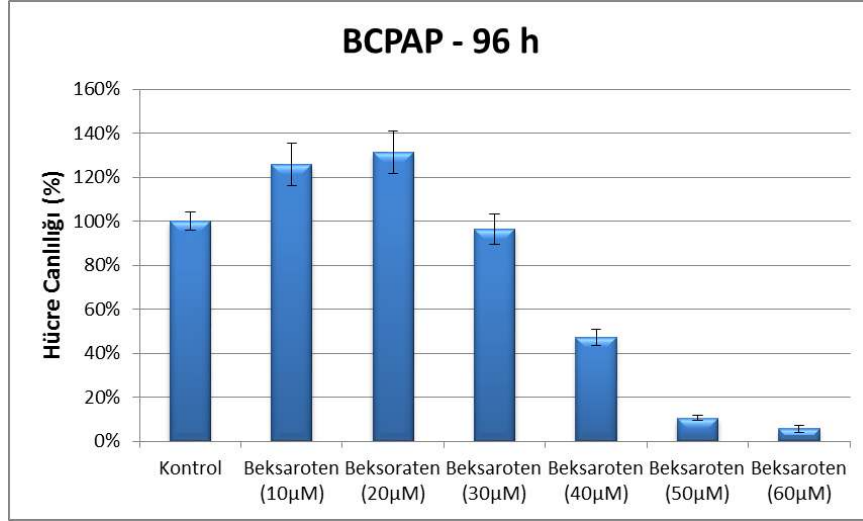
Şekil 4.2. BCPAP hücre hattı üzerinde farklı dozlarda 48 saatlik Bekсарoten uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

BCPAP hücre hattı üzerinde 72 saat süresince Bekсарotenin artan konsantrasyonları uygulanarak elde edilen Bekсарoten konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi Şekil 4.3.'de gösterilmektedir. 72 saatlik Bekсарoten uygulaması sonucu BCPAP hücrelerinin canlılığının %50 oranda azaldığı IC₅₀ dozu 43 µM olarak belirlenmiştir.



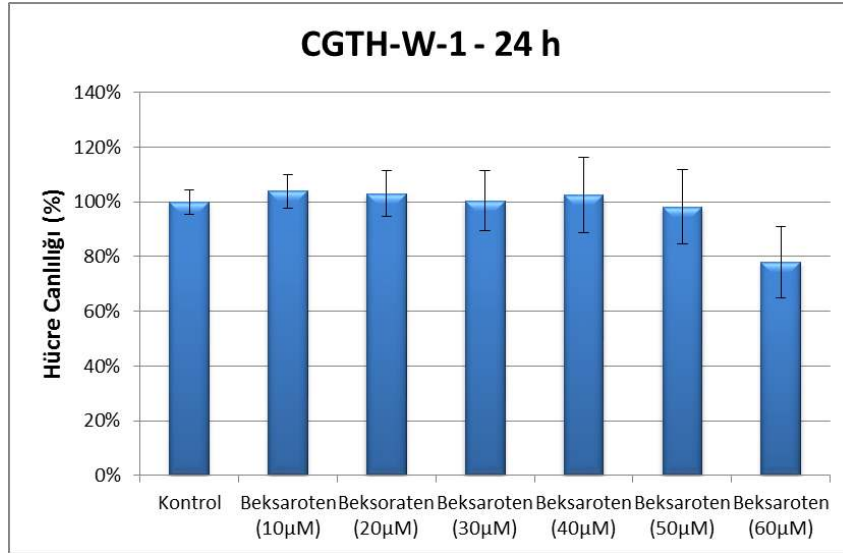
Şekil 4.3. BCPAP hücre hattı üzerinde farklı dozlarda 72 saatlik Bekсарoten uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

BCPAP hücre hattı üzerinde 96 saat süresince Bekсарotenin artan konsantrasyonları uygulanarak elde edilen Bekсарoten konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi Şekil 4.4.'de gösterilmektedir. 96 saatlik Bekсарoten uygulaması sonucu BCPAP hücrelerinin canlılığının %50 oranda azaldığı IC₅₀ dozu 39 µM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4. BCPAP hücre hattı üzerinde farklı dozlarda 96 saatlik Beksaroten uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

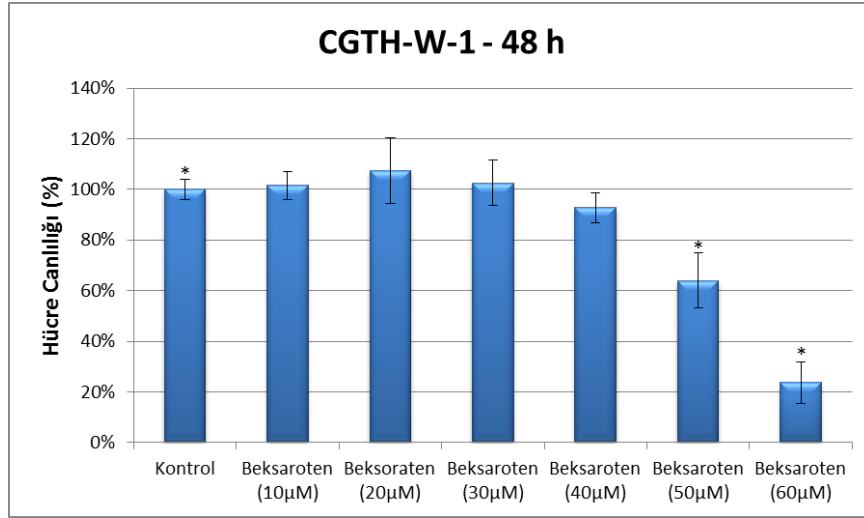
CGTH-W-1 hücre hattı üzerinde 24 saat süresince Beksarotenin artan konsantrasyonları uygulanarak elde edilen Beksaroten konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi Şekil 4.5.'de gösterilmektedir. 24 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu CGTH-W-1 hücrelerinin canlılığının %50 oranda azaldığı IC₅₀ dozu, 60 µM doza kadar belirlenememiştir.



Şekil 4.5. CGTH-W-1 hücre hattı üzerinde farklı dozlarda 24 saatlik Beksaroten uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

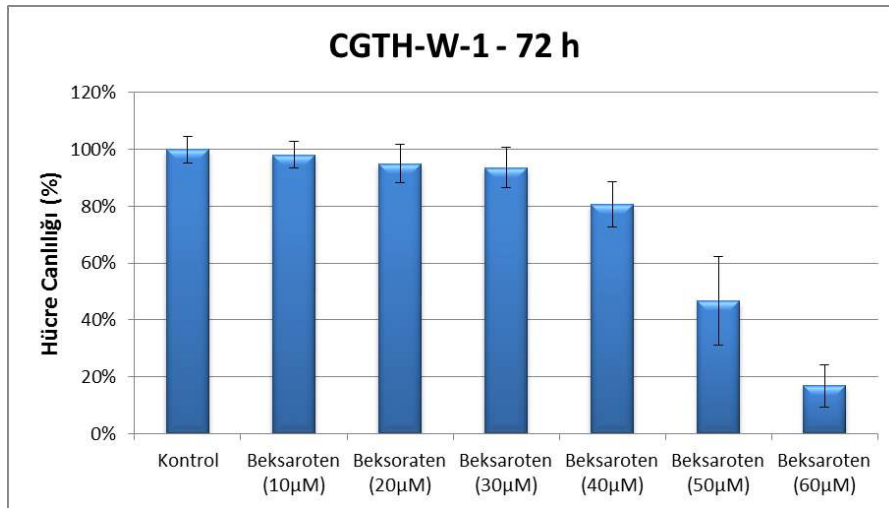
CGTH-W-1 hücre hattı üzerinde 48 saat süresince Beksarotenin artan konsantrasyonları uygulanarak elde edilen Beksaroten konsantrasyonlarının hücre canlılığına

etkisi Şekil 4.6.'da gösterilmektedir. 48 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu CGTH-W-1 hücrelerinin canlılığının %50 oranda azaldığı IC₅₀ dozu 50 µM olarak belirlenmiştir.



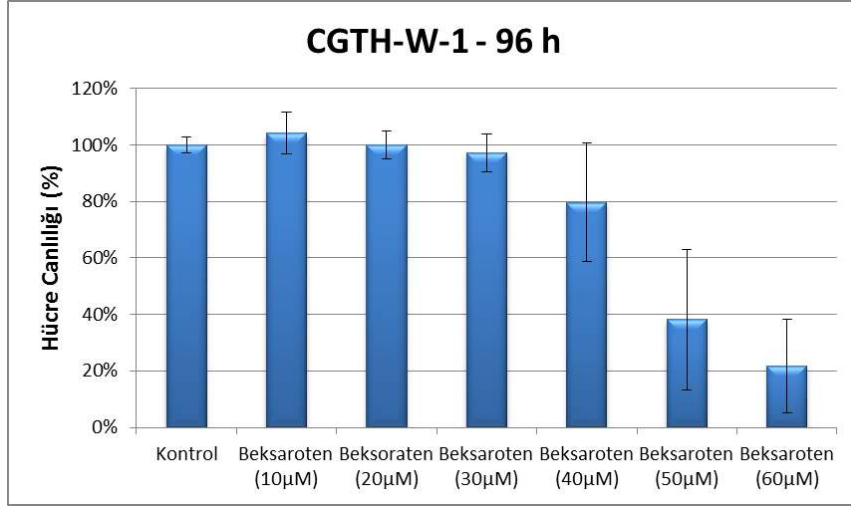
Şekil 4.6. CGTH-W-1 hücre hattı üzerinde farklı dozlarda 48 saatlik Beksaroten uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

CGTH-W-1 hücre hattı üzerinde 72 saat süresince Beksarotenin artan konsantrasyonları uygulanarak elde edilen Beksaroten konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi Şekil 4.7.'de gösterilmektedir. 72 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu CGTH-W-1 hücrelerinin canlılığının %50 oranda azaldığı IC₅₀ dozu 41 µM olarak belirlenmiştir.



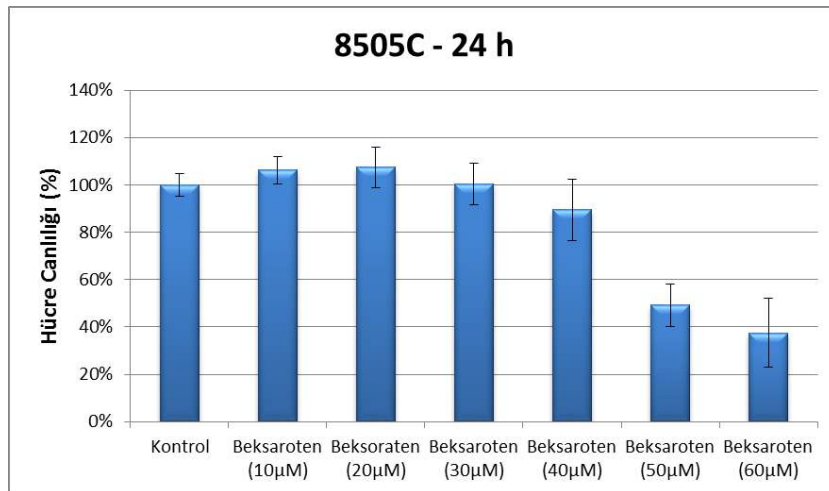
Şekil 4.7. CGTH-W-1 hücre hattı üzerinde farklı dozlarda 72 saatlik Beksaroten uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

CGTH-W-1 hücre hattı üzerinde 96 saat süresince Beksarotenin artan konsantrasyonları uygulanarak elde edilen Beksaroten konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi Şekil 4.8.'de gösterilmektedir. 96 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu CGTH-W-1 hücrelerinin canlılığının %50 oranda azaldığı IC₅₀ dozu 46 µM olarak belirlenmiştir.



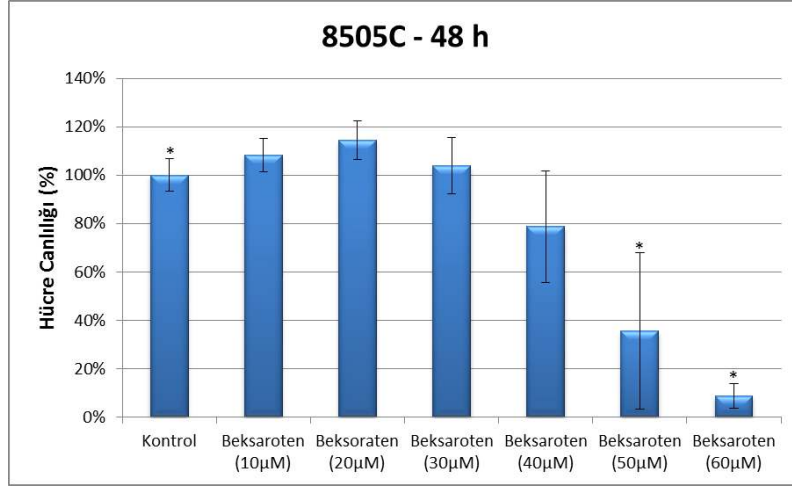
Şekil 4.8. CGTH-W-1 hücre hattı üzerinde farklı dozlarda 96 saatlik Beksaroten uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

8505C hücre hattı üzerinde 24 saat süresince Beksarotenin artan konsantrasyonları uygulanarak elde edilen Beksaroten konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi Şekil 4.9.'de gösterilmektedir. 24 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu 8505C hücrelerinin canlılığının %50 oranda azaldığı IC₅₀ dozu 54 µM olarak belirlenmiştir.



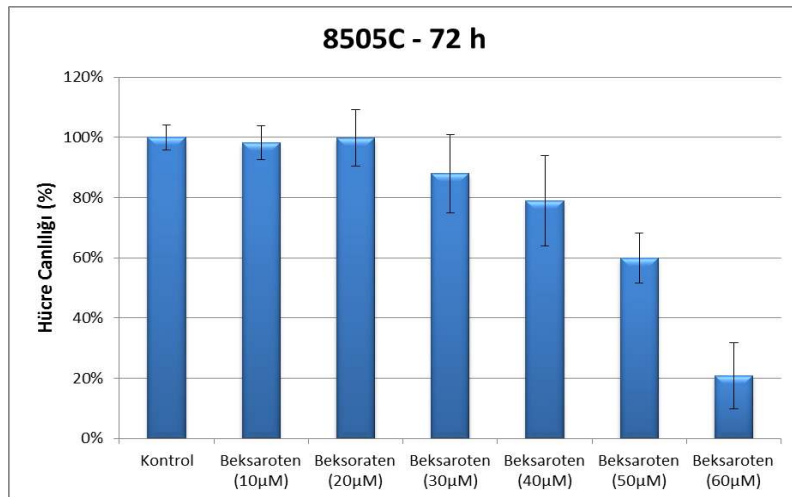
Şekil 4.9. 8505C hücre hattı üzerinde farklı dozlarda 24 saatlik Beksaroten uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

8505C hücre hattı üzerinde 48 saat süresince Beksarotenin artan konsantrasyonları uygulanarak elde edilen Beksaroten konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi Şekil 4.10.'de gösterilmektedir. 48 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu 8505C hücrelerinin canlılığının %50 oranda azaldığı IC₅₀ dozu 48 µM olarak belirlenmiştir.



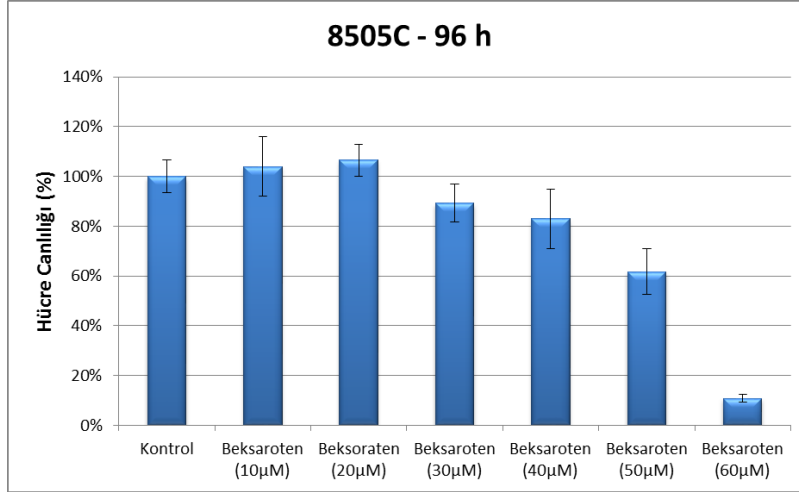
Şekil 4.10. 8505C hücre hattı üzerinde farklı dozlarda 48 saatlik Beksaroten uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

8505C hücre hattı üzerinde 72 saat süresince Beksarotenin artan konsantrasyonları uygulanarak elde edilen Beksaroten konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi Şekil 4.11.'de gösterilmektedir. 72 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu 8505C hücrelerinin canlılığının %50 oranda azaldığı IC₅₀ dozu 50 µM olarak belirlenmiştir.



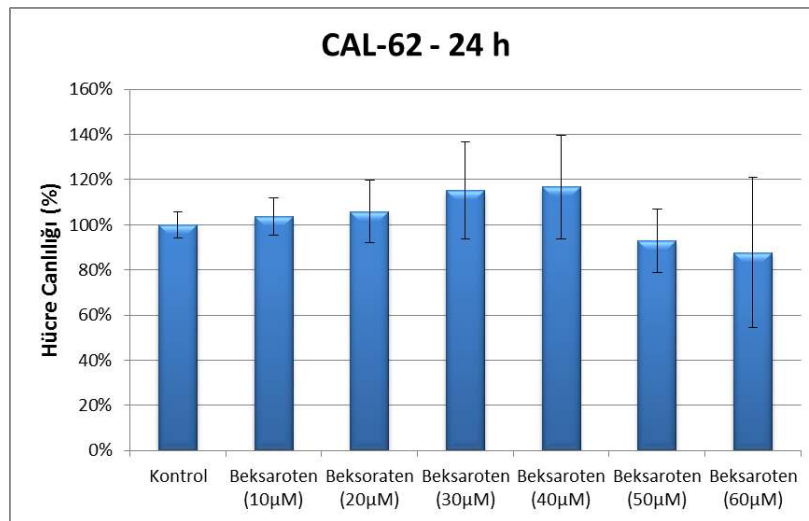
Şekil 4.11. 8505C hücre hattı üzerinde farklı dozlarda 72 saatlik Beksaroten uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

8505C hücre hattı üzerinde 96 saat süresince Beksarotenin artan konsantrasyonları uygulanarak elde edilen Beksaroten konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi Şekil 4.12.'de gösterilmektedir. 96 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu 8505C hücrelerinin canlılığının %50 oranda azaldığı IC₅₀ dozu 51 µM olarak belirlenmiştir.



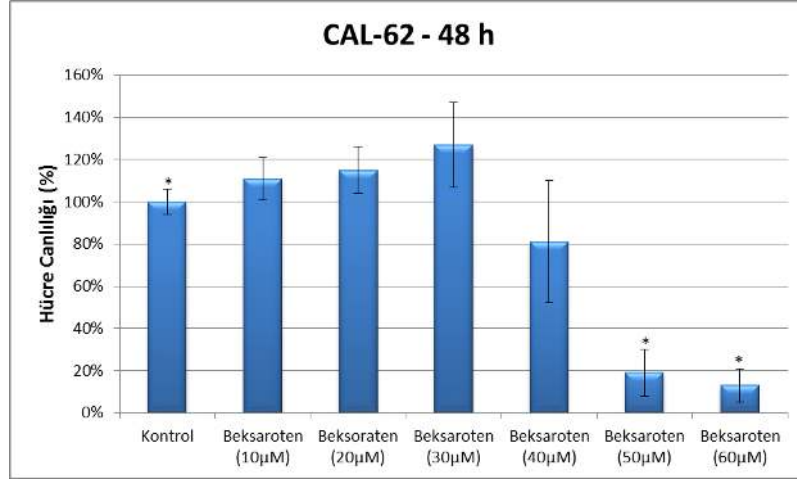
Şekil 4.12. 8505C hücre hattı üzerinde farklı dozlarda 96 saatlik Beksaroten uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

CAL-62 hücre hattında Beksaroten ajanının 60 µM konsantrasyonda ve 24 saatte etkisi belirlenememiştir. 24 saatlik Beksaroten konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi Şekil 4.13.'de gösterilmektedir. 24 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu CAL-62 hücrelerinin canlılığının %50 oranda azaldığı IC₅₀ dozu 60 µM doza kadar belirlenememiştir.



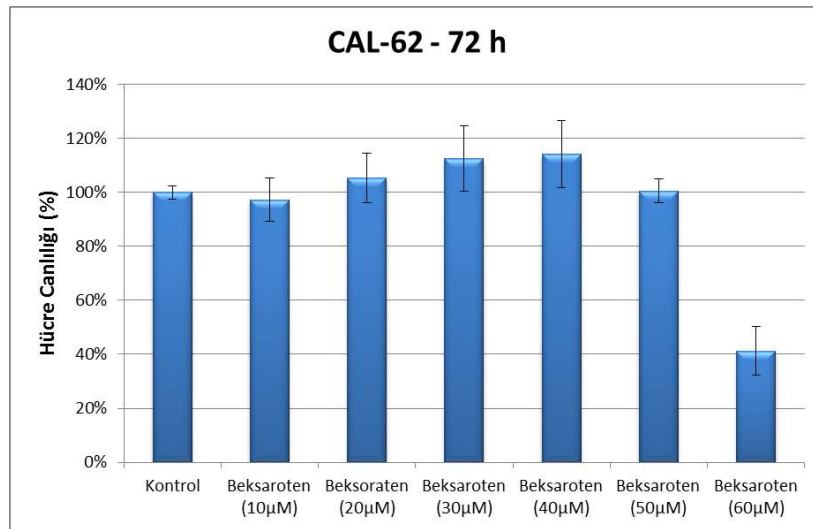
Şekil 4.13. CAL-62 hücre hattı üzerinde farklı dozlarda 24 saatlik Beksaroten uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

CAL-62 hücre hattı üzerinde 48 saat süresince Beksarotenin artan konsantrasyonları uygulanarak elde edilen Beksaroten konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi Şekil 4.14.'de gösterilmektedir. 48 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu CAL-62 hücrelerinin canlılığının %50 oranda azaldığı IC₅₀ dozu 46 µM olarak belirlenmiştir.



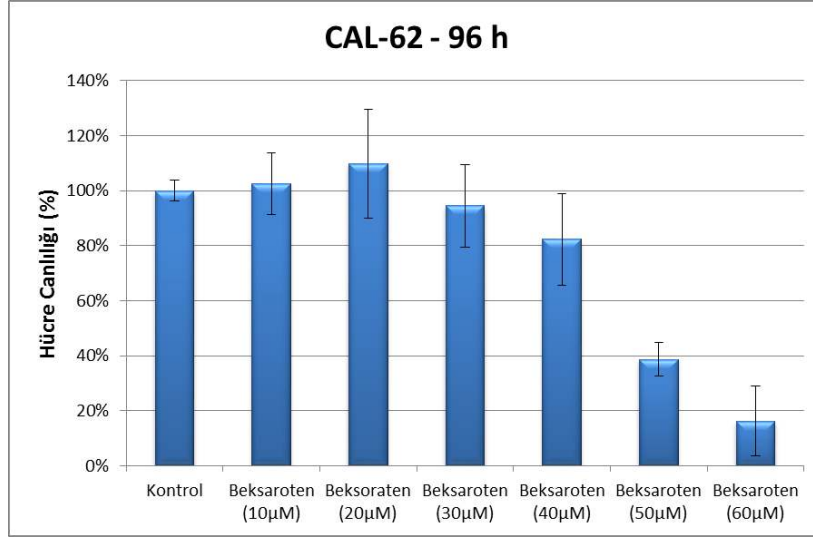
Şekil 4.14. CAL-62 hücre hattı üzerinde farklı dozlarda 48 saatlik Beksaroten uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

CAL-62 hücre hattı üzerinde 72 saat süresince Beksarotenin artan konsantrasyonları uygulanarak elde edilen Beksaroten konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi Şekil 4.15.'de gösterilmektedir. 72 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu CAL-62 hücrelerinin canlılığının %50 oranda azaldığı IC₅₀ dozu 46 µM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.15. CAL-62 hücre hattı üzerinde farklı dozlarda 72 saatlik Beksaroten uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

CAL-62 hücre hattı üzerinde 96 saat süresince Beksarotenin artan konsantrasyonları uygulanarak elde edilen Beksaroten konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi Şekil 4.16.'de gösterilmektedir. 96 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu CAL-62 hücrelerinin canlılığının %50 oranda azaldığı IC₅₀ dozu 54 µM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.16. CAL-62 hücre hattı üzerinde farklı dozlarda 96 saatlik Beksaroten uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

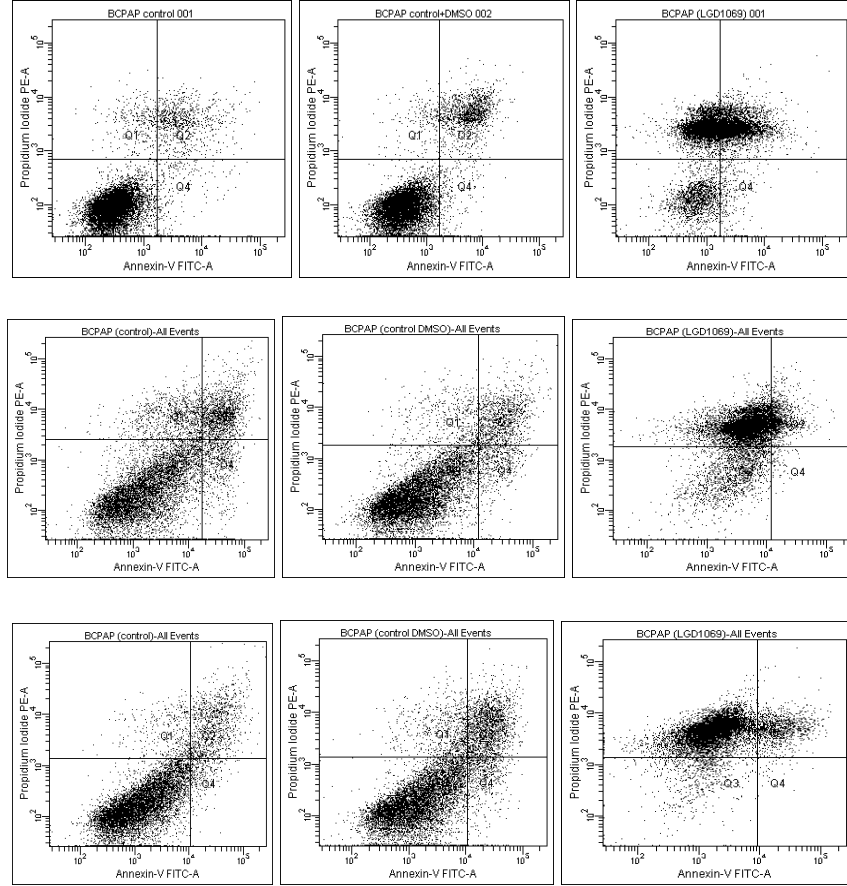
4.2. Akım Sitometrik Analiz Bulguları

4.2.1. Apoptoz Analizi Bulguları

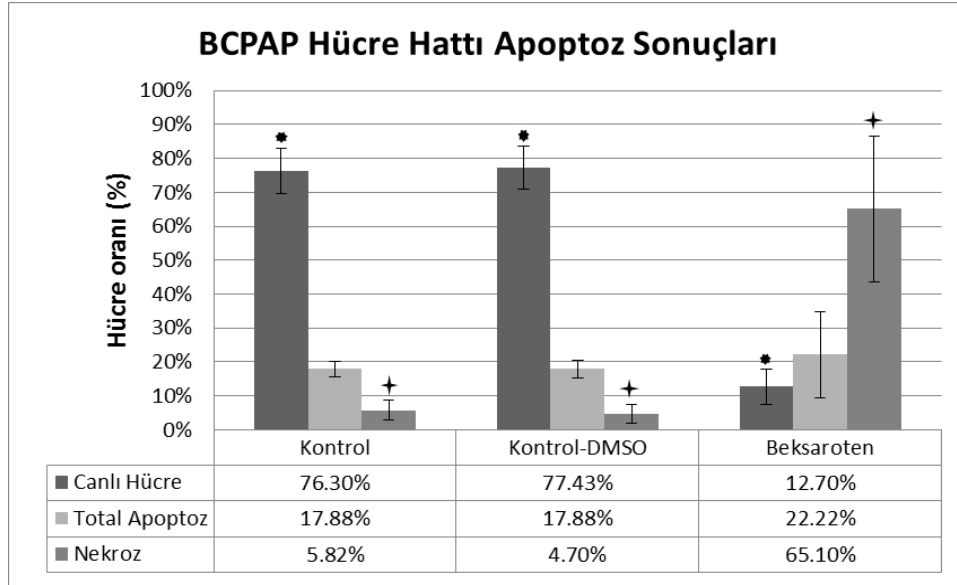
Papiller Tiroid Kanseri hücre hattı olan BCPAP hücreleri, foliküler metastatik tiroid kanseri hücre hattı CGTH-W-1 hücreleri, andiferansiye tiroid kanseri hücre hattı olan 8505C ve anaplastik tiroid kanseri hücre hattı CAL-62 üzerinde Beksaroten, 24, 48, 72 ve 96 saatlik uygulamaların tümünde de 30 µM'a kadar etkisiz bulunmuştur. Bu dozun üzerinde ise doz artışına bağımlı olarak canlılık oranı azalmaktadır. Tüm saatlerdeki ölçümlerden elde edilen IC₅₀ dozları arasında önemli ölçüde fark olmadığından; her hücre hattı için kısa süreli etkiyi değerlendirmek amacıyla akım sitometrik analizlerde 48 saatlik doz seçilmiştir. Bu nedenle akım sitometrik analizlerde kullanılan IC₅₀ dozlar; BCPAP, CGTH-W-1, 8505C ve CAL-62 hücreleri için sırasıyla; 34 µM, 50 µM, 48 µM ve 46 µM olarak belirlenmiştir.

4.2.1.1. BCPAP hücre hattı Apoptoz analizi

Papiller Tiroid Kanseri hücre hattı BCPAP hücreleri üzerinde 48 saatlik 34 μM (IC_{50}) Beksaroten uygulaması ile canlı hücre oranı istatistiksel anlamlı olarak azalmış, nekrotik hücre oranı anlamlı ölçüde artmıştır ($p < 0,05$). Apoptoz analizi bulguları Şekil 4.17. ve 4.18.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. BCPAP hücre hattı üzerinde belirlenen IC_{50} doz (34 μM) ile 48 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik Apoptoz Analizi bulguları.

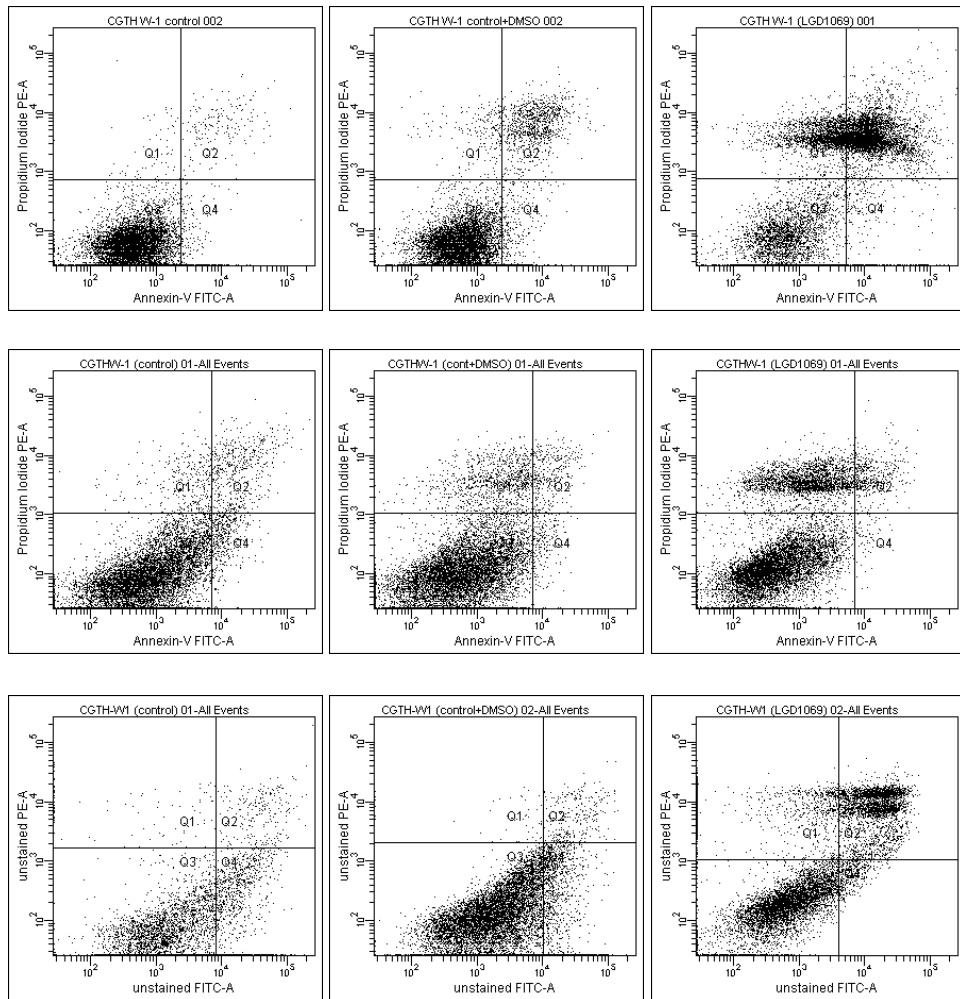


Şekil 4.18. BCPAP hücre hattı - Akım Sitometrik Apoptoz Analizi sonuçları.

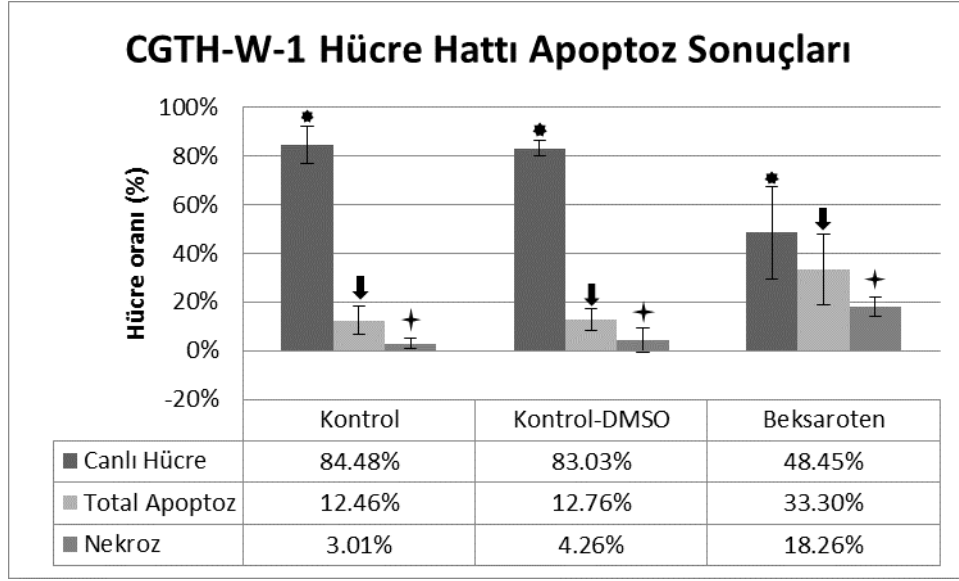
- * Kontrol grubu ve DMSO içeren kontrol grubunun hücre canlılık oranı ile Beksaroten içeren grubun hücre canlılık oranı arasında anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$).
- † Kontrol grubu ve DMSO içeren kontrol grubunun nekrotik hücre oranı ile Beksaroten içeren grubun nekrotik hücre oranı arasında anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$).

4.2.1.2. CGTH-W-1 hücre hattı 50 μ M doz-48 saatlik Beksaroten etkisi

Beksaroten uygulaması, foliküler metastatik tiroid kanseri hücre hattı olan CGTH-W-1 hücrelerinin canlılığını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltmıştır ($p<0,05$). Hücreler anlamlı olarak apoptotik ve nekrotik hücre ölümüne yönelmiştir ($p<0,05$). CGTH-W-1 hücre hattı üzerinde belirlenen IC_{50} doz (50 μ M) ile 48 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik Apoptoz Analizi bulguları Şekil 4.19 ve Şekil 4.20.'de gösterilmektedir.



Şekil 4.19. CGTH-W-1 hücre hattı üzerinde belirlenen IC_{50} doz (50 μ M) ile 48 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik Apoptoz Analizi bulguları.

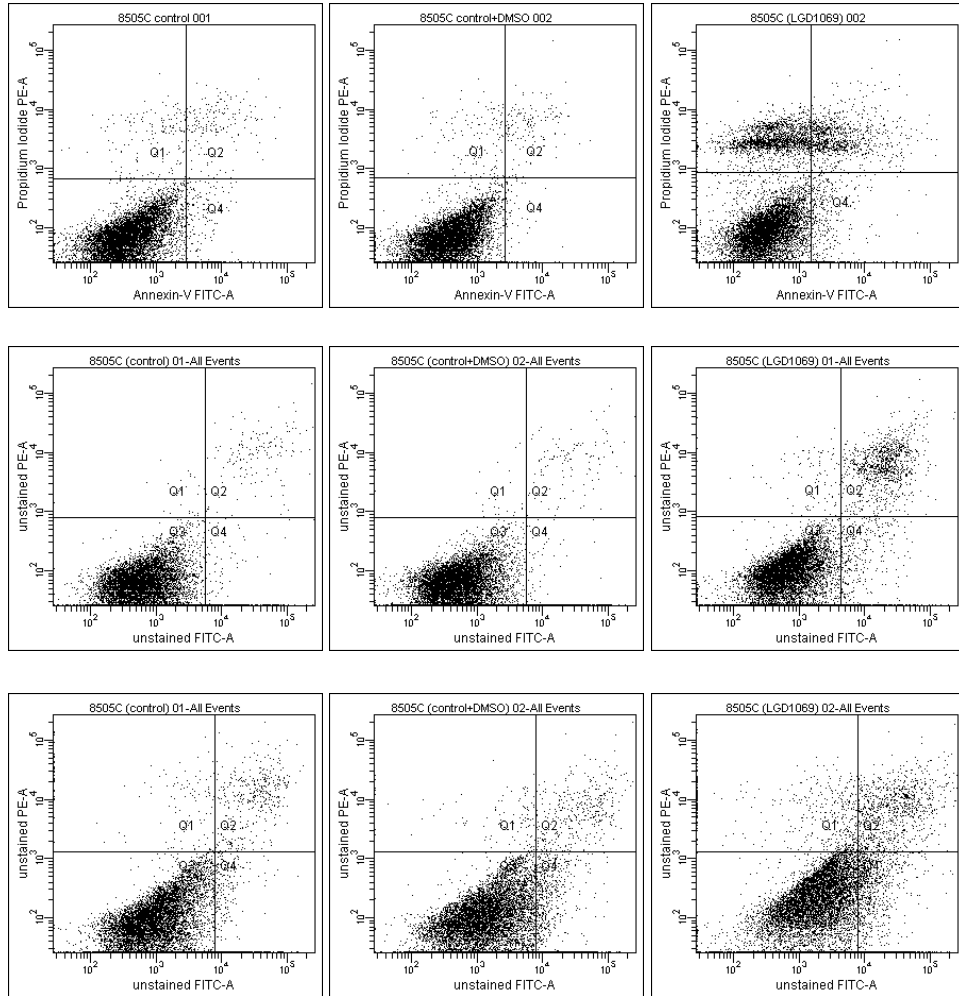


Şekil 4.20. CGTH-W-1 hücre hattı - Akım Sitometrik Apoptoz Analizi sonuçları.

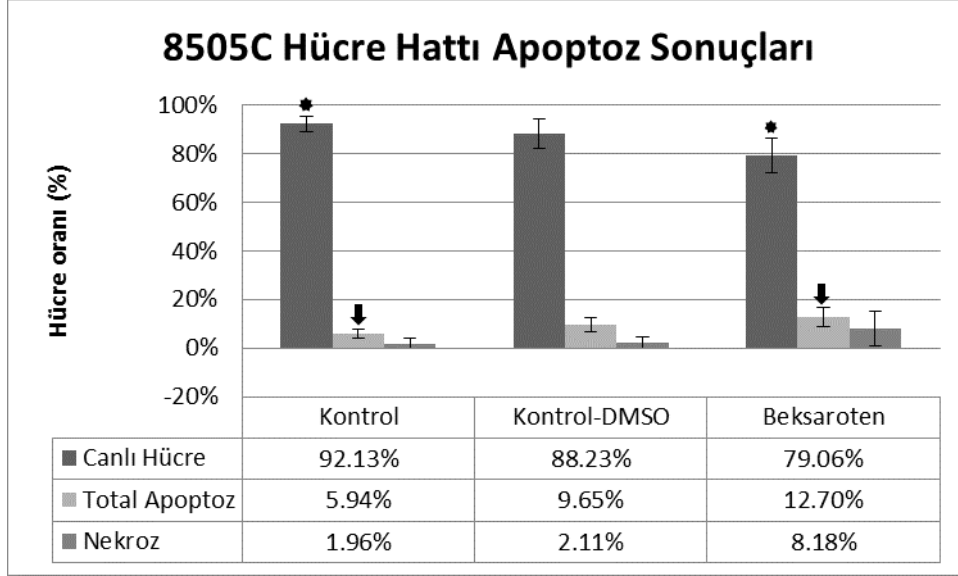
- * Kontrol grubu ve DMSO içeren kontrol grubunun hücre canlılık oranı ile Bekсарoten içeren grubun hücre canlılık oranı arasında anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$).
-   Kontrol grubu ve DMSO içeren kontrol grubunun apoptotik hücre oranı ile Bekсарoten içeren grubun apoptotik hücre oranı arasında anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$).
-   Kontrol grubu ve DMSO içeren kontrol grubunun nekrotik hücre oranı ile Bekсарoten içeren grubun nekrotik hücre oranı arasında anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$).

4.2.1.3. 8505C hücre hattı 48 μ M doz-48 saatlik Beksaroten etkisi

Andiferansiye tiroid kanserini temsil eden hücre hattı 8505C’de Beksaroten uygulaması, hücre canlılık oranını, anlamlı oranda azaltmıştır ($p<0,05$). Apoptotik hücre oranını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artırmıştır ($p<0,05$). 8505C hücre hattı üzerinde belirlenen IC₅₀ doz (48 μ M) ile 48 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik Apoptoz Analizi bulguları Şekil 4.21. ve Şekil 4.22.’de gösterilmektedir.



Şekil 4.21. 8505C hücre hattı üzerinde belirlenen IC₅₀ doz (48 μ M) ile 48 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik Apoptoz Analizi bulguları.

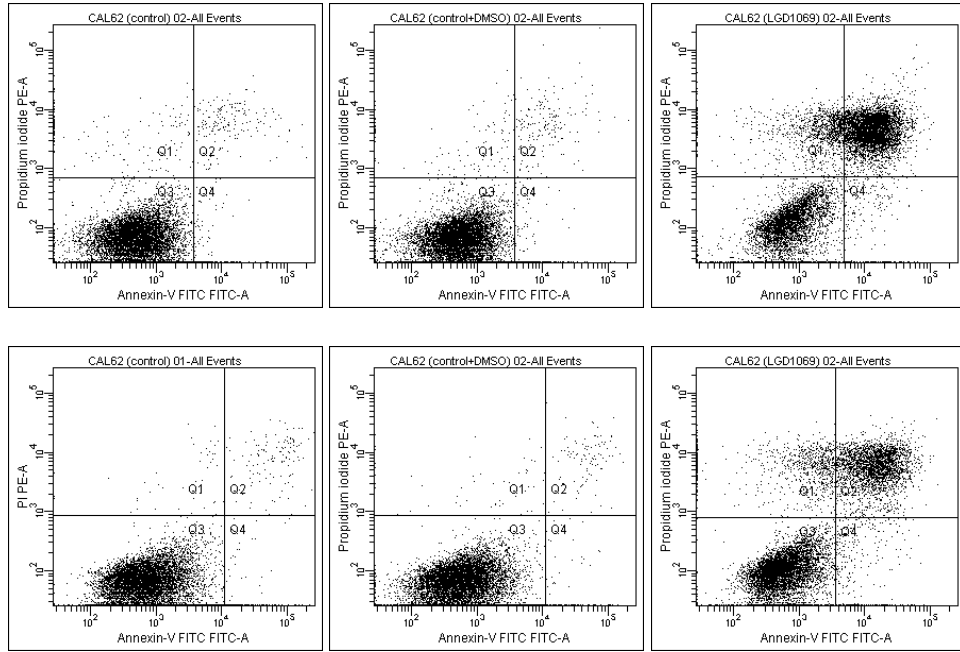


Şekil 4.22. 8505C hücre hattı - Akım Sitometrik Apoptoz Analizi sonuçları.

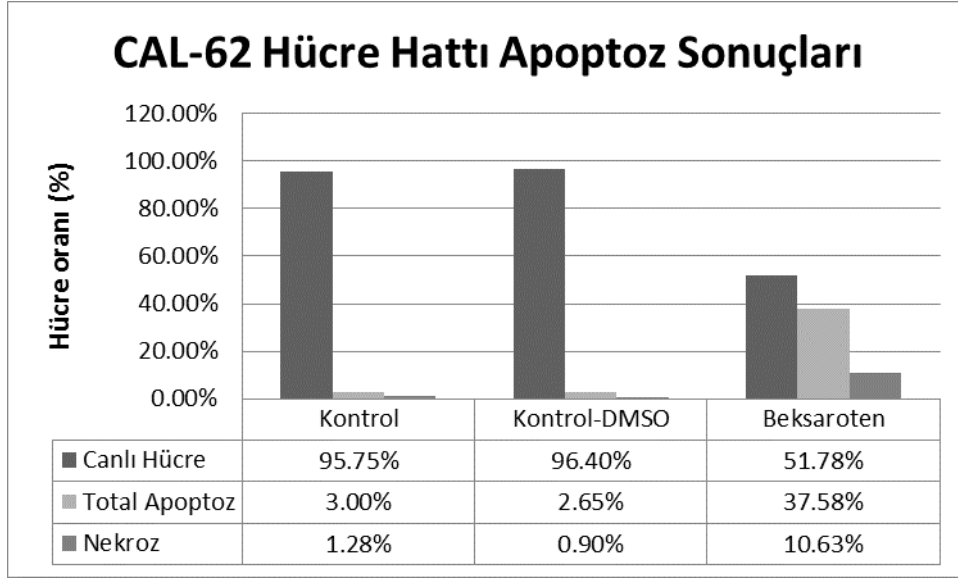
- * Kontrol grubu ve DMSO içeren kontrol grubunun hücre canlılık oranı ile Bekсарoten içeren grubun hücre canlılık oranı arasında anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$).
- ↓ Kontrol grubunun apoptotik hücre oranı ile Bekсарoten içeren grubun apoptotik hücre oranı arasında anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$).

4.2.1.4. CAL-62 hücre hattı 46 μ M doz-48 saatlik Beksaroten etkisi

Beksaroten uygulaması ile anaplastik tiroid kanserini temsil eden CAL-62 hücre hattı hücre canlılığı kontrol grubunda %95,75 oranından %51,78 oranına azalmıştır. Apoptotik hücre oranı kontrol grubunda %3, Beksaroten uygulanan grupta %37,58 oranına artmıştır. Nekrotik hücre oranı ise kontrol grubunda %1,28 oranından Beksaroten uygulaması ile %10,63 oranına yükselmiştir. CAL-62 hücre hattı üzerinde belirlenen IC₅₀ doz (46 μ M) ile 48 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik Apoptoz Analizi bulguları Şekil 4.23. ve Şekil 4.24.'de gösterilmektedir.



Şekil 4.23. CAL-62 hücre hattı üzerinde belirlenen IC₅₀ doz (46 μ M) ile 48 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik Apoptoz Analizi bulguları.

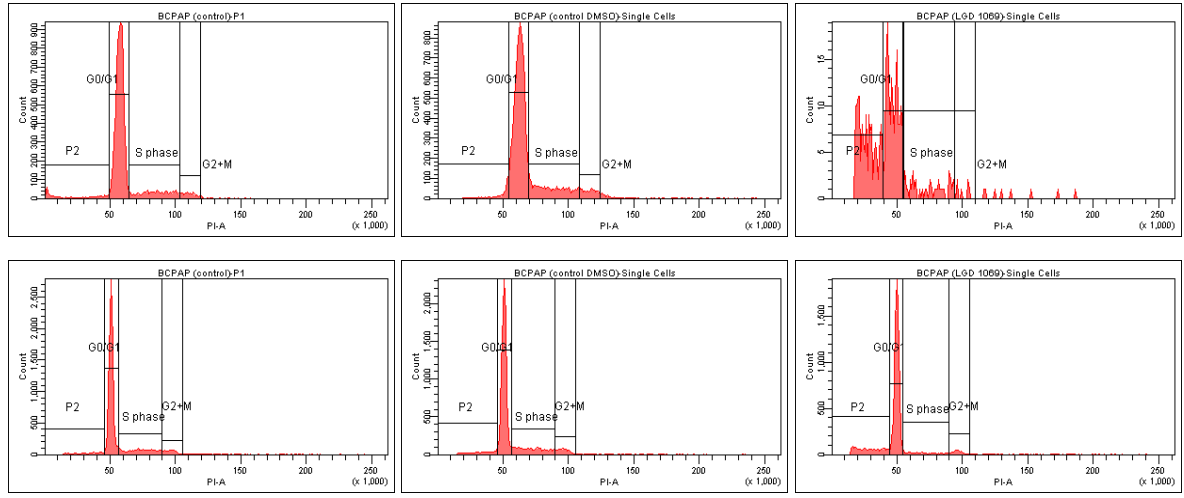


Şekil 4.24. CAL-62 hücre hattı - Akım Sitometrik Apoptoz Analizi sonuçları.

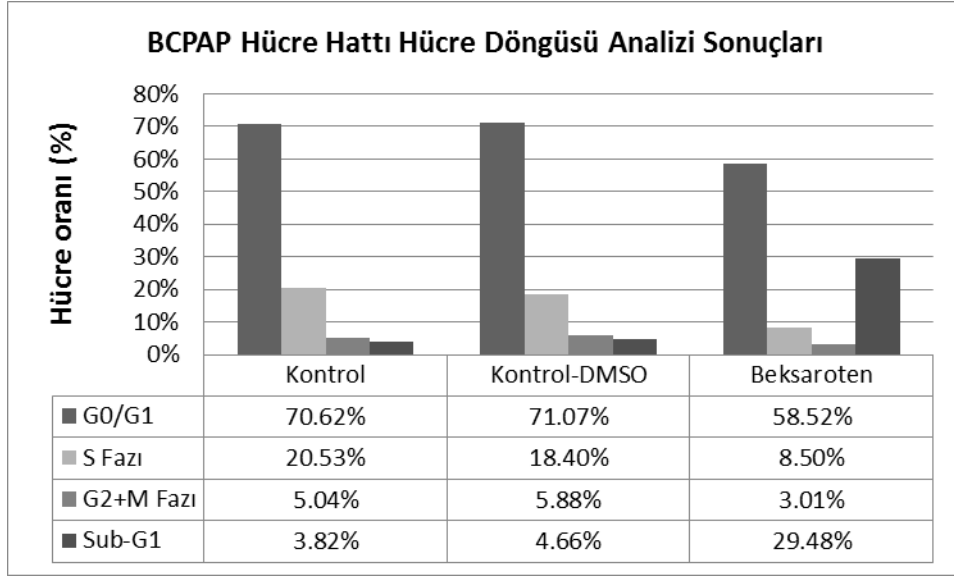
4.2.2. Hücre Döngüsü Analizi Bulguları

4.2.2.1. BCPAP hücre hattı 34 μ M doz-48 saatlik Beksaroten etkisi

Hücre canlılık testinde belirlenen 48 saatlik süre ve 34 μ M'lık IC_{50} dozunda Beksaroten uygulaması ile papiller tiroid kanseri özellikli BCPAP hücrelerinin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre döngüsünün herhangi bir fazında tutulum oranı istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değişmemiştir. BCPAP hücre hattı üzerinde belirlenen IC_{50} doz (34 μ M) ile 48 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik Hücre Döngüsü Analizi bulguları Şekil 4.25. ve Şekil 4.26.'de gösterilmektedir.



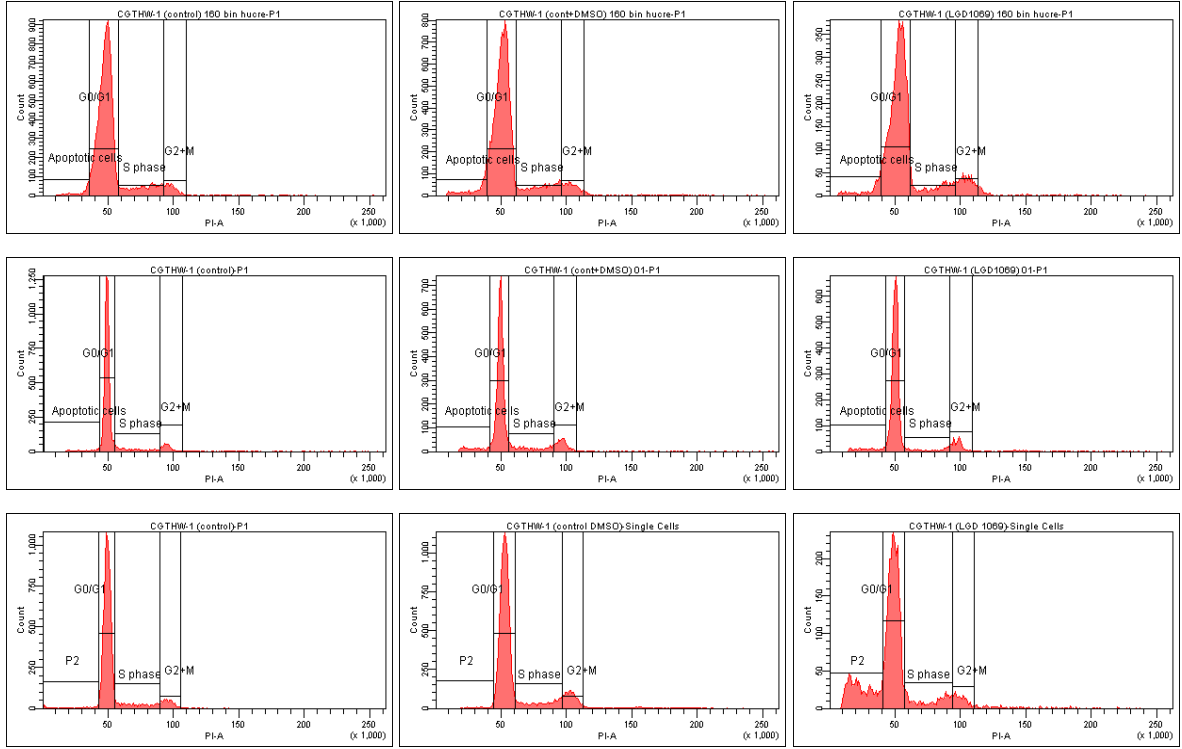
Şekil 4.25. BCPAP hücre hattı üzerinde belirlenen IC_{50} doz (34 μ M) ile 48 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik Hücre Döngüsü Analizi bulguları.



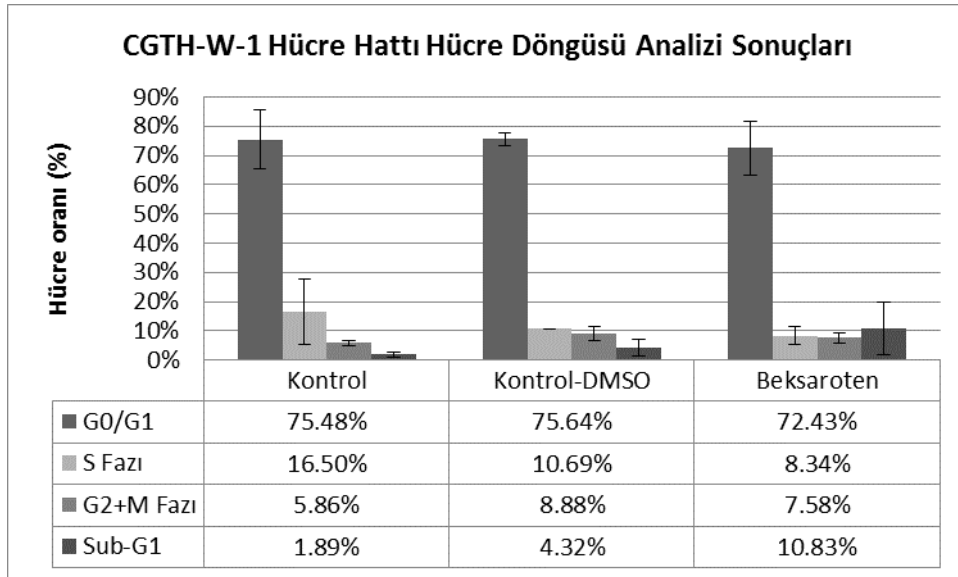
Şekil 4.26. BCPAP hücre hattı - Akım Sitometrik Hücre Döngüsü Analizi sonuçları.

4.2.2.2. CGTH-W-1 hücre hattı 50 μ M doz-48 saatlik Beksaroten etkisi

Hücre canlılık testinde belirlenen 48 saatlik süre ve 50 μ M'lık IC_{50} dozunda Beksaroten uygulaması ile foliküler metastatik tiroid kanseri özellikli CGTH-W-1 hücrelerinin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre döngüsünün herhangi bir fazında tutulum oranı istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değişmemiştir. CGTH-W-1 hücre hattı üzerinde belirlenen IC_{50} doz (50 μ M) ile 48 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik Hücre Döngüsü Analizi bulguları Şekil 4.27. ve Şekil 4.28.'de gösterilmektedir.



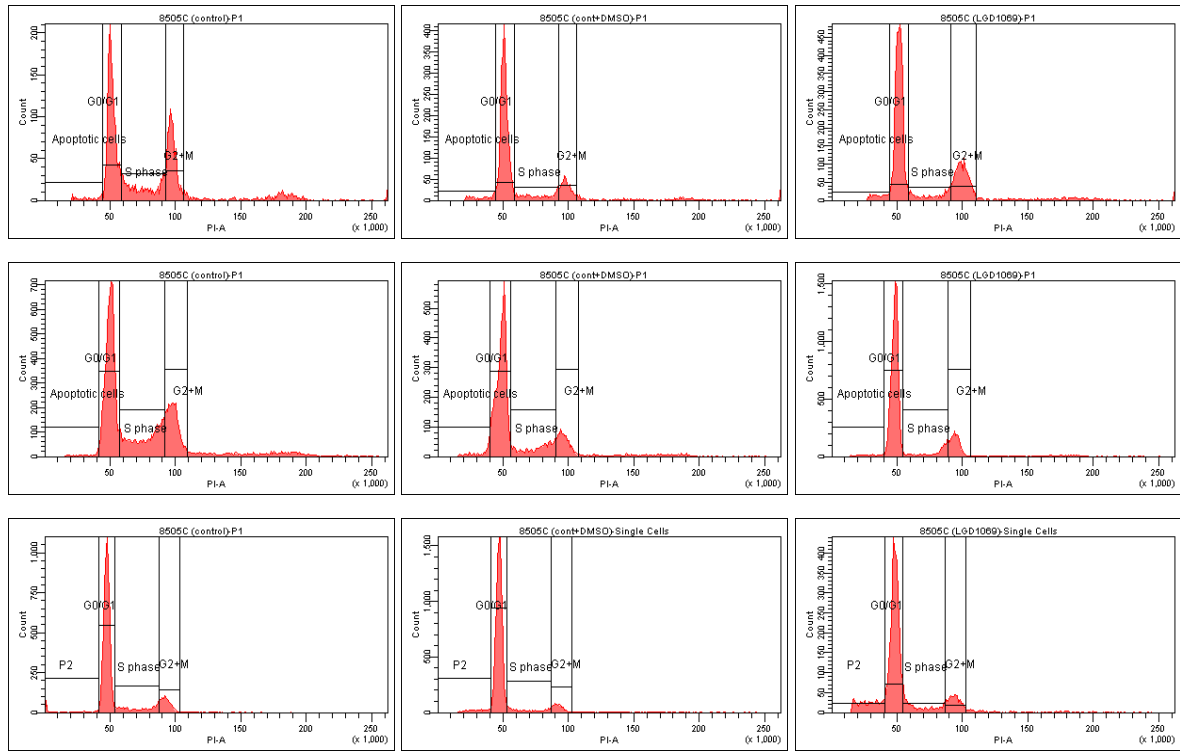
Şekil 4.27. CGTH-W-1 hücre hattı üzerinde belirlenen IC₅₀ doz (50 µM) ile 48 saatlik Bekсарoten uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik Hücre Döngüsü Analizi bulguları.



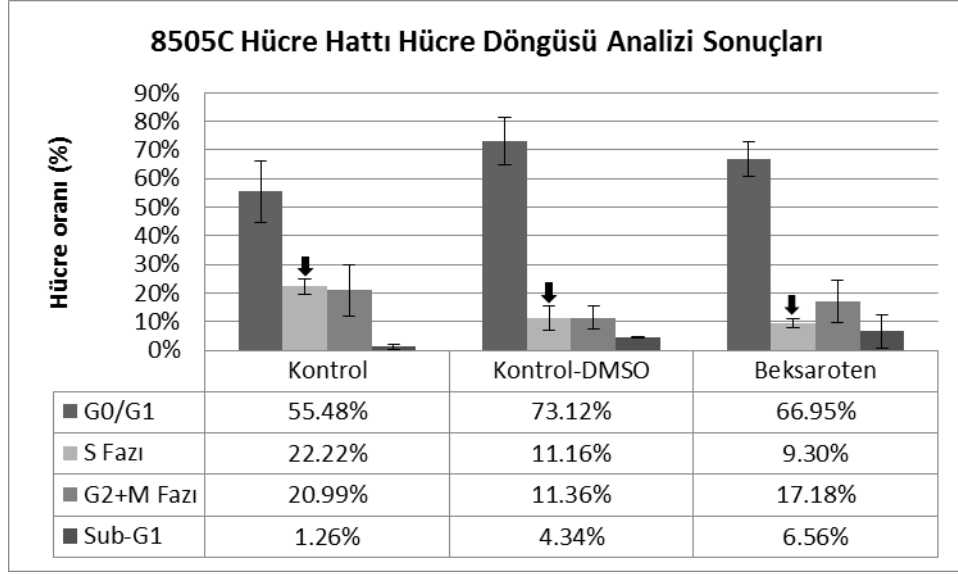
Şekil 4.28. CGTH-W-1 hücre hattı -Akım Sitometrik Hücre Döngüsü Analizi sonuçları.

4.2.2.3. 8505C hücre hattı 48 μM doz-48 saatlik Beksaroten etkisi

Hücre canlılık testinde belirlenen 48 saatlik süre ve 48 μM 'lık IC_{50} dozunda Beksaroten uygulaması ile andiferansiye-anaplastik tiroid kanseri özellikli 8505C hücrelerinin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre döngüsünün herhangi bir fazında tutulum oranı istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değişmemiştir. 8505C hücre hattı üzerinde belirlenen IC_{50} doz (48 μM) ile 48 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik Hücre Döngüsü Analizi bulguları Şekil 4.29. ve Şekil 4.30.'da gösterilmektedir.



Şekil 4.29. 8505C hücre hattı üzerinde belirlenen IC_{50} doz (48 μM) ile 48 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik Hücre Döngüsü Analizi bulguları.

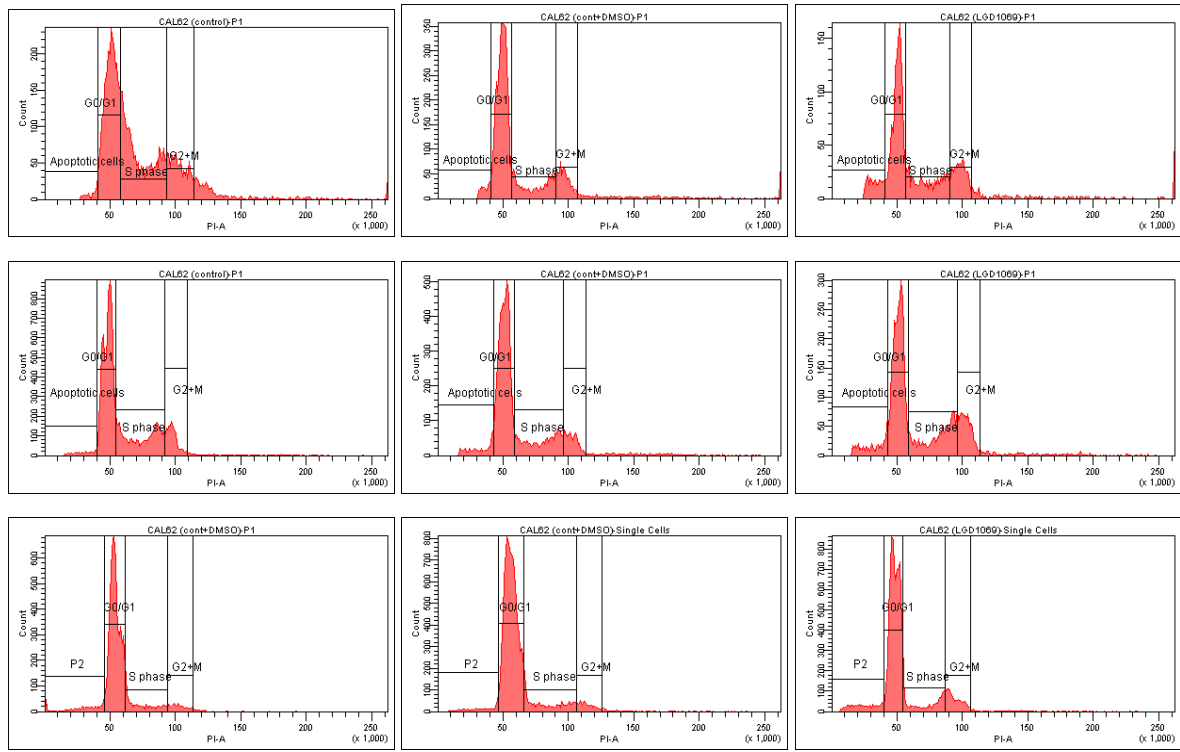


Şekil 4.30. 8505C hücre hattı -Akım Sitometrik Hücre Döngüsü Analizi sonuçları

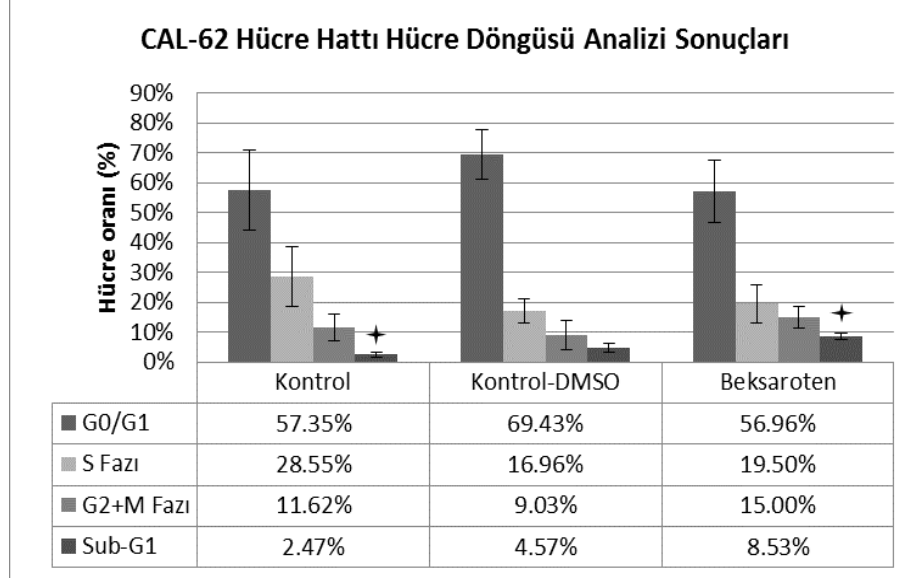
↓ Kontrol grubu ile DMSO içeren kontrol grubu arasında, ve Kontrol grubu ile Beksaroten içeren grup arasında sentez fazında tutulan hücre oranı bakımından anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$).

4.2.2.4. CAL-62 hücre hattı 46 μ M doz-48 saatlik Beksaroten etkisi

Hücre canlılık testinde belirlenen 48 saatlik süre ve 46 μ M'lık IC₅₀ dozunda Beksaroten uygulaması ile anaplastik tiroid kanseri özellikli CAL-62 hücrelerinin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre döngüsünün G0/G1,S ve G2+M aşamalarındaki hücre oranı istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değişmemiş, Sub-G1 aşamasındaki hücre oranı Beksaroten uygulaması ile istatistiksel anlamlı olarak artmıştır (p<0,05). CAL-62 hücre hattı üzerinde belirlenen IC₅₀ doz (46 μ M) ile 48 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik Hücre Döngüsü Analizi bulguları Şekil 4.31. ve Şekil 4.32.'de gösterilmektedir.



Şekil 4.31. CAL-62 hücre hattı üzerinde belirlenen IC₅₀ doz (46 μ M) ile 48 saatlik Beksaroten uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik Hücre Döngüsü Analizi bulguları.



Şekil 4.32. CAL-62 hücre hattı -Akım Sitometrik Hücre Döngüsü Analizi sonuçları

✦ Kontrol grubu ile Beksaroten içeren grup arasında Sub-G1 fazında tutulan hücre oranı bakımından anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$).

4.TARTIŞMA

Çalışmamızda Beksaroten'in diferansiye ve andiferansiye özellikli olan BCPAP (insan papiller tiroid karsinomu), CGTH-W-1 (insan foliküler tiroid karsinomu sternal metastaz), 8505C (insan andiferansiye-anaplastik tiroid karsinomu) ve CAL-62 (insan anaplastik tiroid karsinomu) hücre hatlarında, hücre canlılığına etki, hücre döngüsü, apoptoz ve nekroz üzerine olası etkileri incelenmiştir. Hücre hatları uygun koşullarda kültüre edildikten sonra hücre canlılık testi CCK-8 kullanılarak her hücrenin Beksaroten ajanı ile hücre canlılığının %50'sini inhibe eden doz (IC_{50}) belirlenmiştir. IC_{50} dozlar, BCPAP hücre hattında 34 μM , CGTH-W-1 hücre hattında 50 μM , 8505C hücre hattında 48 μM ve CAL-62 hücre hattında 46 μM olarak saptanmıştır. Belirlenen IC_{50} dozları ile hücreler akım sitometrik olarak apoptoz ve hücre döngüsü analizleri gerçekleştirilmiştir. 48 saatlik Beksaroten uygulamasından sonra elde edilen bulgular, Beksarotenin 8505C hücre hattında hücreleri hücre döngüsünün sentez fazında tutulumunu istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalttığını, CAL-62 hücre hattı hücrelerinin Sub-G1 fazında tutulumunu anlamlı olarak artırdığını göstermiştir. Apoptoz analizleri, Beksaroten bileşiğinin, çalışmada ele alınan hücre hatlarında canlılık oranını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalttığını, apoptotik ve nekrotik hücre ölümü oranlarını artırdığını göstermektedir.

Bir hücrenin doğal gelişimi bölünme, fonksiyonel özelliklerine diferansiye olma ve sonunda hücre ölümüne gitmesi süreçlerini içermektedir. Kanseroz durumda hücrenin doğal gelişim süreci değişime uğrar ve kontrolsüz hücre bölünmesi oluşur. Böylece, hücre büyümesi inhibisyonu ve diferansiyasyon indüksiyonu malignitelerde tedavi için anahtar olabilir.

Vitamin A'nın biyolojik aktif türevleri olan retinoidler pek çok kanser türünde çalışılmış ve hücrenin proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptoz davranışlarında düzenleyici rol oynadıkları gösterilmiştir. Etkilerini hücre içi RAR ve RXR reseptörlerine bağlanarak göstermektedirler (92). Liganda bağımlı olarak ilgili çoklu yolların eş zamanlı uyarılması, neoplastik hastalıkların hedefe yönelik tedavi stratejileri açısından ilgi uyandırmaktadır.

Retinoidlerin tiroid kanseri ile ilgili *in vitro* çalışmalarda da farklılaşma belirteçlerinin ifadesinde düzenleme rolü olması bakımından etkili olduğu belirtilmiştir (6). Tiroid kanser dokuları ve hücre hatlarında RAR ve RXR gen ifadelerinde farklılıklar olduğu gösterilmesi, bu reseptörlerin ligandlarının yanıtının buna bağlı olarak değişebileceğini düşündürmüştür (7,8). Haugen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada RXR gen ifadesi ile retinoid

yanıt arasındaki ilişkiye dikkat çekilerek RAR ve RXR gen ifadelerine göre, hücre büyümesi baskılanması bakımından retinoid yanıtının değiştiği bildirilmektedir (8).

Literatür incelendiğinde, Beksarotenin çalışmamızda odaklandığımız tiroid kanseri hücre hatları üzerinde etkinliğinin incelenmesi ile ilgili bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Yapılan bir çalışmada Beksaroten uygulamasında akciğer kanseri hücrelerinin, kritik kontrol noktaları proteinlerinin düzenlenmeleri yolu ile hücre döngüsünün G1 ve G2\M aşamalarında hapsedildiği ve beraberinde canlılık kaybı ile belirgin proliferasyon inhibisyonu, siklin D1 ekspresyonunda azalma ve sonuç olarak hücre büyümesi inhibisyonuna neden olduğu bildirilmektedir (98). Dragnev ve arkadaşları Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri ile ilgili yaptıkları klinik çalışmada Beksaroten'in siklin D1, siklin D3 ve Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR) gibi biyobelirteçlerin regresyonunu göstermişlerdir (101). Buna ek olarak, Beksarotenin, hem östrojen reseptör negatif meme kanseri oluşumunu prelinik modellerde inhibe ettiği ve siklin D1 gibi büyümeyi düzenleyici biyobelirteçlerin ekspresyonlarını kontrol ettiği belirtilmiştir (109). CTCL hücre hatlarında Beksaroten, hücrelerin hücre döngüsünün G1 fazında tutulumunu artırmıştır (121). Ayrıca Beksarotenin, hayvan çalışmalarında minimal toksisite ile meme tümör gelişimini RXR'lerini aktive ederek (9); ileri meme ve prostat kanserleri ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri gibi tümörlerde edinilmiş ilaç direncini genomik bütünlüğü koruyarak baskıladığı belirlenmiştir (10,11,12). Beksaroten'in, T-hücre lenfomada tedaviye tepkisiz hastaların yanıtını, minimal toksisite ile %50 artırdığı ve solid tümörlerde migrasyon, invazivite ve anjiogenezi azalttığı da saptanmıştır (13). Beksarotenin oral ya da topikal yolla tedavi edildiğinde, çok düşük yan etki ile, tedaviye yanıt vermeyen CTCL'lı hastaların %50'sinde inhibitör etkiyi uyarmıştır (13). Bu klinik yanıtlarla FDA tarafından onaylanmıştır. Faz 2 ve faz 3 çalışmaları Beksaroten'in iyi tolere edildiğini ve güvenilir olduğunu göstermektedir (122). Liu ve arkadaşları tarafından 12 metastatik diferansiye tiroid kanserli hastada yapılan bir çalışmada iyot alımı yetersiz hastalara 6 hafta boyunca Beksaroten tedavisi uygulanmış, 11 hastanın 8'inde iyot alımı indüklenmiştir (123).

Bugüne kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde, Beksarotenin tiroid kanser hücreleri üzerine olası etkilerini inceleyen sadece bir çalışma ile karşılaşılmaktadır. Joshua ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bu çalışmada, Beksaroten, anaplastik tiroid kanseri özelliği gösteren DRO hücre hattında hücre büyümesi üzerine baskılayıcı etki gösterirken, ARO ve FRO hücre hatlarında hücre büyümesi üzerine anlamlı etki göstermemiştir (14). Çalışmada,

DRO hücre hattının, ARO ve FRO hücre hatlarından farklı olarak RXR γ eksprese ettiği vurgulanmış, ayrıca mikroyarray analiz bulgularında Beksarotenin kısa süreli (24 saat) uygulamasında DRO hücrelerinin, aralarında hücre büyümesi ile ilgili genler de bulunan 109 adet gen ifadesinde anlamlı fark gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada, 48 saat Beksaroten uygulaması sonucunda hücre canlılığının %50'sini inhibe eden doz en düşük olarak papiller tiroid kanseri hücre hattı olan BCPAP hücrelerinde, en yüksek olarak ise metastatik foliküler tiroid kanseri hücre hattı CGTH-W-1 hücrelerinde belirlendi. Beksarotenin hücre canlılığı üzerine olan bu azaltıcı etkisi, Joshua ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışmada da (14), Beksarotenin anaplastik tiroid kanseri özellikli hücre hatlarından DRO hücrelerinde saptadıkları hücre canlılığını azaltıcı etkisi ile uyumludur.

Çalışmamızda dört adet tiroid kanseri hücre hattında Beksarotenin 48 saat uygulaması sonucu elde edilen IC₅₀ dozlarının G0/G1, S ve G2+M fazında anlamlı etkisi gözlenmemesine rağmen, anaplastik tiroid kanseri hücre hattı CAL-62 hücrelerinin Sub-G1 fazında tutulumunda anlamlı artış gözlemlendi. Zhang ve arkadaşları CTCL hücre hatları ile yaptıkları çalışmada, çalışmamızda anaplastik tiroid karsinomu hücre hattı olan CAL-62 ile ilgili bulgularımızı destekler şekilde Beksarotenin, kullandıkları hücre hatlarında hücrelerin Sub-G1 fazında hapsedilmesini tetiklediğini bildirmektedirler (85). Aynı zamanda, hücre döngüsü G0/G1, S ve G2+M fazlarında hücre azalışına eşlik eden Sub-G1 fazında istatistiksel anlamlı hücre artışı olduğunu göstermişlerdir ve böylece hücrelerin apoptotik hücre ölümüne girdiğini bildirmektedirler (85). Nicoletti ve arkadaşları da elde ettikleri bulguların bu profile benzer şekilde olduğunu bildirmişlerdir (124). Gerçekleştirdiğimiz bu çalışma, kullandığımız "papiller tiroid kanseri hücre hattı-BCPAP", "foliküler tiroid karsinomu sternal metastaz hücre hattı-CGTH-W-1", "andiferansiye özellikli tiroid kanseri hücre hattı-8505C" ve "anaplastik tiroid kanseri hücre hattı olan-CAL-62" hücreleri üzerine Beksarotenin olası etkilerinin ilk kez incelenmesi bakımından özgündür ve bu nedenle mevcut çalışmalarla birebir karşılaştırma olanağı bulunmamaktadır. Bu alanda yapılan özgün bir çalışma olarak literatüre katkı sağlanacağını düşünmekteyiz.

Apoptotik hücre ölümü çok adımlı ve kontrolünde pek çok gen ürününün katılımı olan bir süreçtir. Zhang ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında CTCL hücre hatlarında Beksaroten uygulamasının kaspaz-3 aktivasyonu ve PARP yıkımı ile Survivin ekspresyonunun azaltılması ile apoptoza yol açtığını rapor etmişlerdir (85). Akut miyeloid lösemi (AML) hücre hattı KG1a hücreleri apoptoza dirençli olma özelliğindedir ve Beksaroten kaspaz-8'i

aktive ederek apoptozu tetiklemiştir. Apoptozu duyarlı AML hücre hattı olan ML-1 hücreleri Bid proteini kesimi ve sitokrom-c salınması yolu ile programlı hücre ölümünü güçlendirmiştir (85). Alyaqub ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında fare akciğer tümörlerinde Beksarotenin kaspaz-3 mRNA'sını, Dnmt-3a, EP3 ve Survivin, Siklin E1, östrojen reseptör-alfa ve iNOS genlerinin ekspresyonlarını azalttığını göstermişlerdir (106).

Bizim çalışmamızda, Beksaroten'in belirlenen IC₅₀ dozlarında 48 saat uygulanması sonucu hücrelerin apoptozu ya da nekrotik hücre ölümüne girme oranları hücre karakterine göre farklı bulunmuştur. Kültürde ikilenme zamanı düşük ve agresif özellikleri, diğer hücre hatlarına göre en düşük olan hücre hattı papiller tiroid kanserini temsil eden BCPAP'tır. Bu hücre hattında hücre canlılığının %50'sini inhibe eden doz en düşük olarak belirlenmiştir (34 µM). Akım sitometrik apoptoz analizi de bu bulguyu doğrular niteliktedir. Hücre canlılığı daha agresif özellikli diğer hücre hatlarına göre daha yüksek oranda etkilenmiş, hücre canlılık oranı %77'den %13'e düşmüştür. Bu hücre hattında apoptotik hücre ölümü anlamlı ölçüde tetiklenmemekle birlikte nekrotik hücre ölümü istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmıştır.

Çalışmamızda dört hücre hattından tek metastatik özellikli olan foliküler metastatik hücre hattında (CGTH-W-1) hücre canlılığının %50'sini inhibe eden Beksaroten dozu diğer hücre hatlarından daha yüksek olarak belirlenmiştir (50 µM). Akım sitometrik analizler sonucu Beksaroten uygulanmayan kontrol grubu canlılığı %84 iken Beksaroten uygulanması sonrası bu oran %48'e düşmüştür. Canlı hücre oranı anlamlı ölçüde azalmış, apoptotik ve nekrotik hücre oranları istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmıştır. Andiferansiye-anaplastik tiroid kanseri özellikli 8505C hücreleri üzerinde Beksaroten ajanının IC₅₀ dozu 48 µM olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu ile Beksaroten grupları karşılaştırıldığında, canlı hücre oranı anlamlı ölçüde azalmış ve apoptotik hücre oranı anlamlı ölçüde artmıştır. Nekroza giren hücre oranında anlamlı olarak fark belirlenmemiştir. Beksaroten, belirlenen doz ve sürede bu hücre hattında hücreleri nekrotik hücre ölümüne değil, apoptotik hücre ölümüne yönlendirmiştir. Anaplastik tiroid kanseri hücre hattı CAL-62 hücrelerinin hücre canlılık testinde Beksaroten uygulamasına verdiği yanıt ile belirlenen doz 46 µM olarak saptanmıştır. Bu doz ile akım sitometrik apoptoz analizi gerçekleştirilmiş ve hücre canlılığı %95,75'den %51,78'ye düşmüştür. Akım sitometrik apoptoz analizi sonucu hücre canlılığının azalması bakımından, hücre canlılığı testi sonucu ile de paraleldir. Apoptotik hücre oranı kontrol grubunda %3 iken, Beksaroten uygulaması ile bu oran %37,58'e ulaşmıştır. Nekrotik hücre oranı da Beksaroten

uygulandığında, %1,28 oranından %10,63'e artmıştır. Bu hücre hattında Beksaroten, apoptotik ve nekrotik hücre ölümünü belirgin ölçüde tetiklemiştir.

Sonuç olarak *in vitro* çalışmamızda, Beksarotenin diferansiye ve andiferansiye tiroid kanseri hücre hatları olan BCPAP, CGTH-W-1, 8505C ve CAL-62 hücreleri üzerine hücre canlılığını azaltıcı, hücre döngüsünü durdurucu, apoptotik ve nekrotik hücre ölümünü artırıcı yönde etkinliği literatürde ilk kez gösterilmiştir. Bulgularımız eşliğinde *in vitro* çalışmamız ileri *in vivo* çalışmalara ışık tutacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada; Bekсарoten (LGD1069) ajanının büyüme inhibe edici özelliklerine dayanarak diferansiye ve andiferansiye tiroid kanserlerine potansiyel antikanser etkinlik özelliği taşımakta olduğunu gösterdik. Bulgularımız eşliğinde, *in vitro* çalışmamız ileri *in vivo* çalışmalara ışık tutacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Sipos JA, Mazzaferri EL. Thyroid cancer epidemiology and prognostic variables. *Clin Oncol. (R Coll Radiol)*, 2010; 22: 395-404.
2. Enewold L, Zhu K, Ron E, Marrogi AJ, ve ark. Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980–2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009; 18: 784–791.
3. National Cancer Institute 2013 Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER). <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>, Erişim Tarihi: 15.01.2013
4. Rane Mehra, MD Roger B, Cohen, MD. New agents in the treatment for malignancies of the salivary and thyroid glands. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2008; 22(6): 1279.
5. Schmutzler C, Brtko J, Bienert K & Kohrle J. Effects of retinoids and role of retinoic acid receptors in human thyroid carcinomas and cell lines derived therefrom. *Exp and Clin Endocrinol and Diabetes*, 1996; 104:16–19.
6. Schmutzler C & Kohrle J. Retinoic acid redifferentiation therapy for thyroid cancer. *Thyroid*, 2000; 10: 393–406.
7. Elisei R, Vivaldi A, Agate L, Ciampi R, ve ark. All-trans retinoic acid treatment inhibits the growth of retinoic acid receptor beta messenger ribonucleic acid expressing thyroid cancer cell lines but does not reinduce the expression of thyroid-specific genes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005; 90: 2403–2411.
8. Haugen BR, Larson LL, Pugazhenth U, Hays WR, ve ark. Retinoic acid and retinoid X receptors are differentially expressed in thyroid cancer and thyroid carcinoma cell lines and predict response to treatment with retinoids. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004; 89: 272–280.
9. Wu K, Kim HT, Rodriquez JL, SG Hilsenbeck, et al. Suppression of mammary tumorigenesis in transgenic mice by the RXR-selective retinoid, LGD1069. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002; 11: 467–474.

10. W.C. Yen, W.W. Lamph. The selective retinoid x receptor agonist bexarotene (LGD1069, Targretin) prevents and overcomes multidrug resistance in advanced breast carcinoma. *Mol. Cancer Ther* 4, 2005; 824–834.
11. W.C. Yen, W.W. Lamph, A selective retinoid X receptor agonist bexarotene (LGD1069, Targretin) prevents and overcomes multidrug resistance in advanced prostate cancer. *Prostate*, 2006; 66: 305–316.
12. W.C. Yen, M.R. Corpuz, R.Y. Prudente, T.A. Cooke, ve ark. A selective retinoid X receptor agonist bexarotene (Targretin) prevents and overcomes acquired paclitaxel (Taxol) resistance in human non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res*, December 15, 2004; 8656–8664.
13. Duvic M, Martin AG, Kim Y, E Olsen, ve ark. Phase 2 and 3 clinical trial of oral bexarotene (Targretin capsules) for the treatment of refractory or persistent early-stage cutaneous T-cell lymphoma. *Arch Dermatol*, 2001; 137: 581–593.
14. Joshua P. Klopper, Andrew Berenz, William R. Hays, Vibha Sharma, ve ark. *In vivo* and microarray analysis of rexinoid-responsive anaplastic thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:589-596.
15. Merino M, Quezado M, Rubin E, Rubin R. Eds: Rubin, Raphael; Strayer, David S. Rubin's pathology: clinicopathologic foundations of medicine, 5th Edition Lippincott Williams & Wilkins, 2008; 566-572.
16. Gökmen FG. Sistematik anatomi: endokrin sistem anatomisi. İstanbul, Nobel, 2003; 295-297.
17. Hagen-Ansert SL. Thyroid gland anatomy. Diagnostic ultrasonography. Mosby Inc. 2006: 395-405.
18. Sarkar SD. Thyroid gland. In: Elgazzar A (ed). The pathophysiologic basis of nuclear medicine. 2nd ed. New York, USA: Springer; 2006: 209-21.
19. Kuzey G. M. Tiroid Bezi Patolojisi; Gököz A. Güneş Kitabevi, İstanbul 2007; 23: 757-770.

20. Charcangiu M L. Thyroid. In Mills SE(eds). Histology for Pathologist. 3th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 2007: 211-23.
21. Deltagen Teknolojileri Histoloji Atlası, http://www.deltagen.com/target/histologyatlas/atlas_files/endocrine/parathyroid_and_thyroid_glands_20x.jpg, Erişim Tarihi: 18.01.2013
22. J.G.H. Hubbard. Endocrine surgery, Springer Specialist Surgery Series, Springer-Verlag London Limited 2009; 10: 978-1007.
23. Tezelman ST, Siperstein AE. Signal transduction in thyroid neoplasms. Clark OH, Duh QY (ed):Textbook of Endocrine Surgery. WB Saunders. Philadelphia. 1997; 28: 214-227.
24. Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature*, 1996; 379: 458.
25. Fujiwara H, Tatsumi K-I, Miki K Harada T, et al. Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the Na⁺/I symporter. *Nat Genet*, 1997; 16: 124.
26. Kopp P. Thyroid hormone synthesis. In: Braverman LE, Utiger RD editors. Werner and Ingbar's The Thyroid: A fundamental and clinical text, 9th ed. Philadelphia: Lippincott- Raven; 2005; 52: 310-316.
27. McLachlan SM, Rapoport B. The molecular biology of thyroid peroxidase: cloning, expression and role as autoantigen in autoimmune thyroid disease. *Endocr Rev*, 1992; 13: 192.
28. Spitzweg C, Morris JC. Sodium iodide symporter (NIS) and thyroid. *Hormones*, 2002; 1(1): 22-34.
29. Guyton AC. Tiroid bezi ve metabolik hormonlar. Tıbbi Fizyoloji. Nobel/W.B.Saunders İstanbul. 1989; 2: 1293-1309.
30. Schussler GC. The thyroxine-binding proteins. *Thyroid*, 2000; 10: 141.
31. Friesema EC, Jansen J, Visser TJ. Thyroid hormone transporters. *Biochem Soc Trans*, 2005; 33: 228.

32. Oetting A, Yen PM. New insights into thyroid hormone action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2007; 21: 193.
33. Yen PM. Physiological and molecular basis of TH action. *Physiol Rev*, 2001; 81: 1097.
34. Bianco AC, Kim BW. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest*, 2006; 116: 2571.
35. Mc Graw Hill Eğitim, http://highered.mcgraw-hill.com/sites/dl/free/0071402357/156720/figure320_3.html, Erişim Tarihi: 19.01.2013
36. Carrasco N. Thyroid iodine transport. In: Braverman LE, Utiger RD editors. Werner and Ingbar's The Thyroid: A fundamental and clinical text, 9th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2005; 38: 310-316.
37. Clifton-Bligh R, Delbridge L. Thyroid physiology. In: Clark, Duh, Kebebew (eds.), Textbook of Endocrine Surgery, 2nd ed. Elsevier Saunders, 2005; 3: 310-316.
38. Shayri M. Kansagra, Christopher R. McCudden, Monte S. Willis. The challenges and complexities of thyroid hormone replacement. *Labmedicine*, 2010; 41: 6.
39. Chen AY, Jemal A, Ward EM. Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988–2005. *Cancer*, 2009; 115: 3801–3807.
40. Reynolds RM, Weir J, Stockton DL, Brewster DH, Sandeep TC, Strachan MW. Changing trends in incidence and mortality of thyroid cancer in Scotland. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2005; 62: 156–162.
41. Lubina A, Cohen O, Barchana M, Liphshiz I, Vered I, Sadetzki S, Karasik. A 2006 Time trends of incidence rates of thyroid cancer in Israel: what might explain the sharp increase. *Thyroid*, 2006; 16: 1033–1040.
42. Schlumberger MJ, Filetti S, Hay ID. Thyroid neoplasia. In Williams Textbook of Endocrinology. Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR. 11th ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 2008; 11: 420- 42.

43. Alessandri AJ, Goddard KJ, Blair GK, Chris JH., et al. Age is the major determinant of recurrence in pediatric thyroid carcinoma. *Med Pediatr Oncol*, 2000; 35: 41-46.
44. Carling T, Udelsman R: Thyroid tumors. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds.: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 7th Edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005; 34: 1502-19.
45. Mirallié E, Guilan T, Bridji B, Resche I, ve ark. Therapeutic impact of 18FDG-PET/CT in the management of iodine-negative recurrence of differentiated thyroid carcinoma. *Surgery*, 2007; 142: 952-958.
46. DeLellis R, Williams ED. Tumors of the thyroid and parathyroid. *Tumors, Pathology And Genetics of Endocrine Organs*, WHO Blue Books Lyon IARC Pres, 2004; 1: 49-133.
47. Classification of Primary Thyroid Tumours, Online Seminars and tutorials, Department of Pathology, SGPGIMS, Lucknow, India, 2006; 34: 1502-19.
48. Robbins and Kumar. *Basic Pathology*. 4th ed. Chapter 20. Published by W.B. Saunders Company, Philadelphia 1987: 684-687.
49. Winship T, Rosvoll RV: Childhood thyroid carcinoma. *Cancer*, 1961, 14: 734-743.
50. Oliveira MJ, de Oliveira, JMP. Treatment of differentiated thyroid carcinoma. In: Eary JF, Brenner W (ed). *Nuclear Medicine Therapy*. Informa Healthcare. New York, USA, 1st ed., 2007; 1: 45-75.
51. Marino Melillo R, Domenica Castellone M, Guarino V, De Falco V, Cirafici AM, Salvatore G. The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J Clin Invest*, 2005; 115 (4): 1068-81.
52. Massimo S, Mellillo RM, Fusco A. Ret/Ptc activation in papillary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol*, 2006; 155: 645- 53.
53. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos T. Richard, ve ark. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*, 2009; 19: 1-48.

54. Farid NR, Shi Y, Zou M: Molecular basis of thyroid cancer. *Endocr Rev*, 1994; 15: 202-232.
55. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander KE, ve ark: RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003; 88: 2318-2326.
56. Collins SL. Thyroid cancer: controversies and etiopathogenesis. In thyroid disease: second edition: Falk SE. Lippincot Raven. Philedelphia, 1997; 2: 495-564.
57. Schlumberger MJ, Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Eng J Med*, 1998; 338: 297-306.
58. Frich L, Akslen LA, Glatte E: Increased risk of thyroid cancer among Norwegian women married to fishery workers a retrospective cohort study. *Br J Cancer*, 1997; 76(3): 385-389.
59. Alagöl F. Tiroid Nodülü ve Tümörleri. Editör: Ergin S. Endokrinoloji, Metabolizma ve Beslenme Hastalıkları. Nobel Tıp Kitapevi, 2001: 146-153.
60. Zubair W. Baloch, Virginia A. LiVolsi. The thyroid gland. In: Steven G. Silverberg. Silverberg's surgical pathology and cytopathology, 2006; 4: 2119-2149.
61. Schneider AB, Ron E. Carcinoma of follicular epithelium. In: Braverman LE, Utiger RD (eds). Werner and Ingbar's the Thyroid (8th ed). Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000: 878-886.
62. Mack WJ, Preston S, Epidemiology of thyroid cancer. In: Thyroid Cancer Kluwer Academic Publishers, Boston, 1998; 1-25.
63. Schlumberger M, Pacini F. Thyroid tumors. Editions Nucleon. Paris, 1999; 1-25.
64. Giordano TJ, Kuick R, Thoma DG, Misek DE, ve ark. Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS and RET/PTC mutation spesific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. *Oncogene*, 2005; 24: 6646-6656.

65. Fagin J.A. Molecular pathogenesis of human thyroid neoplasms. *Thyroid Today*, 1994; 17: 1-7.
66. Sadler GP, Clark OH. Thyroid and parathyroid. Schwartz's principles of surgery, 7th ed. McGraw-Hill. New York, 1999; 36: 1661-1687.
67. Muro-Cacho CA, Ku NN. Tumors of the thyroid gland: histologic and cytologic features part 1. *Cancer Control*, 2000; 3: 276-287.
68. Hussain HK, Britton KE, Grossman AB, Reznick RH. Thyroid cancer. In: Husband JE, Reznick RH (eds). *Imaging in Oncology*. 2nd ed. London, 2004; 2: 669-709.
69. Hedinger C, Williams ED, Sobin LH: The WHO histological classification of thyroid tumors: a commentary on the second edition. *Cancer*, 1989; 63(5): 908-911.
70. Mete D, Tiroid Kanseri. Diferansiyel tiroid kanserlerinde cerrahi patoloji. *Nobel Tıp*, 2005; 35-48.
71. Isirangkul W. Dense fibrosis. Another diagnostic criterion for papillary thyroid carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*, 1993; 117: 645-646.
72. Jameson J.L, Weetman A.P: Thyroid Cancer. 'Harrison's principles of internal medicine, Editörler: E.Braunwald, A.S Fauci.D.L.Kasper, S.L.Hauser, D.L.Longo, J.L.Jameson, 2001; 15: 2079-2083.
73. Noguchi M, Yamada H, Ohta N, Ishida T, Tajiri K, Fujii H, Miyazaki I: Regional lymph node metastases in well-differentiated thyroid carcinoma. *Int Surg*, 1987; 72: 100-103.
74. Mazzaferri E.L:Radioiodine and other treatment and outcomes: 'Werner and Ingbar's the Thyroid , Editörler : L.E.Braverman, R.D Utiger, 2000; 8: 904-929.
75. Maitra A. The Endocrine System. In Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN, *Robins Basic of Pathology*. 8th ed. Saunders 2008; 8: 970-1007.
76. Matias-Gulu X, DeLellis R, Lloyd RV, Heitz PU, ve ark. Medullary Carcinoma. Tumors of Endocrine Organs, WHO Blue Books Lyon IARC 2004; 1: 49-133.
77. Biersack HJ, Grünwald F(ed). Thyroid Cancer. Second edition, Springer Verlag Berlin Heidelberg, New York, 2005; 1-21.

78. Pacini F, DeGroot L.J: Thyroid Neoplasia. *Endocrinology*, 2001; 4: 1541-1566.
79. Byar DP, Green SB, Dor P, Williams ED, ve ark. A prognostic index for thyroid carcinoma: a study of the EORTC Thyroid Cancer Cooperative Group. *Eur J Cancer*, 1979; 15: 1033-1041.
80. Tisell LE, Dilley WG, Wells SA Jr. Progression of postoperative residual medullary thyroid carcinoma as monitored by plasma calcitonin levels. *Surgery*, 1996; 119: 34-39.
81. Sherman S.I.:Thyroid Carcinoma (Seminar). *Lancet*, 2003; 361: 501-11.
82. AJCC Cancer Staging Manual. 7th edition. New York: Springer-Verlag. Reproduced by permission from: Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center. Dean, DS, Hay, ID. Prognostic indicators in differentiated thyroid carcinoma. *Cancer Control*. 2002; 7(3): 229-239.
83. Rossella Elisei, Agnese Vivaldi, Laura Agate, Raffaele Ciampi ve ark. All-Trans-Retinoic Acid treatment inhibits the growth of retinoic acid receptor messenger ribonucleic acid expressing thyroid cancer cell lines but does not reinduce the expression of thyroid-specific genes. *J Clin Endocrinol Metab*, April 2005, 90(4):2403–2411.
84. Audrey Cras, Béatrice Politis, Nicole Balitrand, Darsin-Bettinger Diane, ve ark. Bexarotene via CBP/p300 induces suppression of NF-κB dependent cell growth and invasion in thyroid cancer. *Clin Cancer Res*, 2012; 18: 442-453.
85. Chunlei Zhang, Parul Hazarika, Xiao Ni, Douglas A, ve ark. Induction of apoptosis by bexarotene in cutaneous t-cell lymphoma cells: relevance to mechanism of therapeutic action. *Clin Cancer Res* 2002;8:1234-1240.
86. Sherman SI, Angelos P, Ball DW, Brenda K Edwards, ve ark. Thyroid carcinoma. *J Natl Compr Canc Netw*, 2007; 5: 568.
87. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, ve ark. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol*, 2006; 154: 787.
88. Shimaoka K, Schoenfeld DA, DeWys WD, Creech RH, DeConti R: A randomized trial of doxorubicin versus doxorubicin plus cisplatin in patients with advanced thyroid carcinoma. *Cancer*, 1985; 56(9): 2155-2160.

89. Fenaux P, Chomienne C, Degos L. All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Semin Hematol*, 2001; 38(1): 13–25.
90. Oregon State Üniversitesi, Linus Pauling Enstitüsü, Mikronutrient Bilgi Merkezi, <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/vitaminA/rxr.html>, Erişim Tarihi: 16.04.2013
91. Dragnev KH, Rigas JR, Dmitrovsky E. The retinoids and cancer prevention mechanisms. *Oncologist*, 2000; 5: 361–368.
92. Niles RM. Recent advances in the use of vitamin A (retinoids) in the prevention and treatment of cancer. *Nutrition*, 2000; 16: 1084–1089.
93. Toma S, Raffo P, Isnardi L, Palumbo R, ve ark. Retinoids in lung cancer chemoprevention and treatment. *Ann Oncol*, 1999; 10: 95–102.
94. Simon D, Korber C, Krausch M, Segering J, ve ark. Clinical impact of retinoids in redifferentiation therapy of advanced thyroid cancer: final results of a pilot study. *Eur Jour of Nuc Med*, 2002; 29: 775–782.
95. Umesono K, Evans RM. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell*, 1989; 57: 1139–46.
96. Sun SY, Lotan R. Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002; 41: 41–55.
97. Crowe DL, Chandraratna RA. A retinoid X receptor (RXR)-selective retinoid reveals that RXR-alpha is potentially a therapeutic target in breast cancer cell lines, and that it potentiates antiproliferative and apoptotic responses to peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Breast Cancer Res*, 2004; 6: 546–555.
98. James R, Rigas, Konstantin H, Dragnev. Emerging role of rexinoids in non-small cell lung cancer: focus on bexarotene. *The Oncologist*, 2005; 10: 22-33.
99. Langenfeld J, Kiyokawa H, Sekula D, Boyle J, ve ark. Posttranslational regulation of cyclin D1 by retinoic acid: a chemoprevention mechanism. *Proc Natl Acad*, 1997; 94: 12070–12074.
100. Uray IP, Shen Q, Seo HS, Kim H, ve ark. Rexinoid-induced expression of IGFBP-6 requires RARbeta-dependent permissive cooperation of retinoid receptors and AP-1. *J Biol Chem*, 2009; 284(1): 345–353.

101. Dragnev KH, Petty WJ, Shah SJ, Lewis DL, ve ark. A proof-of-principle clinical trial of bexarotene in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2007; 13: 1794–1800.
102. Lucia Altucci, Hinrich Gronemeyer. Nuclear receptors in cell life and death. Trends in Endocrinology & Metabolism, Volume 12, Issue 10, 1 December 2001, Pages 0–468.
103. Reddig PJ, Juliano RL. Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev*, 2005; 24: 425–439.
104. Ying SX, Seal S, Abbassi N ve ark. Differential effects of bexarotene on intrinsic and extrinsic pathways in TRAIL-induced apoptosis in two myeloid leukemia cell lines. *Leuk Lymphoma*, 2007; 48: 1003–1014.
105. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, ve ark. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, Caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res*, 1998; 58: 5315–5320.
106. Alyaqoub FS, Liu Y, Tao L, Steele VE, ve ark. Modulation by bexarotene of mRNA expression of genes in mouse lung tumors. *Mol Carcinog*, 2008; 47: 165–171.
107. Cesario RM, Stone J, Yen WC, Bissonnette RP, Lamph WW. Differentiation and growth inhibition mediated via the RXR:PPARgamma heterodimer in colon cancer. *Cancer Lett*, 2006; 240: 225–233.
108. Kizaki M, Dawson MI, Heyman R, Elster E, ve ark. Effects of novel retinoid X receptor-selective ligands on myeloid leukemia differentiation and proliferation in vitro. *Blood*, 1996; 87: 1977–1984.
109. Wu K, Zhang Y, Xu XC, J Hill, ve ark. The retinoid X receptor selective retinoid, LGD1069, prevents the development of estrogen receptor-negative mammary tumors in transgenic mice. *Cancer Res*, 2002; 62: 6376–6380.
110. Yen WC, Prudente RY, Lamph WW. Synergistic effect of a retinoid X receptor-selective ligand bexarotene (LGD1069, Targretin) and paclitaxel (Taxol) in mammary carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, 2004; 88: 141–148.
111. Tanaka T, Suh KS, Lo AM, De Luca LM. p21WAF1/ CIP1 is a common transcriptional target of retinoid receptors: pleiotropic regulatory mechanism through RAR/RXR heterodimer and RXR/RXR homodimer. *J Biol Chem*, 2007; 282: 29987–29997.

112. Takemi Tanaka, Luigi M. De Luca. Therapeutic Potential of "Rexinoids" in Cancer Prevention and Treatment. *Cancer Res*, 2009; 69: 12.
113. Fabien, N., Fusco, A., Santoro, M., Barbier, Y., Dubois, P. M., Paulin, C. Description of a human papillary thyroid carcinoma cell line. Morphologic study and expression of tumoral markers. *Cancer*, 1996; 8: 2206-2212.
114. Lin, J. D., Chang, H. Y., Ho, Y. S., Weng, H. F. The Role of Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) in follicular thyroid cancer cell line CGTH W-1. *In Vitro Cell Dev. Biol*, 1995; 31: 817-821.
115. Gioanni, J. Zanghellini, E. Mazeau, C. Zhang, D. Courdi, A. Farges, M, Lambert, J. C. Duplay, H. Schneider, M. Characterization of a human cell line from an anaplastic carcinoma of the thyroid gland. *Bulletin du cancer*, 1991; 78(11): 1053-1062.
116. Ito, T., Seyama, T., Hayashi, Y., Hayashi T. ve ark. Establishment of two human thyroid carcinoma cell lines (8305C, 8505C) bearing p53 gene mutations. *Int J Oncol*, 1994; 4: 583-586.
117. Lee, E.C. Cytogenetic Analysis of Continuous Cell Lines. In *The ACT Cytogenetic Laboratory Manual*, Raven Press, New York. 2nd ed. 1991; 2: 107-148.
118. Paul Held Ph. D. Senior Scientist, Applications Dept., BioTek Instruments, Inc., An Absorbance-based Cytotoxicity Assay using High Absorptivity, Water-soluble Tetrazolium Salts, 2009.
119. eBIOSCIENCE Akım Sitometri protokolleri, <http://media.ebioscience.com/data/pdf/best-protocols/annexin-v-staining.pdf>, Erişim Tarihi: 12.02.2013
120. eBIOSCIENCE Akım Sitometri protokolleri, <http://media.ebioscience.com/data/pdf/best-protocols/cell-preparation-for-flow-cytometry.pdf>, Erişim Tarihi: 12.02.2013
121. Bischoff ED, Heyman RA, Lamph WW. Effect of the retinoid X receptor-selective ligand LGD1069 on mammary carcinoma after tamoxifen failure. *J Natl Cancer Inst*, 1999; 91(24): 2118.
122. Duvic M, Hymes K, Heald P, Breneman D, Martin AG, Myskowski P, Crowley C, Yocum RC. Bexarotene is effective and safe for treatment of refractory advanced-

stage cutaneous T cell lymphoma: Multinational phase II-III trial results. *J Clin Oncol*, 2001; 19(9): 2456–2471.

- 123.** Liu YY, Stokkel MP, Pereira AM, Corrsmit EP, ve ark. Bexarotene increases uptake of radioiodide in metastases of differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol*, 2006; 154: 525–531.
- 124.** Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., and Riccardi. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 1991; 139: 271–279.

8. EKLER

Etik Kurul Raporu

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	83-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☒ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Selaktif RXR Ligandının Troid Kanseri Hücre Hatları Üzerinde Etkinliği
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr.Hilal KOÇDOR Onk.Ens.Temel Onk.B.D. Yük.Lis.Öğr.Pinar KEMANLI
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐	İngilizce ☒	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2011/05-04	Tarih:25.02.2011
	Doç.Dr.Hilal KOÇDOR'un sorumlusu Yük.Lis.Öğr. Pınar KEMANLI'nın proje yürütücüsü olduğu "Selaktif RXR Ligandının Troid Kanseri Hücre Hatları Üzerinde Etkinliği" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurullar Yönetmeliği, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Banu</i>
Prof.Ph.D.Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEÜ Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Besti</i>
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Osman</i>
Prof.Ph.D.Z.Candan ALGUN	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek okulu	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Z.Candan</i>
Prof.Ph.D.Zuhai BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEÜ Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Zuhai</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEÜ Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Nejat</i>
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Ömer</i>
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Ece</i>
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Hüseyin</i>
Doç.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Servet</i>
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Mukaddes</i>
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKUTUK	Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Ayşe</i>
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>İşıl</i>
Prof.PhD Meltem Katlı GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Meltem</i>
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	<i>İhsan</i>

Özgeçmiş

Adı Soyadı	Pınar KEMANLI
Doğum Yılı	1986
Yazışma Adresi	Dokuz Eylül Üniv. SBE Moleküler Tıp AD. İnciraltı/İZMİR
e-posta	pinarkemanli@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniv.	SBE	Moleküler Tıp AD	Y.Lisans	2013
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyokimya Böl.	Lisans	2009

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	SBE Moleküler Tıp AD.	Y. Lisans öğrencisi (Tez çalışması)	2010-2013
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Temel Onkoloji Enstitüsü	Stajyer	2010 (1 ay)
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Merkez Lab.	Stajyer	2009 (1 ay)
İzmir Bölge Hıfzıssıhha Enstitüsü	Türkiye	İzmir	Biyokimya Lab.	Stajyer	2008 (1 ay)

KATILDIĞI KURSLAR VE KONGRELER

1.Ulusal Ürolojik Cerrahi Kongresi. Antalya, Türkiye.	2012
Türk Toraks Derneği 15. Yıllık Kongresi. Antalya, Türkiye.	2012
5 th International Congress on Nutrition and Cancer. Elazığ, Türkiye.	2012
XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi. Türk Biyokimya Derneği. Konya, Türkiye.	2012
Kanser Kök Hücre Sempozyumu. Ulusal Rejeneratif Tıp ve Hücre Terapi Derneği, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye.	2012
Kanser Biyolojisinde Güncel Kavramlar. Konuşmacı: Bülent Özpolat M.D., Ph.D (University of Texas M.D. Anderson Cancer Center), İzmir, Türkiye.	2011
Cerrahi Araştırmalarda Moleküler Yöntemler Kursu. 6. Cerrahi Araştırmalar Kongresi, Türk Cerrahi Derneği, Ankara, Türkiye.	2011
Dokuz Eylül Üniversitesi ‘Kanser Biyolojisinde Güncel Konular’ kursu	2011
Dokuz Eylül Üniversitesi ‘Oksidatif DNA hasarı, onarımı ve hastalıklarla ilişkisi’ teorik kurs	2010
Dokuz Eylül Üniversitesi ‘Web-based Clinical Case Simulations and Problem-based Learning Tutorials’ kurs	2010
Dokuz Eylül Üniversitesi ‘EBI Bioinformatics Roadshow in Izmir’	2010
Araştırma-Buluş-Patent yolunda Üniversite. Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye.	2010
2.Laboratuvar Hayvanları Bilimi Sempozyumu. Dokuz Eylül Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye.	2010
Uluslararası V. IÜGEN Moleküler Biyoloji ve Genetik öğrencileri Kış okulu, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.	2008

DERNEK ÜYELİKLERİ

Türk Toraks Derneği	2012
Türk Biyokimya Derneği	2011

SÖZLÜ VE POSTER BİLDİRİLERİ

P. Kemanlı, F. Soyarat, Y. Saygıdeğer, H. Koçdor: Comparison of the Curriculums of the Molecular Medicine Masters Program. Orpheus Organization For PhD Education in Biomedicine and Health Sciences, 6. Annual Congress, 2011, İzmir, Türkiye.
Soyarat F, Kemanlı P, Koçdor H, Ateş H, Çehreli R, Saygıdeğer Y, Özsan H, Arslan G, Öztıp I, Koçdor MA. Glutamin ve Selenyumun androjen reseptor negatif prostat kanseri hücreleri üzerinde standart kemoterapiye katkıları. Cerrahi Araştırmalar Kongresi, 2011, Ankara, Türkiye.
Ateş H, Koçdor H, Çehreli R, Öztıp I, Kemanlı P, Soyarat F, Saygıdeğer Y, Özsan H, Koçdor M.A., Arslan G. Çinkonun prostat kanseri hücreleri üzerine antikanser etkinliği. Cerrahi Araştırmalar Kongresi. 2011, Ankara, Türkiye.
Çehreli R, Koçdor H, Soyarat F, Kemanlı P, Ateş H, Özsan H, Saygıdeğer Y, Öztıp I, Koçdor MA. Glutamin ve Selenyumun Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri hücreleri üzerinde standart kemoterapiye katkıları. Türk Toraks Derneği 15. Yıllık Kongresi. 2012, Antalya, Türkiye.
Koçdor H, Koçdor M.A, Çehreli R, Kemanlı P, Soyarat F, Ateş H, Saygıdeğer Y, Özsan I. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri hücre hatlarında Çinko ve Dosetakselin Sinerjistik etkileri. Türk Toraks Derneği 15. Yıllık Kongresi. 2012, Antalya, Türkiye.
H. Ateş, H. Koçdor, P. Kemanlı, F. Soyarat, R. Çehreli, H. Özsan, I. Öztıp, M. A. Koçdor, G. Arslan. Contribution of Zinc and Selenium Supplementation to Standart Therapy of Androgen Negative Prostate Cancer. 5 th International Congress on Nutrition & Cancer. 2012, Elazığ, Türkiye.
H. Koçdor, M. A. Koçdor, R. Çehreli, P. Kemanlı, F. Soyarat, H. Ateş, Y. Saygıdeğer, F. Paralı, H. Özsan. 5th International Congress on Nutrition & Cancer. Synergistic Effects of Docetaxel and Zinc on Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines. 2012, Elazığ, Türkiye.
F. Soyarat, P. Kemanlı, H. Koçdor, H. Ateş, R. Çehreli, H. Özsan, F. Paralı, G. Arslan, I. Öztıp, M. A. Koçdor. 5th International Congress on Nutrition & Cancer. Contribution of Glutamine and Selenium to Standart Therapy of Androjen Negative Prostate Cancer. 2012, Elazığ, Türkiye.
R. Çehreli, H. Koçdor, F. Soyarat, P. Kemanlı, H. Ateş, H. Özsan, Y. Saygıdeğer, F. Paralı, I. Öztıp, M. A. Koçdor. Anticancer Effects of Docetaxel in Combination with Glutamine and Selenium on Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Lines. 5th International Congress on Nutrition & Cancer. 2012, Elazığ, Türkiye.
P. Kemanlı, F. Soyarat, H. Koçdor, H. Ateş, F. Bayraktar, Ö. Özdoğan, H. Özsan, M. A. Koçdor. Acute Anticancer Efficacy Of Bexarotene on Thyroid Cancer Cell Lines. 5th International Congress on Nutrition & Cancer. 2012, Elazığ, Türkiye.

Hilal Koçdor, Mehmet Ali Koçdor, Rüksan Çehreli, Pınar Kemanlı, Fırat Soyarat, Filiz Paralı, Hayri Özsan. Çinko ve Selenyumun Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri hücre hatları üzerinde dosetaksel tedavisine katkıları. XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi. Türk Biyokimya Derneği, 2012, Konya,Türkiye.
Pınar Kemanlı, Fırat Soyarat, Hilal Koçdor, Halil Ateş, Fırat Bayraktar, Özhan Özdoğan, Hayri Özsan, Mehmet Ali Koçdor. Selektif RXR ligandı Beksarotenin Tiroid kanseri hücre hatları üzerine antikanser etkinliği. XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi. Türk Biyokimya Derneği. 2012, Konya, Türkiye.
Fırat Soyarat, Pınar Kemanlı, Hilal Koçdor, Halil Ateş, Rüksan Çehreli, Yasemin Saygıdeğer, Hayri Özsan, Güven Arslan, İlhan Öztıp, Mehmet Ali Koçdor. Glutamin ve Selenyumun androjen reseptör negatif prostat kanser hücrelerinde standart kemoterapiye katkıları. 1. Ulusal Ürolojik Cerrahi Kongresi, Antalya, Türkiye.
Pınar Kemanlı, Fırat Soyarat, Hilal Koçdor, Halil Ateş, Fırat Bayraktar, Özhan Özdoğan, Hayri Özsan, Mehmet Ali Koçdor. Selektif RXR ligandı Beksarotenin Tiroid kanseri hücre hatları üzerine antikanser etkinliği. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sağlık Bilimleri Poster günleri. 2012, İzmir, Türkiye.

POSTER ÖDÜLLERİ

Soyarat F, Kemanlı P, Koçdor H, Ateş H, Çehreli R, Saygıdeğer Y, Özsan H, Arslan G, Öztıp I, Koçdor MA. Glutamin ve Selenyumun androjen reseptör negatif prostat kanseri hücrelerinde standart tedaviye etkisi. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sağlık Bilimleri Poster günleri. 2011, İzmir, Türkiye.
Koçdor H, Koçdor M.A, Çehreli R, Kemanlı P, Soyarat F, Paralı F, Özsan H. Çinko ve Selenyumun Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücreleri üzerinde Dosetaksel Tedavisine katkıları. XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi.Türk Biyokimya Derneği, 2012, Konya,Türkiye.