

T.C.
İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SKOV-3 HÜCRE HATTINDA DOKSORUBİCİN İLE İNDÜKLENEN
APOPTOZA RESVERATROL VE DARBELİ ELEKTROMANYETİK ALAN
(PEMF) UYGULAMASININ ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

ERDİ KESELİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. MELTEM KURUŞ

2019- İZMİR

T.C.

İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SKOV-3 HÜCRE HATTINDA DOKSORUBİCİN İLE İNDÜKLENEN
APOPTOZA RESVERATROL VE DARBELİ ELEKTROMANYETİK ALAN
(PEMF) UYGULAMASININ ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

ERDİ KESELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. MELTEM KURUŞ

Bu tez İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2018-TYL-SABE-0067 Proje numarası ile desteklenmiştir.

2019- İZMİR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek lisans Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 19 / 07 / 2019

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Meltem KURUŞ – İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

İMZA



Üye : Doç. Dr. Berrin AVCI – Bursa Uludağ Üniversitesi

İMZA



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Fatma Şimşek – İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

İMZA



ONAY : Bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Ahmet KOYU

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimimde bana kazandırdığı yetenekler, sonsuz sabrı ve hoşgörüsünün yanı sıra bir anne gibi bazen severek bazen kızarak akademik olarak olgunlaşmamı sağlayan sevgili danışman hocam Prof. Dr. Meltem Kuruş'a emeklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalı bünyesinde bulunan ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Selen Bahçeci ve Dr. Öğr. Üyesi Fatma Şimşek'e teşekkür ederim. Hücre Kültürü dersi ve uygulamalarıyla çalışmamın altyapısını oluşturmamı sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Melek Pehlivan'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamın önemli bir ayağını oluşturan düşük darbeli elektromanyetik alan cihazını sağlayan ve enerjisiyle örnek olan Pro. Dr. Adnan KAYA'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmamda kullanmış olduğum SKOV-3 hücre hattını çalışmamıza olanak sağlayan Medipol Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı bünyesinde görev alan Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sibel Erdem'e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarına maddi destek sağlayan İzmir Katip Çelebi Üniversitesi BAP Kordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan en iyi arkadaşım, eşim Uzm. Bio. Gonca Ay Keselik'e teşekkür ederim.

ÖZET

Günümüzde kanser tedavisinde kaydedilen aşamalarla kanserli hastaların tedavi sonrası hayatta kalma süreleri artmıştır. Bununla birlikte araştırmalar kanser tedavisi sonrası yaşam kalitesini arttırmaya odaklanmıştır. Kemoterapi kaynaklı infertilite kanser sonrası yaşam kalitesini etkileyen en önemli faktörlerden biridir.

Doksorubisin birçok kanser türünde yaygın olarak kullanılan antitümör bir ajandır. Doksorubisinin etki mekanizması gereği kardiyotoksik, nefrotoksik ve hepatoksik etkileri ortaya koyulmuştur. Doksorubisinin ovaryumda foliküler atreziye sebep olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda foliküler atreziye ovaryum korteksindeki vasküler organizasyon bozukluğunun sebep olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlara karşın ovaryum üzerine toksik etkisiyle alakalı çalışmalar bu kadar fazla sayıda ve etkisini net olarak açıklamaya yeterli değildir. Bu projenin amacı kemoteröpotik ilaçlardan olan doksorubisinin yan etkilerini azaltmaya yönelik yeni ajanlar araştırmaktır. Bu açıdan resveratrol ve manyetik alan uygulamalarının doksorubisinin olumsuz etkilerini ortadan kaldırılmasına yönelik araştırılması hedeflenmektedir.

Resveratrol üzüm yer fıstığı gibi bitkilerden elde edilen doğal bir fitoaleksindir. Yapılan çalışmalarda resveratrolün antioksidan, antiinflamatuvar, yaşlanma karşıtı ve koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Resveratrol'un sıçanlarda foliküler atreziyi inhibe ettiği, over folliküler rezervini koruyarak ovaryum ömrünü uzattığı gösterilmiştir.

Düşük darbeli elektromanyetik alan (PEMF), kemik kırık onarımı yara iyileşmesi çalışmalarında olumlu sonuçlar vermiş antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi gösterilmiştir. Bu proje ile doksorubisinin yaratacağı ovaryum hasarının üzerine olumlu etkisi bilinen resveratrol ve daha önce böyle bir çalışmada kullanılmayan PEMF'in etkisinin ortaya koyulmuş olacaktır. Doksorubisinin ovaryum

kortexindeki damar yapılarını bozduğu, kan besin akışının blokasyonu ile beslenemeyen kortexdeki foliküllerin atreziye uğradığı gösterilmiştir. PEMF'in ise vasküler aktiviteyi arttırıcı etkisi vardır. Doxorubisin ve PEMF'in simultane uygulanması ile doxorubisin kaynaklı ovaryan hasarın giderilebileceğini ön görölmektedir. Ayrıca resveratrol ile PEMF'in etki mekanizması açısından hücrelerde bölünme hızı, mRNA ve protein sentez seviyeleri, hücre membranlarında geçirgenlik ve Ca^{+2} , Na^{+} , K^{+} iyon transferlerindeki değişimler gibi bazı ortak özellikleri bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Doxorubicin, Resveratrol, darbeli elektromanyetik alan, ovaryum hasarı, antioksidan, kemoterapotik

ABSTRACT

Today, survival time of cancer patients with cancer has increased during the stages of cancer treatment. However, research has focused on improving quality of life after cancer treatment. Chemotherapy-induced infertility is one of the most important factors affecting quality of life after cancer.

Doxorubicin is an antitumor agent widely used in many types of cancer. Doxorubicin has cardiotoxic, nephrotoxic and hepatotoxic effects due to its mechanism of action. Doxorubicin is known to cause follicular atresia in the ovary. Studies have shown that follicular atresia is the cause of vascular organizational dysfunction in the ovary cortex. Despite these conclusions, studies related to toxic effects on the ovarium are so numerous and do not clearly explain its effect. The aim of this project is to investigate new agents for reducing the side effects of doxorubicin.

Resveratrol is a natural phytoalexin, obtained from plants such as grapes, peanuts. Studies have shown that resveratrol has antioxidant, antiinflammatory, anti-aging and protective effects. Resveratrol has been shown to inhibit follicular atresia in rats, prolonging the life span of ovaries by maintaining over follicular reserve.

Low-pulsed electromagnetic field (PEMF), has shown positive results in bone cartilage repair, also wound healing studies have shown antioxidant and antiinflammatory effect. It's shown that Doxorubicin disrupts the vascular structures in the ovarian cortex, follicles in the cortex that cannot be fed by the blockage of blood flow . PEMF has a vascular activity enhancing effect. It is predicted that doxorubicin induced ovarian damage can be eliminated by simultaneous apply of Doxorubicin and PEMF. In addition, resvaratol and PEMF have some common properties in terms of mechanism of action, such as rate of division in cells, mRNA and protein synthesis levels, permeability in cell membranes and changes in ion transfers such as Ca^{+2} Na^{+} and K^{+} .

Keywords: Doxorubicin, Resveratrol, Pulsed electromagnetic field, ovarian damage, antioxidant, chemotherapeutic

İçindekiler

1. GİRİŞ	0
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Ovaryum	4
2.1.1 Anatomisi	4
2.1.2. Ovaryum Histolojisi	5
2.2. Kanser	15
2.2.1. Hücre döğüsü ve kanser	15
2.3. Ovaryum kanseri	19
2.3.1 Ovaryan kanser alttipleri	20
2.3.2. Ovaryum kanseri metastazı	22
2.4. SKOV-3 hücre hattı	23
2.5. Doxorubicin	23
2.6. Resveratrol	25
2.7. Elektromanyetik alan	28
2.7.1. Darbeli elektromanyetik alan	28
2.7.2. Darbeli elektromanyetik alan (PEMF) uygulamaları ve parametreler	30
3. GEREÇ ve YÖNTEM	31
3.1. GEREÇ	31
3.1.1. Hücre hattı	31
3.1.3. Hücre kültüründe kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar	31
3.2 YÖNTEM	32
3.2.1. Deney gruplarının belirlenmesi	32
3.2.2-SKOV-3 Hücre hattının açılması	33
3.2.3-Hemositometre ile hücre sayımı	33
3.2.4-Hücre pasajlanması/alt kültür yapılması	34

3.2.5.Hücrelerin dondurulması	35
3.2.6- Hücre canlılığının MTT test ile ölçülmesi.....	35
3.2.7.MTT test protokolü.....	35
3.2.8.- TUNEL testi ile apoptoza uğrayan hücrelerin tayini.....	36
3.2.9 In vitro yara iyileşme modeli (scratch assay)	37
3.2.11-Darbeli elektromanyetik alanın uygulanması.....	38
3.2.12-Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	39
4. BULGULAR.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.1. Etkin Doxorubicin dozunun belirlenmesi.....	40
4.1.1. Doxorubicinin SKOV-3 hücre hattı üzerine sitotoksik etkilerinin MTT yöntemiyle belirlenmesi.....	41
4.2. Etkin Resveratrol Dozunun belirlenmesi	43
4.3. Etkin Doxorubicin + Resveratrol kombine dozunun belirlenmesi	47
4.4. Elektromanyetik alan uygulaması yapılan flaskta etkin Doxorubicin dozunun belirlenmesi	50
4.5. Elektromanyetik alan uygulaması yapılan flaskta etken RES dozunun belirlenmesi	53
4.6. Elektromanyetik alan uygulaması yapılan flaskta etken DOX + RES kombine dozunun belirlenmesi	57
4.7. TUNEL Sonuçları.....	59
4.8. SKOV-3 hücre hattında proliferasyon ve hücre migrasyonuna etkisinin gösterilmesi için in vitro yara iyileşme modelinin uygulanması.....	61
4.8.1. Elektromanyetik alan uygulanmayan grupların yara iyileşme sonuçları..	61
4.8.2. Elektromanyetik alan uygulanan grupların yara iyileşme sonuçları.....	62
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	68
7. KAYNAKÇA.....	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SKOV-3: Epitelyal ovaryum kanseri hücre hattı

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP transferase-mediated nick end-labelling

ATCC: American type culture collection

FBS: Fetal Sığır Serum

PBS: fosfatlı Tampon Solüsyonu

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DAB: Diaminobenzidin

PEMF: Pulsed electromagnetic Field (Darbeli Elektromanyetik Alan)

RES: Resveratrol

DOX: Doxorubicin

Ca⁺²: kalsiyum

EMA: elektromanyetik alan

ZP: Zona Pelusida

PAS: periodic asit-schiff

LH: Luteinizan Hormon

EGF: epidermal büyüme faktörü

IGF-1: insülin benzeri büyüme faktörü

OMI: oosit matürasyon inhibitörü

FSH: follikül stimüle edici hormon

GnRH: gonadotropin serbestleştirici hormon

FIGO: Uluslararası Jinekolojik ve Obstetrik Federasyonu

ROS: Reaktif oksijen türleri

IC⁵⁰: The half maximal inhibitory concentration

MDA-MB-231: meme kanseri hücre hattı

SW-480: Kolon kanseri hücre hattı

HCT-116: Kolon kanseri hücre hattı

EL4 T: lenfoma hücre hattı

MCF7: meme kanser hücre hattı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kadın üreme sisteminin genel anatomik yapısı (Ross)

Şekil 2 : A-sekonder follikül (40x) ve B- tersiyer folliküll görünümü(20x).

Şekil 3: hücre döngüsünün kontrol noktaları. [The biology of cancer (garland science 2007)]

Şekil 4 : Skov hücrelerinin morfolojik yapısı

Şekil 5: Resveratrolün kimyasal formülü

Şekil 6: Helmholtz coil ile PEMF invitro uygulanması

Şekil 7: Helmholtz bobini şematik ve esas görüntüsü.

Şekil 8: Helmholtz bobini uygulaması.

Şekil 9: SKOV-3 hücrelerine farklı DOX dozlarının etkisini gösteren invert mikroskop görüntüleri 4x.

Şekil 10: SKOV-3 hücresi için farklı konsantrasyon ve saatlerdeki DOX uygulamasının MTT sonuç grafiği.

Şekil 11: SKOV-3 hücrelerine farklı Resveratrol dozlarının etkisini gösteren invert mikroskop görüntüleri 4x.

Şekil 12: SKOV-3 hücresi için farklı konsantrasyon ve saatlerdeki RES uygulamasının MTT sonuç grafiği.

Şekil 13: SKOV-3 hücrelerine farklı DOX + RES dozlarının etkisini gösteren invert mikroskop görüntüleri 4x.

Şekil 14: SKOV-3 hücrelerine farklı DOX + RES dozlarının etkisini gösteren MTT grafiği.

Şekil 15: SKOV-3 hücrelerine farklı DOX dozlarının ve elektromanyetik alanın etkisini gösteren invert mikroskop görüntüleri 4x

Şekil 16: SKOV-3 hücrelerine farklı DOX + dozlarının elektromanyetik alan ile kombine uygulanmasının etkisini gösteren MTT grafiği.

Şekil 17: SKOV-3 hücrelerine farklı RES dozlarının ve elektromanyetik alanın etkisini gösteren invert mikroskop görüntüleri 4x

Şekil 18: SKOV-3 hücrelerine farklı DOX + dozlarının elektromanyetik alan ile kombine uygulanmasının etkisini gösteren MTT grafiği.

Şekil 19: SKOV-3 hücrelerine farklı Docorubicin + RES dozlarının ve elektromanyetik alanın etkisini gösteren invert mikroskop görüntüleri 4x.

Şekil 20: SKOV-3 hücrelerine farklı DOX + RES dozlarının elektromanyetik alan ile kombine uygulanmasının etkisini gösteren MTT grafiği.

Şekil 21. Tunel sonuçları 4x görüntüleri.

Şekil 22: etken dozlar uygulanan elektromanyetik alan uygulanmayan grupların yara iyileşme deney sonuçları

Şekil 23: elektromanyetik alan kullanılmayan gruptaki yara alanlarının yüzdesi

Şekil 24: etken dozlar uygulanan elektromanyetik alan uygulanmayan grupların yara iyileşme deney sonuçları

Şekil 25: elektromanyetik alan kullanılan gruptaki yara alanlarının yüzdesi.

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: deney grupları

Tablo 2: 24, 48, 72 saat DOX uygulaması sonrası % hücre canlılığı ve IC⁵⁰ değeri.

Tablo 3: DOX farklı dozlarının 24 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması (p>0,05).

Tablo 4: DOX farklı dozlarının 48 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması (p>0,05).

Tablo 5: DOX farklı dozlarının 72 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması (p>0,05).

Tablo 6: 24, 48, 72 saat RES uygulaması sonrası % hücre canlılığı ve IC⁵⁰ değeri.

Tablo 7: RES farklı dozlarının 24 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması (p>0,05).

Tablo 8: RES farklı dozlarının 48 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması (p>0,05).

Tablo 9: RES farklı dozlarının 72 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması (p>0,05).

Tablo 10: 24, 48, 72 saat DOX + RES kombine uygulaması sonrası % hücre canlılığı ve IC⁵⁰ değeri.

Tablo 11: DOX+ RES farklı dozlarının 24 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması (p>0,05).

Tablo 12: DOX+ RES farklı dozlarının 48 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması (p>0,05).

Tablo 13 : DOX+ RES farklı dozlarının 72 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması (p>0,05).

Tablo 14: 24, 48, 72 saat DOX + elektromanyetik alan kombine uygulaması sonrası % hücre canlılığı ve IC⁵⁰ değeri.

Tablo 15: Elektro manyetik alan uygulanan DOX farklı dozlarının 24 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması ($p>0,05$).

Tablo 16: Elektro manyetik alan uygulanan DOX farklı dozlarının 48 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması ($p>0,05$).

Tablo 17: Elektro manyetik alan uygulanan DOX farklı dozlarının 72 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması ($p>0,05$).

Tablo 18: 24, 48, 72 saat RES + elektromanyetik alan kombine uygulaması sonrası % hücre canlılığı ve IC⁵⁰ değeri.

Tablo 19: Elektro manyetik alan uygulanan RES farklı dozlarının 24 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması ($p>0,05$).

Tablo 20: Elektro manyetik alan uygulanan RES farklı dozlarının 48 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması ($p>0,05$).

Tablo 21: Elektro manyetik alan uygulanan RES farklı dozlarının 72 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması ($p>0,05$).

Tablo 22: 24, 48, 72 saat RES + elektromanyetik alan kombine uygulaması sonrası % hücre canlılığı ve IC⁵⁰ değeri.

Tablo 23: Elektro manyetik alan uygulanan DOX + RES farklı dozlarının 24 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması ($p>0,05$).

Tablo 24: Elektro manyetik alan uygulanan DOX + RES farklı dozlarının 48 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması ($p>0,05$).

Tablo 25: Elektro manyetik alan uygulanan DOX + RES farklı dozlarının 72 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması ($p>0,05$).

Tablo 26: Grupların TUNEL skorları

Tablo 27: kontrol grubuna ait 0,12,24 saat sonuçları. Sonuçlar imaj analizi ile hesaplandığından birim pikselkare olarak alınmıştır.

Tablo 28: PEMF grubuna ait 0,12,24 saat sonuçları. Sonuçlar imaj analizi ile hesaplandığından birim pikselkare olarak alınmıştır.

1. GİRİŞ

Kanser günümüzde kardiyovasküler hastalıklarla birlikte en çok ölüme sebebiyet veren hastalıklardandır. Hücrelerin normal bölünme döngüsünden çıkarak anormal bölünme ve çoğalma davranışları göstermesiyle kanserleşme başlar. Bölünme denetiminden sıyrılan hücreler kitleleşerek tümör adı verilen hücre yığınlarını oluşturur. Tümörler kalınlaşarak büyüdüğünden dolayı kanser dokusunun beslenmesi için anjiyogenez devreye girerek kendi damarlarını oluşturur. Bu hem tümörün büyümesine yol açarken hem de metastazı hızlandırır.

Ovaryum kanseri kadın üreme sistemi kanserleri arasında en çok ölüme sebebiyet veren kanser türüdür. Sağ kalımın düşük olmasında hastalığın ileri evrelere kadar herhangi bir belirti vermemesi etkilidir. Ovaryum kanserinin en yaygın alt türü epitelyal ovaryum kanseridir. Tüm ovaryum kanser vakalarının %90'ını epitelyal ovaryum kanseri alt tipinin oluşturduğu rapor edilmiştir. Epitelyal ovaryum kanserleri tip I ve tip II olarak iki gruba ayrılır. Tip I epitelyal ovaryum kanserleri düşük dereceli ve agresif olmayan davranış gösterip genellikle tek taraflı kistik yapı gösterirken, Tip II epitelyal ovaryum kanserleri yüksek dereceli ve agresif olup iki ovaryumda da yayılım gösterirler.

SKOV-3 hücre hattı, 64 yaşında caucasian bir epitelyal ovaryum kanser hastasının asistinden izole edilmiş hücre hattıdır. Çalışmamızda ovaryum kanserli dokuları taklit etmek için kullanılacaktır. Hücre hattı adherens bir yapıda olduğundan yara iyileşme deneylerine de uygun olarak çoğaltılabilmektedir.

DOX, birçok kanser türünün tedavisinde kullanılan antitümör bir terapötik ajandır. DOX kanser hücrelerini apoptoza indüklemek için kanser hücrelerinde DNA zincir kırıklarına sebep olur. Bu etkisi sebebiyle teratojenik, mutajenik etki

göstermesinin yanı sıra serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına da sebep olur. DOX'in bu yan etkileri sağlıklı dokularda da tahribata yol açabilmektedir (1,2,3).

Yapılan çalışmalarda başta kalp olmak üzere karaciğer, ovaryum, testis, böbrek ve kan hücreleri üzerinde toksik etkilerinin olduğu rapor edilmiştir. DOX'in kansere karşı etkili olduğu bilinmekle beraber yan etkilerinin bertaraf edilmesi için son yıllarda kombine uygulamalar yapılması bir fikir olarak ortaya çıkmıştır. DOXin, antikanser ve antiinflamatuvar etkileri olduğu bilinen etken maddelerle veya harici metotlarla birlikte uygulanması hem DOXin yan etkilerini azaltabilir hem de düşük DOX dozlarıyla yüksek etki elde edilebilir. Ülkemizde ilaç sektöründe dışa bağımlılık göz önüne alındığında düşük dozlarda etkili sonuçlar alabilmek insan sağlığı açısından önemli olduğu gibi ülke ekonomisine de katkı sunacaktır.

Resveratrol üzüm, yer fıstığı, çilek gibi bitkilerden elde edilen doğal bir fitoaleksindir. RES (3,5,4'-trihidroksistilben) enfeksiyon önleyici, anti-oksidan, antiinflamatuvar, anti-proliferatif, antitümöral etkilerle birlikte çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik etkilere sahip doğal bir polifenoldür . Polifenoller, antioksidan olarak insan vücudundaki çeşitli nedenlerle oluşmuş serbest radikalleri temizleme kabiliyetine sahiptirler (4,5,6,7). Ayrıca oksidatif stresi azaltmalarından dolayı kardiyovasküler hastalık ve kanser riskini de azalttıkları bilinmektedir. Çalışmamızda DOX ile kombine kullanıldığında kanser hücrelerine nasıl etkisi olacağı araştırılacaktır.

Elektromanyetik alan (EMA) ışıması elektrik yüklerinin hızlanması ile oluşmaktadır. Elektrik yükleri hareket ettikleri zaman uzayda elektrik ve manyetik enerji üretirler. Bu dalgalar farklı frekans ve dalga boylarına sahip olup bir cisimle etkileştiklerinde kırılabilir, yansıtılabilir veya soğurulabilirler. Hedef dokuya bir bobin veya aplikatör yardımıyla uygun frekans ve dalga formuna sahip EMA sinyali uygulandığında hücresel boyutta fizyolojik etkiler oluşur. Düşük darbeli elektromanyetik alan, kemik kırıldak onarımı yara iyileşmesi çalışmalarında olumlu sonuçlar vermiş antioksidan ve anti inflamatuvar etkisi gösterilmiştir. Manyetik ve

elektromanyetik alanlar 21. yüzyıl tıbbı tarafından sağlık sorunlarının iyileştirme etkisi vaat eden gerçek etmenler olarak kabul edilmektedir (8). Harici bir uygulama olması özellikle kanser tedavilerinde kemoterapiye ek bir irritasyon yaratmaması sebebiyle destek tedavi alanında kullanımı için bir yol açabilir. Çalışmamızda DOX ile kombine olarak uygulanacak bir diğer uygulama da düşük darbeli elektromanyetik alan olacaktır.

Amacımız etkileri birçok çalışmada gösterilmiş DOX ve RES'e ek olarak düşük darbeli elektromanyetik alan uygulaması birlikteliğinin kanser tedavilerinde kullanılabilirliğinin in vitro olarak araştırılmasıdır. DOX'in kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücrelere de olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir. Darbeli elektromanyetik alanın hücre içi Ca^{+2} oranına ve hücre zarındaki kanalların aktivitesine etkisi olduğu bilinmektedir. DOX'in etkinliğinin darbeli elektromanyetik alan ile artırılması düşük dozlarda etkili sonuçlar almamızı sağlayabilir. Düşük doz kemoterapi hastalık sonrası sağ kalım oranlarının artırılmasında etkili olacaktır.

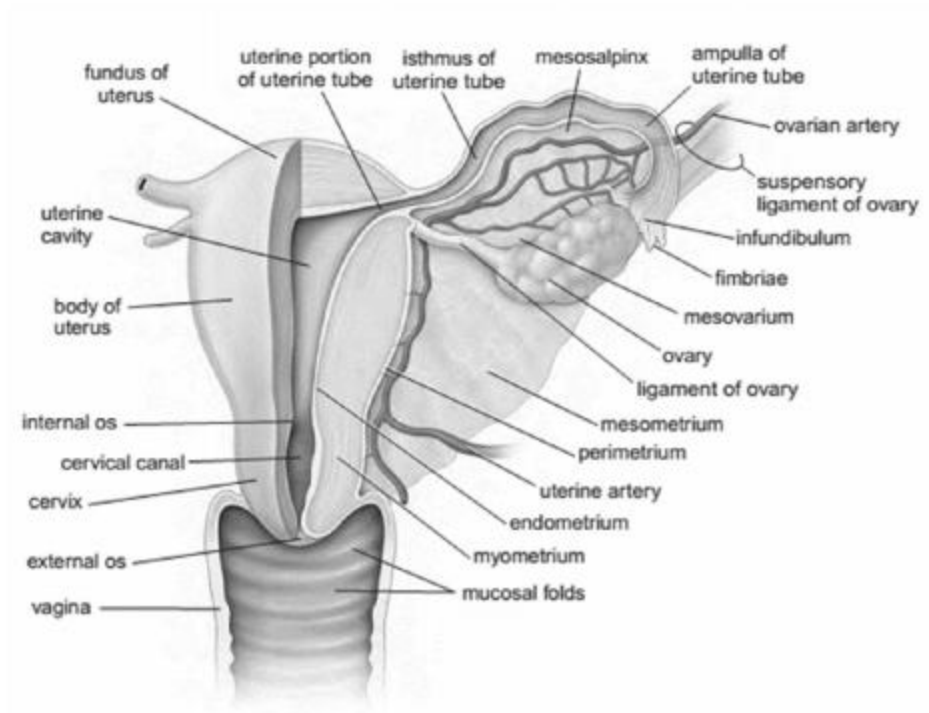
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum

2.1.1 Anatomisi

Ovaryum gametlerin ve steroid hormonların üretimi görevi üstelenen dişi üreme sistemi organıdır. Bir çift, badem şekilli, pembemsi beyaz renkte, 3 cm boyunda, 1,5 cm eninde ve 1cm kalınlığında yapılardır. Mezovaryum denilen peritoneal katlantı tarafından broad ligamentin posteriyör yüzeyine bağlanırlar.

Ovaryumun süperiyör kutbu ovaryum sinirlerini ve damarlarını taşıyan süspensör ligament tarafından pelvis duvarına bağlanır. Ovaryumun inferiyör kutbu ise ovaryan ligament tarafından uterusu bağlanır. Bu ligament, gelişmekte olan gonadı pelvisin tabanına bağlayan embriyonik fibröz kordon olan gubernakulumun bir kalıntısıdır. Puberteden önce ovaryum yüzeyi düzgün iken, üreme çağında tekrarlanan ovulasyonlar nedeni ile skarlı ve düzensiz olur. Postmenopozal kadınlarda ise ovaryum normal büyüklüğünün dörtte birine kadar geriler. (9,10)



Şekil 1. Kadın üreme sisteminin genel anatomik yapısı (10)

2.1.2. Ovaryum Histolojisi

Histolojik yapı olarak basitçe korteks ve medulla olmak üzere iki bölümde incelenir. Medullası ovaryumun merkezi bölgesinde gevşek bağdokusu, kıvrımlı kan damarları, lenf damarları ve sinirler içermektedir.

Korteks ise medullayı çevreler ve hücre açısından zengin bir bağdokusu içinde gmülü ovaryum folliküllerini içermektedir. Folliküllerin etrafındaki stromada dağınık düz kas lifleri bulunmaktadır. Korteks ile medulla arasında belirgin bir sınır yoktur. (10,11,12)

Ovaryumu mezotelyum yerine germinal epitel ile çevrilidir. Germinal epitel tek katlı kübik ve bazı bölgelerde yassı olarak devam edebilir. Germinal epitel ile korteksin arasında, sıkı bağdokusu yapısında olan tunika albuginea yer almaktadır.

Korteksin stroması her biri tek bir oosit içeren çeşitli evre ve boyutlarda çok sayıda ovaryum follikülü içerir. Follikülün boyutu oositin gelişim evresi ile ilişkilidir. (10,11,12)

2.1.2.1 Follikül gelişimi

Gelişim evresine göre histolojik olarak 3 temel tip ovaryum follikülü bulunmaktadır.

- Primordiyal folliküller
- büyümekte olan folliküller; primer, sekonder (antral) folliküller buraya dahildir.
- Olgun follikül (Graaf follikülü)

Ovaryumun genel bir histolojik kesitinde primordiyal folliküller baskın olmakla beraber her gelişim evresindeki folliküller gözlenebilmektedir. (10,11,12)

Primordiyal folliküller ilk olarak fetal gelişimin üçüncü ayında ortaya çıkarlar. Olgun ovaryumda primordiyal folliküller korteks stromasında tunika albugineanın hemen altında yer almaktadırlar. Oositi tek bir tabaka halinde yassı follikül hücreleri çevreler. Follikül hücrelerinin dış yüzeyini bazal lamina sınırlandırır. Bu evredeki oosit ve onu çevreleyen follikül hücreleri birbirine epeyce yaklaşmışlardır. Follikülün içindeki oosit yaklaşık 30 µm çapındadır ve ince dağılmış kromatin ve bir ya da daha fazla nükleolus içeren büyük eksantrik bir nükleusa sahiptir.

Oositin ooplazma adı verilen bir sitoplazması bir balbiani cisimciği içermektedir. Balbiani cisimciği lizozom, mitokondri, endoplazmik retikulum ve golgi cisimciğinin kümelenmesiyle oluşan bir yapıdır. İnsan oositleri bunlara ek olarak anüler lameller içerirler ve küçük küre şekilli mitokondriyonlarla birlikte çok sayıda küçük vezikül sitoplazmaya dağılmış halde bulunur. Anüler lameller, nüklear zarf kesitleri dizisi olmakla birlikte dizideki her tabaka por yapıları içerir ve bunlar morfolojik olarak nüklear porların yapısıyla özdeştir. (10,11,12)

Bir primordiyal follikül, büyümekte olan folliküle dönüştüğünde oositte, follikül hücrelerinde ve komşu stromada değişiklikler meydana gelir. İlk olarak, oosit büyür ve oositi çevreleyen yassı follikül hücreleri çoğalarak kübik hücre şeklini alırlar. Follikül hücrelerinin kübik hal aldığı bu evrede folliküle primer follikül denir. (10,11)

Oosit büyüdükçe özel proteinler salgılanır ve bu proteinler kompleksler oluşturarak zona pelusidaya organize olurlar. Zona pelusida, oosit ile follikül hücreleri arasında yerleşiktir.

İnsandaki zona pelusida; asidik sülfatlı üç zona pelusida (ZP) glikoprotein sınıfından meydana gelmektedir ve bu glikoproteinler ZP-1, ZP-2, ZP-3 olarak adlandırılmaktadır. Bu üç glikoprotein sınıfı arasında en çok önem arzedeni ZP-3'tür. ZP-3, spermatozoa bağlanma reseptörü ve akrozom reaksiyonu indükleyicisi olarak

fonksiyon görmektedir, ZP-2'nin sekonder spermarozoa-bağlanma proteini olarak davrandığı düşünülmektedir. ZP-1'in fonksiyonu henüz tam bilinmemektedir, ışık mikroskopik olarak zona pelusida, periodic asit-schiff (PAS) pozitifdir ve bu boya ile koyu olarak boyanır (10).

Primordiyal follikülden , primer folliküle gelişimde follikül hücreleri hızlı bir mitotik proliferasyon ile membrana granülozum (stratum granülozum) denen ve oositi çevreleyen çok katlı bir epiteli oluşturur. Follikül hücreleri bu aşamadan sonra granüloza hücreleri adını alır. Bazal lamina , prizmatikleşmiş follikül hücrelerinin en dış tabakası ile bağ dokusu yapısındaki stroma arasındaki yer alır.

Follikülün büyümesi esnasında, granüloza hücreleri arasında yoğun gap junction (neksus) tipi bağlantılar oluşmaya başlar. Zonula okludens gözlenmez bu da kan-follikül bariyerinin bulunmadığı anlamına gelir. Ovumun ve follikülün normal gelişimi için besinlerin ve küçük makromoleküllerin kandan follikül sıvısının içine geçmesi gereklidir.

Granüloza hücrelerinin proliferasyona uğramasıyla follikülün etrafındaki stromal hücreler, bazal laminanın hemen dışında teka follikülü adı verilen bir bağ dokusu hücre kılıfı oluştururlar. Teka follikülü iki tabaka olarak organize olur.

- Teka interna: iç tabaka olan bu yapı yüksek vaskülarizasyon gösterir ve kübik salgı hücrelerinden oluşur. Teka internanın farklılaşmış bu hücreleri steroid sentezleyen hücre karakteristiği gösterirler. Bu hücreler çok sayıda Luteinizan hormon (LH) reseptörlerine sahiptir. LH stimülasyonuna yanıt olarak, östrojen prekürsörleri olan androjenleri sentezlerler ve salgırlar. Teka interna salgı hücrelerinin yanı sıra fibroblastlar, kollajen demetleri ve endokrin organların tipik özelliği olan zengin küçük damar ağına sahiptir.
- Teka eksterna: dış bağdoku hücre tabakasıdır. Temel olarak düz kas hücreleri ve kollajen fiber fasikülleri içermektedir.

Tekanın tabakaları arasındaki ayırım net olmamakla beraber, granüloza tabakası ve teka interna arasındaki bazal lamina belirgin bir sınır oluşturur.

Primer follikülün gelişmesiyle birlikte oosit maturasyonu da başlar. Oosit olgunlaştıkça hücrel organizasyonu ve organellerin dağılımı değişmeye başlar. Balbiani cisimciğinde kümelenmiş golgi cisimcikleri, mitokondri, granüllü endoplazmik retikulum, küçük veziküllerin sayısı artarak tüm sitoplazmaya dağılır.

Birçok canlı türünün oositleri kortikal granüller denilen özelleşmiş salgı granülleri bulundurur. Bu granüller oositin plazma membranının hemen altında yer alırlar. Granüller, ovumun sperm tarafından aktive edildiğinde eksositoz ile salınan protezları içermektedir.

Oositin perivitellin aralığa doğru çok sayıda mikrovillus uzandığı görülmektedir. Perivitellin aralık, zona pellusida biriktirilirken oosit ile onu çevreleyen granüloza hücreleri arasında bulunur. Granüloza hücrelerinde ise oosite doğru uzanan ince uzantılar bulunmaktadır. Granüloza hücrelerinin bu uzantıları oositin mikrovillusları ile iç içe geçer hatta bazıları oositin plazma membranına doğru invajine olur. Uzantılar plazma membranına temas edebilir. Uzantılar plazma membranına temas etselerde sitoplazmik köprü oluşturacak şekilde işlev görmezler.

Granüloza hücrelerinin proliferasyonu ile hacimce büyüyen primer follikül ovaryum kortikal stromasının derinlerine doğru hareket eder. Gerek oosit gerekse de follikülün gelişimi için çeşitli faktörler gerekmektedir. Bunlar; follikül stimulan hormon (FSH), Büyüme faktörleri (örn; epidermal büyüme faktörü [EGF], insülin benzeri büyüme faktörü I[IGF-I], kalsiyum iyonları (Ca^{+2})).

Stratum granulozum 6-12 hücre kalınlığına ulaştığında, granuloza hücrelerinin arasında sıvı dolu boşluklar görülmeye başlar. Granuloza hücreleri arasında likör follikülü denen ve hyaluronan bakımından zengin sıvı birikmesiyle bu boşluklar birleşerek antrum denilen hilal şekilli tek bir boşluk oluşturur.

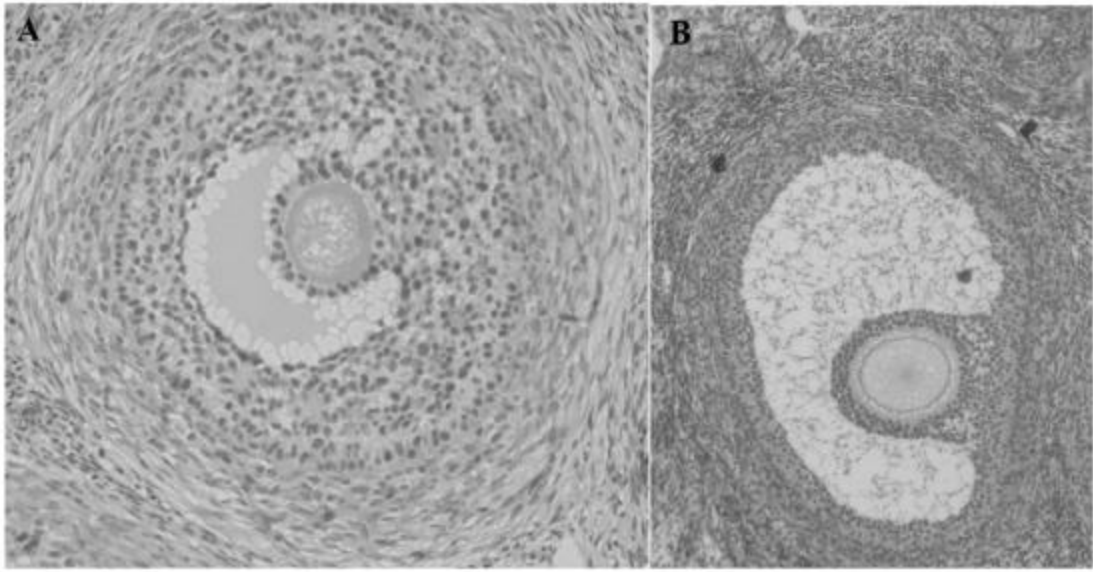
Bu oluşumla birlikte follikül artık sekonder follikül ya da antral follikül olarak adlandırılır. eksantrik yerleşimli yaklaşık 125 µm çapındaki oosit daha fazla büyümmez. Büyümenin engellenmesi granuloza hücreleri tarafından salınan oosit maturasyon inhibitörü (OMI) ile sağlanır. Yapılan çalışmalarda OMI miktarı ile oosit büyüklüğü arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir.

Sekonder follikülün boyutu arttıkça birkaç granuloza hücre tabakası tarafından döşenen antrum da genişler. Stratum granulozum, oosit ile ilişkili olduğu bölgeler haricinde eşit kalınlıktadır. Oosit ile ilişkili olduğu bölgede ise granuloza hücreleri kumulus ooforus adı verilen antruma uzanan bir tümsek oluştururlar.

Oositin etrafını çevreleyen ve ovulasyonda oositle birlikte kalan kumulus ooforus hücrelerine korona radiata denmektedir. Korona radiata kumulus ooforus hücrelerinden meydana gelmektedir. Bu hücreler zona pelusidayı delen mikrovilluslar gönderirler ve bu mikrovilluslar gap junctionlar ile oositin mikrovillusları ile iletişim halindedir.

Folliküler maturasyon sırasında granuloza hücrelerinin yüzey mikrovilluslarının sayısı artar ve bu, serbest antral yüzeydeki LH reseptörlerinin sayılarının artışıyla ilişkilidir. Granuloza hücrelerinin arasında koyu boyanan, PAS pozitif ve call-exner cisimcikleri olarak adlandırılan ekstraselüler materyal görülebilir. Bu cisimcikler granuloza hücreleri tarafından salınmaktadır ve hyaluronan ve proteoglikanlar içermektedirler (10).

Oluşan Graaf follikülü yaklaşık 10 mm olgun oositi içeren folliküldür. Büyük boyutundan dolayı ovaryum korteksinin kalınlığı boyunca uzanarak yüzeyde çıkıntı oluşturur.follikül maksimum boyutuna ulaştığında granüloza hücrelerinin proliferasyonu azalır ve stratum granulosum tabakası incelir. Granüloza hücreleri arasındaki boşluk arttıkça oosit ve kumulus hücreleri ile geriye kalan granüloza hücreleri arasındaki sıkı organizasyon gevşer ve ovulasyona hazırlanılır. Bu hücreler ve bunlarla gevşekçe bağlı kumulus hücreleri ovulasyon ile atılır.



Şekil 2 : A-sekonder follikül (40x) ve B- tersiyer folliküll görünümü(20x).

Follikül olgunlaşmasının bu aşamasında teka tabakaları daha görünür hale gelir. Teka interna hücrelerinin sitoplazmalarında lipid damlacıkları ortaya çıkar ve hücreler, steroid üreten hücre yapısı gösterir.

İnsanda LH teka internayı östrojen prekürsörü androjenleri salgılamak üzere stimüle eder. Bazı androjenler granüloza hücrelerindeki granülsüz endoplazmik retikuluma taşınır. FSH'a yanıt olarak granüloza hücreleri androjenlerin östrojenlere dönüşümünü katalizler. Östrojenler granüloza hücrelerini, proliferere olup follikül boyutunu arttırmak üzere stimüle ederler.

2.1.2.2 Ovulasyon

Ovulasyon sekonder oositin, graaf follikülünden atıldığı süreçtir. Bir menstural siklusta ovulasyona uğrayacak follikül, siklusun ilk günlerinde birkaç primer oositten oluşan grup içinden seçilir. Ovulasyon sırasında oosit, germinal epitel de dahil olmak üzere tüm folliküler duvarı geçer.

Menstural siklusun ortasında sekonder oositin atılması olayına kadar bir dizi hormonal değişiklik ve enzimatik etkileşimler gerçekleşir.

Bu etkileşimler:

- Folliküler sıvısının hacim ve basıncında meydana gelen artış.
- Follikül duvarının aktive plazminojen tarafından enzimatik proteolizisi
- Oosit-kumulus kompleksi ile stratum granülozum arasında hormonal yönlendirmeyle glikozaminoglikanların biriktirilmesi
- Teka eksterna tabakasındaki düz kas liflerinin prostaglandinler tarafından teiklenerek kasılması.

Ovulasyon öncesi follikül çıkıntısının üzerindeki ovaryan yüzeyin bir kısmında kan akımı durur. Germinal epitelin makula pellusida yada folliküler stigma olarak bilinen bu bölümü yükselir ve sonra ruptüre olur. Korona radiata ve kumulus ooforus hücreleri tarafından çevrilen oosit ruptüre olan foliküden atılır. Ovulasyon sırasında tuba uterinanın fimbriyaları ovaryumun yüzeyine iyice yaklaşır ve oositi içeren kumulus kütlesi fimbriyalar tarafından tuba uterinanın abdominal ostiumuna doğru ilerletilir. Kumulus kütlesi fimbriyaya sıkıca tutunarak tuba uterinayı döşeyen silyumlu hücreler tarafından aktif bir şekilde taşınır. Bu şekilde kumulus kütesinin peritoneal boşluğa geçişi engellenir (10,11).

2.1.2.3 Ovaryum fonksiyonlarının düzenlenmesi

Kadın hormonal sistemi birbirini yöneten üç hormondan oluşur. Bunlar;

- Gonadotrofin serbestleştirici hormon (GnRH): hipotalamustan salgılanır.
- FSH ve LH: adenohipofizden salgılanır ve salgıları GnRH salgısı ile başlar.
- Östrojen (östradiol) ve progesteron: FSH ve LH etkisinde ovaryumdan salgılanır.

Aylık cinsel siklus esnasında bu hormonların salgı miktarı değişkenlik gösterir. Hipotalamo-hipofizer-ovaryal aks kontrolü ile kadında birbirine paralel iki siklus ortaya çıkar 1- ovaryan siklus, 2- uterus siklusu.

Erkek ve kadında cinsel fonksiyonlar hipotalamus ve adenohipofizden salgılanan hormonlarla düzenlenir. Bu düzenleme hipotalamustan salgılanan gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH) ile başlar. GnRH adenohipofizden lüteinize edici hormon (LH) ve follikül stimüle edici hormon (FSH) salgılanmasına neden olur. LH ve FSH adenohipofizdeki gonadotrop hücrelerden salgılanır ve ikisi birlikte gonadotropik hormonlar olarak adlandırılır.

LH kadınlarda ovülasyonu ve ovaryan follikülün korpus luteum adı verilen endokrin yapıya dönüşümünü uyarır. FSH ise ovaryal folliküllerin gelişme ve salgısını uyarır.

Normal erişkin bir kadında hipotalamustan her 1-3 saatte bir, birkaç dakika süreyle, patlama tarzında (pulsatil) GnRH salgılanır. GnRH on aminoasitli bir peptit olup hipotalamusun arkuat çekirdeğinde sentezlenir. Burada salgılanan GnRH hipotalamo-hipofizeal portal sistem yoluyla adenohipofize taşınır. GnRH adenohipofizden hem LH hem de FSH salgılanmasına neden olur.

Adenohipofizden LH salınımı tıpkı GnRH salınımı gibi patlama şeklindedir. FSH salınımı ise farklı olarak devamlıdır. FSH ve LH glikoprotein yapısında hormonlardır. FSH ve LH ovaryumlarda etkilerini hedef hücre membranlarında bulunan reseptörlerine bağlanarak gerçekleştirir. LH teka hücrelerinde FSH ise granüloza hücrelerinde etkilidir. LH teka hücrelerindeki reseptörlerine bağlanarak östradiol yapımını uyarır. Teka hücrelerinde sentezlenen androsteneidon FSH'ın etkisiyle granüloza hücrelerinde östradiole dönüştürülür (10,11,12).

Folikül ovülasyon öncesi son evreye geldiğinde yoğun LH ve FSH salgısı olur. Siklusun 12-13. Günü follikül çok fazla miktarda östrojen salgılar. Artan östrojen pozitif geri bildirim ile adenohipofizden LH salgısını artırır. Ovulasyondan yaklaşık 18 saat önce artan LH ve FSH seviyesi ovülasyonu ve korpus luteum oluşumunu tetikler. LH'in ovülasyon öncesi artışı olmadan ovulasyon olmaz.

Menstrüel siklus sırasında LH ve FSH'ın ani salınımı ve bunun sonucunda ovulasyonun gerçekleşmesi, merkezi sinir sisteminden çok ovaryumlar tarafından tarafından oluşturulur. Fonksiyonel bir ovaryum yoksa periyodik LH ve FSH salgısı da olmaz. Ancak dominant follikül ovülasyon öncesi evreye geldiğinde yüksek miktarda LH ve FSHsalgısı olur.

GnRH , LH ve FSH salgısı östrojen tarafından negatif geri bildirim ile düzenlenir. Östrojen salgısının artması LH salgısını inhibe eder. Bu baskılama hem hipotalamustan GnRH salgısını inhibe ederek hem de adenohipofizi doğrudan etkileyerek ortaya çıkar.

2.1.2.4 Ovaryumun embriyolojik gelişimi

Ara mezoderm dorsal vücut duvarı boyunca uzunlamasına bir yükseklik oluşturarak ürogenital kabartıyı meydana getirir. Sölm epiteli ve altındaki ürogenital kabartı mezodermi çoğalarak gonadal kabartı şeklinde biçimlenir. Primer cinsiyet kordonları gonadal kabartıdan gelişir ve yolk kesesi duvarından gonada göç eden primordiyal germ hücrelerini içerir. (13, 14, 15)

Primordiyal germ hücreleri gelişimin haftasında epiblasttan köken alır ve yolk kesesinin endoderm ve mezoderm tabakalarına göç eder. Primer seks kordonları gelişmekte olan ovaryum medullasına kadar uzanır. Burada birbirleriyle ağzlaşarak rete ovariiyi oluştururlar. Rete ovarii ileri aşamalarda dejenere olur ve oortadan kalkar. Daha sonra ince bir tunika albuginea şekillenirken ikincil cinsiyet kordonları gelişir ve primordiyal germ hücreleri bu kordonların içine yerleşir (13, 14, 15).

Sekonder seks kordonları parçalara ayrılarak primordiyal folliküller olarak bilinen izole hücre kümelerini oluştururlar. Bu hücre birlikleri içerisinde primer oositler ve onları çevreleyen basit yassı hücre tabakası bulunur.

Primer oositler, primordiyal germ hücrelerinden türerler. Primordiyal follikülün basit yassı hücreleri ve ovaryumun bağ dokusu stroması ise mezodermden kökenlenir.

2.1.2.4.1 Ovaryumların göreceli inişi

Ovaryumlar başlangıçta abdomende gelişir, ancak daha sonra pelvis bölgesinden uzaktaki üst abdominal bölgenin orantısız büyümesi nedeniyle pelvise doğru göreceli olarak alçalır. Bu alçalmada gubernakulumun etkili olduğu bilinmektedir. Gubernakulum, arka duvar boyunca izelenen fibröz bir doku bandıdır;

bu bant ovaryumun medial kutbundan uterin kanalların bileşke noktasında uterusu kadar uzanarak ovaryan ligamenti oluşturur.(13, 14, 15)

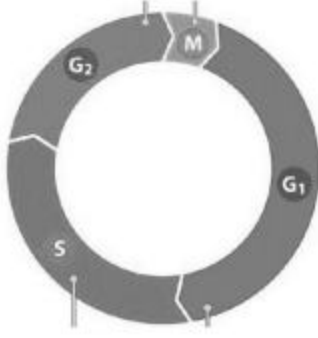
Gubernakulumdan labia majorlara uzanarak uterusun yuvarlak ligamentini oluşturur. Periton, proses vaginalis'i oluşturmak için gubernakulumun yanı sıra uzanır. Prosesus vaginalis kadınlarda gelişim sürecinin sonraki evrelerinde ortadan kalkar.

2.2. Kanser

Kanser, sağlıklı vücut hücrelerinden farklı olarak, organ veya dokuda gerçekleşen kontrolsüz ve düzensiz şekilde meydana gelen hücre bölünmesi, çoğalması ve yayılması durumudur. Düzensiz şekilde çoğalan bu hücreler çoğu kez bir araya gelerek tümör adı verilen hücre yığınlarını oluşturur. Sağlıklı vücut hücreleri bölünmenin birkaç aşamasında kontrole tabi tutulurlar ve düzenli olarak çoğalmaları ve çoğalmamaları sağlanır. Canlı yaşamının erken evrelerinde hızlı ve çok sayıda olan bu bölünmeler, canlılar olgunluğa eriştiğinde sadece yenilenme, onarım v.b destek işlemlerinin yapılması için gerçekleşir.

2.2.1. Hücre döngüsü ve kanser

Kanser hücrelerinde çoğunlukla hücre bölünme döngüsünün düzenlenmesinde aksaklıklar söz konusudur. Hücre döngüsü biri G2/M geçişi , diğeri ise geç G1 fazının da dahil olduğu noktada ve M kontrol noktasında olmak üzere farklı bir çok noktada denetimi sağlanmaktadır (16).



Şekil 3: hücre döngüsünün kontrol noktaları (17).

Kanser hücrelerinin çoğalması ve tümör kitlelerinin büyümesinde 4 ana mekanizma rol oynamaktadır;

- 1- Apoptozis yollarında meydana gelen aksaklıklar
- 2- Hücre proliferasyonunun aşırı indüklenmesi
- 3- Tümör baskılayıcı genlerdeki bozukluklar
- 4- Tümör anjiyogenezi (16)

2.2.1.1. Apoptoz

Apoptoz, vücut içi homeostasin sağlanmasında önemli bir yere sahip olan fizyolojik düzenleyici mekanizmadır. Apoptoz mekanizmasında meydana gelen bozukluklar kanser veya hipertrofi gibi patolojik olaylarda önemli olduğu kadar gelişimin fizyolojik basamaklarında da etkin rol oynamaktadır.

Hücre yapım-yıkımı apoptozun rol aldığı önemli fizyolojik olaylardan biridir. Örneğin; deri, barsak epiteli, kan hücreleri gibi hücre yapım-yıkımının hızlı olduğu dokularda yaşanan hücreler apoptozla ortadan kaldırılır ve yerine yeni hücrelerin yapımı sağlanır. Yenidoğan timusunun involusyonu sonucunda T lenfositlerin yaklaşık %98'inin seleksiyona uğradığı bilinmektedir. Ayrıca B hücrelerinde de lenfositlerinin duyarlı olduğu uyarılarla yeniden karşılaşması durumunda hazır bulunmasını sağlamak amacıyla apoptozun baskılandığı belirtilmektedir (18).

Apoptoz basamakları genetik düzenlenme ile işlemektedir, hatalı ya da hasarlı DNA'nın apoptoza gitmemesi sonucunda kromozom sayısının korunumunda devamlılık sağlanamaz ve anöploidi gibi istenmeyen durumlar oluşabilir (19). Kanserli hücrelerde genellikle hücre apoptoza gidemez ve bunun sonucu olarak tümör dokusu sürekli büyüme eğilimindedir.

2.2.1.2. Genetik defektler

Kanser ile ilişkilendirilmiş üç ana gen ailesi vardır. Bunlar onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım genleri olarak adlandırılır. Protoonkogenler normal hücrelerde hücre bölünmesinin kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmesinden sorumludur. Hücre membran yapısındaki reseptöre uygun büyüme faktöründen, reseptöre ve çekirdeğe kadar giden yolda rol alan tüm protoonkogenler gerektiği zamanlarda aktivite göstererek normal hücre bölünmesi olaylarını kontrol ederler (16).

Bu süreçte rol alan genlerden herhangi birisinin aktivasyonu arttırıcı yönde, mutasyon meydana gelirse bu durum genellikle hücre çoğalmasının kontrolünün kayması ve aşırı hücre proliferasyonu ile sonuçlanır. Hücre bölünmesinin düzenlenmesi için, bu genlerin ve/veya bu genlerin ürünlerinin inaktifleştirilmiş durumda olmaları gerekmektedir. Protoonkogen mutasyonlarının sonucunda onkogen adı verilen kontrolsüz hücre çoğalmasının uyarılmasına neden olan genler oluşur (16).

Onkogenlerin en bilinenleri; büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, sinyal iletim proteinleri ve transkripsiyon faktörleridir.(20).

2.2.1.3. Tümör baskılayıcı genler:

Tümör baskılayıcı genler onkogenlerin aksine hücre bölünmesini durdurucu etki gösterirler ve inaktivasyonları tümör gelişimini tetikler (21).

Tümör baskılayıcı genler ilk kez herediter ve sporadik formları olan ve çocukluk çağında en sık görülen göz içi tümörü retinoblastomda tespit edilmiştir (16).

Proapoptotik veya antiapoptotik proteinler, hücre siklusu kontrol proteinleri, DNA tamir proteinleri, hücrelerarası iletişimde görevli proteinler tümör baskılayıcı genlere örnek olarak verilebilir. Tümör baskılayıcı genler p53 geni başta olmak üzere RB1, WT1, NF1, NF2, DCC, BRCA1, BRCA2 olarak örneklendirilebilir (20).

Onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım genleri kanserle bağlantılı mutasyonlarda ana neden olmakla beraber mutasyonlar aynı zamanda karsinojenleri aktive ya da deaktive eden genlerde, hücre sinyal genlerinde, hücre döngüsü kontrol noktaları genlerinde, hücresel diferansiyasyon genlerinde, metastaz genlerinde, hücresel senesans genlerinde de olabilir (22).

2.2.1.4. Tümör anjiyogenezi

Dış etkileyenlerin yanı sıra kanser hücresi kendi büyümesini stimüle eden büyüme faktörleri üretebilir. Bu faktörler de kanser hücrelerinin direnç kazanması, çoğalması ve yayılmasında etkili olur. Yeni damar gelişimi olmayan tümörler asemptomatik lezyonlar olarak kalır. Tümörlerin damar gelişimini indükleyemezlerse yıllarca yaşamı tehdit etmeyecek şekilde dormant halde kalabilirler (23).

Tümörlerin salgıladıkları büyüme faktörleri içinde Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) anjiyogenezi oluşturan önemli bir sitokindir.

2.3. Ovaryum kanseri

Ovaryum kanseri, kadın reproduktif sistem kanserleri arasında en çok ölüme sebep olan kanser türüdür . Kadınlar arasında tüm malignitelerin% 2,5'ini oluştururken, büyük ölçüde geç evre tanıları nedeniyle düşük sağ kalım oranları nedeniyle kadın kanser ölümlerinin% 5'ini oluşturur (24, 25).

2018 yılında ABD'de yaklaşık 22.240 yeni over kanseri tanısı ve 14.070 over kanseri ölümü yaşanacağı ön görülmüştür (26). Ovaryum kanseri ölüme neden olma açısından genel kanserler içerisinde meme, bağırsak ve akciğer kanserinden sonra dördüncü sırayı almaktadır. Ayrıca endometrium ve serviks kanserinin toplamından daha fazla ölüme sebep olur. Çünkü hastalık ileri evrelere ulaşana kadar herhangi bir belirti vermemektedir. Ovaryum kanserlerinin % 90'ı epitelyal kökenlidir.

Önleme ve erken tespitinin iyileştirilmesi, bir araştırma önceliğidir, çünkü lokal bir aşamada teşhis edilen hastalıkta 5 yıllık bir nispi hayatta kalma oranı % 93'tür (25). Hastalık uzun bir dönem belirti vermeden veya spesifik olmayan semptomlarla seyrettiğinden, hastaların %70-80'i üçüncü ve dördüncü evrede hekime başvurmaktadır. (24).

Hastayı hekime götüren şikayet genellikle karın ağrısı ve karın şişliğidir. Ovaryum kanser hücrelerinin vücudun diğer bölgelerine metastaz yapabilme yeteneği ovaryum kanser hastaları arasında morbidite ve mortalitenin başlıca nedenidir.

Epitelyal ovaryum tümörleri lenf ve kan yoluyla uzak bölgelere metastaz yapabilir de en sık peritoneal boşluğa bazen de yakın bölgedeki lenf düğümlerine metastaz yapmaktadır (27).

Olguların sadece % 2-3 kadarında akciğer ve karaciğer gibi uzak bölge metastazları görülmektedir. Evre I' de tanı alanlarda 5 yıllık sağ kalım oranı % 90'dan fazla iken, evre III ve IV'de tanı alanlarda ise bu oran % 25'dir (28).

Genetik ve etnik farklılıklara ek olarak pek çok üreme ve diyet faktörleri, alkol tüketimi, ovaryum kanseri için risk faktörleri arasında yer almaktadır. Hastaların %70'i, FIGO (Uluslararası Jinekolojik ve Obstetrik Federasyonu) sınıflandırmasına göre ilerlemiş evre olan III ve IV. evrede teşhis edilmektedir. Çünkü uzun süre belirti göstermeyen gizli bir başlangıcı vardır (29). Metastaz, adezyon reseptörlerinin ve proteazların kontrollü etkileşimleri ile düzenlenmektedir ve geç metastaz, onkogen odaklı mezotelial kaplı yüzeylerde tümör nodüllerinin hızla büyümesi ile karakterize edilmektedir (27).

2.3.1 Ovaryan Kanser Alt Tipleri

Ovaryum kanseri, hücre / menşe bölgesi, patolojik derecesi, prognoz ve tedavi yöntemine göre farklılık gösteren bir çok heterojen malignite grubunu kapsar (30, 31).

Epitelyal ovaryum kanserleri, tüm ırk / etnik grupların kadınları arasında en yaygın olanıdır, tüm vakaların% 90'ını oluşturur. Epitelyal kanserleri, tümör hücrelerinin histolojisi karakterizedir. Seröz (% 52), endometrioid (% 10), müsin (% 6) veya saydam hücre kanseri (% 6) olarak sınıflandırılır, geriye kalan yaklaşık %25'lik kısım ise daha nadir veya tanımlanamayan alt tipler oluşturur. (32).

Epitelyal maligniteler ayrıca klinikopatolojik faktörlere dayanarak tip I veya tip II olarak gruplandırılır (31).

Tip I over kanserleri, agresif olmayan olan genellikle büyük, tek taraflı, kistik tümörlerdir. çoğunlukla overde yerleşik olan ekstraovaryan benign lezyonlardan geliştiği ve daha sonra malign transformasyonla sonuçlanan bir dizi mutasyon geçirdiği düşünülmektedir.

Bu şekilde, düşük dereceli seröz karsinomların (endosalpingiosis), yumurtalıklarda benign fallop tüpü epiteli birikimlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. endometrioid ve berrak hücreli karsinomlar yumurtalıklarda endometrial dokunun benign odaklarından (endometriozis) kaynaklanmaktadır ,çoğu mukus kanserleri, tüboperitoneal kavşaktan geçiş epitelinin iyi huylu odaklarından kaynaklandığı düşünülmektedir (31).

Tip I over kanserleri, berrak hücreli karsinomlar hariç, düşük dereceli kabul edilir ve sadece over kanseri ölümlerinin küçük bir kısmını oluşturur. Tip II epitelyal kanserler yüksek derecelidir ve her iki yumurtalıkta, agresif davranış, geç evre tanılanabilme ve düşük sağkalım ile karakterizedir. Yumurtalıklara ve / veya peritona yayılan fallop tüpü fimbria karsinomları olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu kanserli kadınlar sıklıkla geniş ekstraovaryöz hastalık ve assit şikayeti ile ortaya çıkarlar. Tip II kanserler, primer olarak en yaygın epitel alt tipi olan yüksek dereceli seröz karsinomlardır, fakat aynı zamanda karsinosarkomları ve farklılaşmamış karsinomları da içerir. Her ne kadar tümör derecesi klinik uygulamada önemli olsa da, sağlam ve bağımsız bir prognostik gösterge olmaması dikkat çekicidir. (31).

Epitelyal olmayan kanserler tipik olarak epitelyal malignitelerden daha az agresifdir. Germ hücresi ve seks - kord stromal tümörleri, nonepitelyal kanserlerin çoğunu oluşturur, ancak tüm over kanserleri içinde sırasıyla% 3 ve% 2'sini oluşturur . Seks - kordstromal tümörleri, granulosa, Sertoli ve / veya Leydig hücreleri dahil olmak üzere çeşitli bağ doku hücre tiplerinden kaynaklanmaktadır. Diğer epitelyal olmayan

yumurtalık kanserleri arasında küçük hücreli karsinom (hiperkalsemik ve hiperkalsemik olmayan tipler) ve ovaryum sarkoması bulunur (25).

2.3.2. Ovaryum Kanseri Metastazı

Ovaryum kanseri, diğer pek çok kanser tipinde bulunan hematöjenöz metastazdan farklı olarak eşsiz bir biyolojik davranış gösterir. Örneğin; meme ve kolon kanseri hücreleri farklı birkaç aşamadan sonra diğer organlara metastaz yaparlar. Ovaryum kanser metastazı biraz daha kolaydır ve kanser hücreleri primer tümörden ayrıldıktan sonra pasif bir mekanizma ile metastaz olurlar. Yani peritoneal sıvının peritona ya da omentuma doğru fizyolojik hareketiyle taşınırlar.

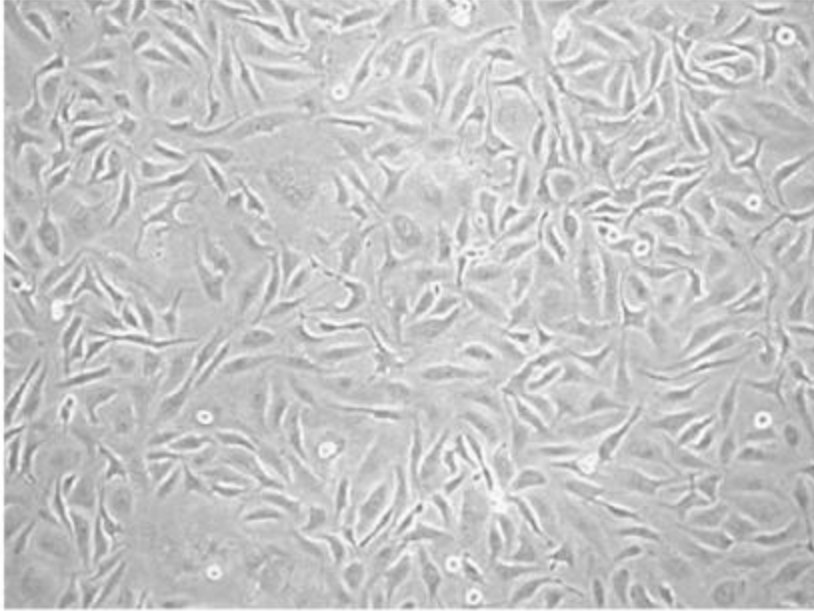
Tümör invazyonunun ve metastazının üç temel aşaması:

- 1) Vasküler endotel ve ekstrasellüler matrikse tutunma,
- 2) Lokal proteoliz
- 3) Hareketlilik kazanma

olarak sıralanmaktadır. Son iki basamakta birçok proteolitik enzim rol oynamaktadır. Bu enzimler normal organizmada da mevcut olup malignitelerde yüksek plazma seviyelerinin artmış metastaz yeteneği ile birlikteliği gösterilmiştir. (33).

2.4. SKOV-3 hücre hattı

SK-OV-3 [SKOV-3; SKOV3] (ATCC® HTB-77™), epitelyal morfolojiye sahip bir insan ovaryum kanseri hücre hattıdır. Bu hücre hattı, 1973 yılında yumurtalık adenokarsinoması olan 64 yaşındaki Caucasian bir kadının assitlerinden izole edilerek çoğaltılmıştır. Adherent büyüme özelliği gösteren bu hücreler, tümör nekroz faktörüne ve difteri toksini, sisplatin v.b. gibi diğer sitotoksik ilaçlara karşı dirençlidir. Bu hücrelerin immün sistemi baskılanmamış farelere intra-peritoneal enjeksiyonu, iki ila üç ay içerisinde berrak hücreli adenokarsinomu andıran tümörlerin büyümesine neden olur. Genetik özellik olarak hipodiploid insan hücre hattıdır.



Şekil 4 : Skov hücrelerinin morfolojik yapısı

2.5. Doxorubicin

DOX (DOX); ovaryum, meme, akciğer ve karaciğer kanseri gibi birçok kanser türünde yaygın olarak kullanılan antitümör ajandır (34, 35) . DOX ile ilgili çalışmalar, etki mekanizması gereği DNA zincir kırıklarına sebep olduğunu, teratojenik ve mutajenik etki gösterdiğini, serbest oksijen radikallerinin oluşumuna sebep olduğunu ve hücrede apoptozun indüklenmesine sebep olduğunu ortaya koymuştur. (1, 2, 3)

DOX ile tedavi edildiğinde etkili sonuçlar alınan kanserler ;, osteosarkoma, yumuşak doku sarkoması, meme ve özafagus karsinomları, Hodgkin ve non-Hadgkin sarkomalarıdır. Tedavisi daha az efektif olmasına rağmen, , pankreatik ve endometriyal gastrik, hepatik karsinomlar da DOX ile tedavi edilmektedir (36).

Antrasiklin molekülü, tetrasiklik yapıda bir çekirdek ve amino şekerden oluşur. Tetrasiklik çekirdek, ilaca kırmızı-turuncu rengini verir. Grubun tüm üyelerinin tetrasiklik halkaya komşu kinon ve hidrokinon grupları vardır ve Daunorubisin molekülündeki 14. karbonunun hidroksil grubu alması ile DOX meydana gelir (37).

Birkaç farklı etki mekanizması tespit edilmiştir. Kompleks oluşturarak DNA'ya bağlanarak DNA replikasyonunu, RNA transkripsiyonunu ve sentez mekanizmalarını inhibe eder sonuç olarak DNA kırıkları oluşur. Bunun yanı sıra direkt olarak DNA ve RNA polimerazları inhibe ederek işlevlerini engeller ve replikasyon ve transkripsiyonu sonlandırır. Hücre membranı üzerine de etkileri olduğu bilinmektedir. Hücre membran yapısına bağlanarak membran yapısını bozar hücrenin apoptoza gitmesine yol açar (38, 39).

Serbest radikal oluşumuna da yol açtığı bilinen DOX hücrede negatif stres oluşturur (2).

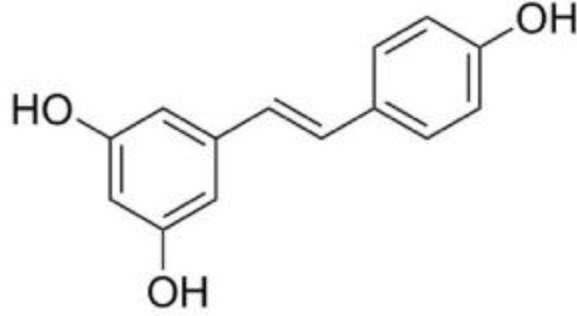
DOX'un malign hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi ve çeşitli organlar üzerindeki (kalp, karaciğer, akciğer, böbrek, kan hücreleri ve testis) toksik etkilerinin; nükleotid baz interkalasyonu ve hücre membranı lipit bağlama aktiviteleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (40, 41).

Günümüzde kanser tedavisinde kaydedilen aşamalarla kanserli hastaların tedavi sonrası hayatta kalma süreleri artmıştır. Bununla birlikte araştırmalar kanser tedavisi sonrası yaşam kalitesini arttırmaya odaklanmıştır. Kemoterapi kaynaklı infertilite kanser sonrası yaşam kalitesini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Kemoterapi öncesi ovaryum -sperm dondurma gibi opsiyonlar olmasına karşın bu yöntemlerin maliyeti, başarısızlık riskinin olması in vitro fertilizasyon gibi ekstra işlemlere gereksinim duyulması koruyucu tedavilerin önemini ortaya koymaktadır.

Sık kullanılan bu kemoterapi ajanlarının doğurganlık üzerine negatif etki yaptığı bilinmektedir (42, 43). Yapılan çalışmalarda DOXin, dişi wistar albino sıçanlarda üreme sisteminde toksisiteye sebep olduğu gösterilmiştir (44). Kemoterapinin neden olduğu gonadal toksisitenin değerlendirilmesi, esas olarak menstrüel öykü, amenore insidansı, hormon düzeyleri gibi indirekt parametrelere dayanır (45, 46, 47). Eski çalışmalarda folliküler hasara neden olan pregranüloza hücrelerindeki apoptotik değişiklikler ve (46, 48), cyclophosphamide uygulamasının ardından kan damarları ve ovaryan yüzeysel kortikal fibrozis görülmüştür (46).

2.6. Resveratrol

Resveratrol (RES), geniş bir yelpazede terapötik araştırma alanlarında, uzun yıllar boyunca yoğun olarak çalışılmış küçük bir polifenoldür. Polifenoller, antioksidan olarak işlev yapabilmenin yanısıra insan vücudundaki çeşitli nedenlerle oluşmuş serbest radikalleri temizleme yeteneğine sahiptirler.



Şekil 5: Resveratrolün kimyasal formülü

Yapılan çalışmalarda oksidatif stresi azalttığı tespit edilmiş ve buna bağlı olarak kardiyovasküler hastalık ve kanser riskini de azalttıkları düşünülmektedir (49). Doğal bir polifenol olan RESün de kardiyovasküler hastalıklar, kanser, tip 2 diyabet ve nörolojik hastalıklar gibi yaş ile ilgili hastalıklarda yararlı etkilere sahip olduğunun yapılan çalışmalarla gösterilmesi büyük ilgi görmüştür (50). RES bitkilerin kendini mikrobik, fungal, fiziksel uyaranlardan koruma amaçlı ürettiği antimikrobiyal ve antifungal etkili bir birleşiktir yani fitoaleksindir (50).

RES'in çok çeşitli bitki türlerinde, özellikle dutgillerde, yer fıstığında ve üzümde doğal olarak bulunması, bu maddeye olan ilgiyi daha da arttırdı ve doğal ilaç ve diyet takviyesi için RES kullanma durumunu ortaya çıkarmıştır.

Fransa'da kırmızı şarap tüketimi ile kardiyovasküler hastalık sıklığı arasında ters orantı olduğu belirtilmiştir (Fransız paradoksu) (51). RES'ün doğal antioksidan rolü, koenzim Q ile yarışmak ve ROS (Reaktif Oksijen Türevleri) oluşum yerinde oksidatif zincir kompleksini azaltmak, mitokondride oluşan süperoksit radikalini yakalamak ve fenton reaksiyonu ürünleri tarafından indüklenen

lipid peroksidasyonunun inhibisyonunu sağlayarak üç önemli antioksidan mekanizmasıyla açıklanabilir.

Birçok çalışmada, RESün süperoksit ve hidroksil radikalini yakalama yeteneğinin olduğu belirtilmiştir. Buna karşın RESün bu özelliği diğer pek çok güçlü antioksidandan daha zayıftır. RESün, $9.45 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ tepkime hızı ile hidroksil radikalini yakalayabilmesi, askorbik asit gibi potent bir radikal yakalayıcısından daha yavaş olduğunu göstermiştir. RESün in vitro şartlarda ROS'un zayıf yakalayıcısı olmasına rağmen in vivo koşullarda güçlü bir antioksidan işlevi gördüğü belirtilmiştir (51).

RES'in in vivo koşullarda nitrik oksit sentezini artırma yeteneği ile antioksidan özelliği güç kazanmaktadır. RES in vivo koşullarda antioksidan olarak, nitrik oksit süperoksidi yakalama yeteneğine sahiptir. RESün biyolojik sistemlerde bulunan diğer antioksidanların hücre içi konsantrasyonlarının sürdürülmesini sağladığı da bildirilmiştir (52).

RES'in hidrojen peroksit ile aktive olan insan lenfositlerinde glutatyon miktarında artışa sebep olduğu belirtilmiştir. Ayrıca insan lenfositlerinde RESün glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon -S-transferaz gibi glutatyon metabolizması ile ilgili enzimlerin miktarını arttırdığı belirtilmiştir (53).

RES doğal bir fitoaleksin olarak antioksidan ve antiproliferatif etki gösterir. RESün inflamatuvar olaylarda ve karsinogenezde düzenleyici rol oynadığı bildirilmiştir. Ayrıca RESün antioksidan, antisiklooksijenaz, lipid ve lipoprotein metabolizmasını düzenleyici etki gösterdiği de belirtilmiştir (54, 55).

RES hem normal hematopoietik progenitör hücrelerin hem de lösemik hücre hatlarının doza bağlı gelişmesini engellemesine rağmen, lösemik hücre hatlarına kıyasla normal hematopoietik progenitör hücreler üzerine olan antiproliferatif etkisinin çok daha az ve geriye dönüşümlü olabildiği bildirilmiştir (56).

RESün radikal süpürücü etkisi sayesinde deoksiribo nükleik asit (DNA) hasarını azalttığı belirtilmiştir (57). Spinal kord yaralanmalarında RESün etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 99% saflıktaki RESün steril tuzlu suda hazırlanıp tavşanlara intravenöz yolla 100 µg/kg verildiği ve olumlu sonuçlar gösterdiği bildirilmiştir (58).

Yeni Zelanda tavşanlarında yapılan iskemi reperfüzyon çalışmasında, RESün omurilik hasarından koruyucu etkisi olup olmadığı araştırılmış, RES 5 dakikalık infüzyonla 1 ve 10 mg/kg dozda uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda RESün oksidatif stresi azalttığı; malonaldehit düzeyini, kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde azalttığı bildirilmiştir (59).

Sıçanlarda sisplatinin kardiyotoksitesini incelemek için yapılan çalışmada, RES'ün miyokardiyal hasarı azalttığı, laktat dehidrogenaz artışı ve antioksidan enzim aktivitelerindeki azalmayı önlediği ve malondialdehit artışı engellediği bildirilmiştir. Bunun yanında, RESün kanser hücrelerinde sisplatin ile oluşan sitotoksositeye karşı da koruyucu olduğu bildirilmiştir (60).

2.7. Elektromanyetik alan

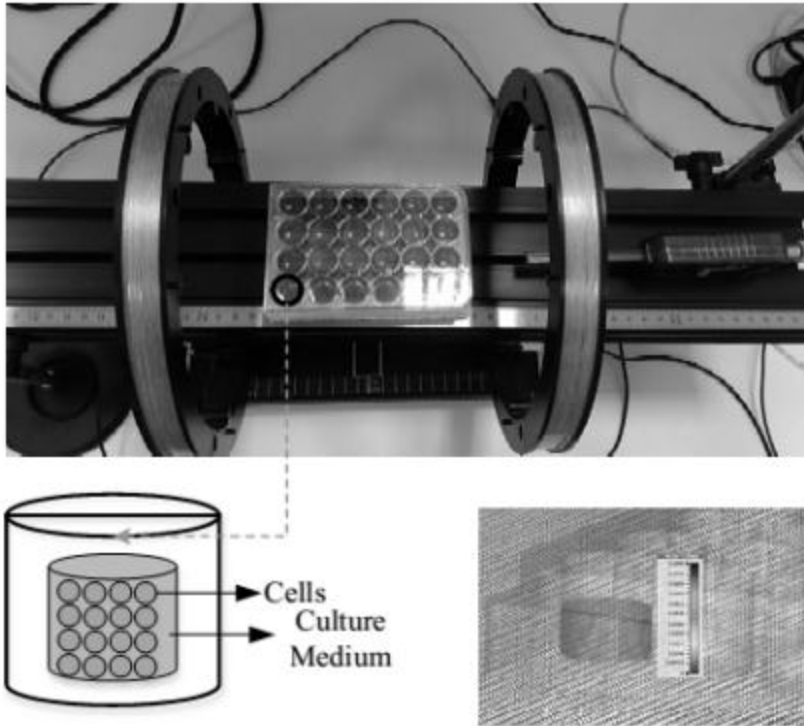
2.7.1. Darbeli elektromanyetik alan

Biyomanyetizmadaki temel soru, belirli bir sinyal tipi için hücreler tarafından tanınan dalga şekli parametreleri aralığını bilmektir (61). Bu etkileşimlerin

mekanizmaları ve sinyallerin hücre ve doku işleyişini modüle etme olasılığı henüz açık değildir (62). Bilimsel ve tıbbi topluluklar, farklı dokulara uygulanan aynı manyetik alanların neden farklı etkilere neden olabileceğini anlamaya çalışmaktadırlar (63).

Denklemin tıbbi kısmı, doğru bir teşhis ve tam hedefin yanı sıra, hedefin alması gereken EMF “dozu” nu tanımlamayı gerektirir. Daha sonra fizikçiler ve mühendisler, hedef dokunun gerekli manyetik akı yoğunluğunu almasını sağlayacak olan uygun protokol ve pozlama sistemini sunmalıdır. Bu nedenle, teorik modeller ve biyofiziksel dozimetri, yeni PEMF terapötik cihazlarının mühendisliği ve klinik uygulaması için uygun sinyallerin seçiminde etkili olabilir.

Doku bakımı, onarımı ve yenilenmesi ile ilgili önerilen elektro manyetik alan sinyal iletim yolu, calmodulin'e (CaM) voltaj bağlı Ca^{+2} (fiziksel ve kimyasal uyarılarla aktiveleştirilen ve sayısı arttırılan Ca^{+2}) bağlanması ile başlar.

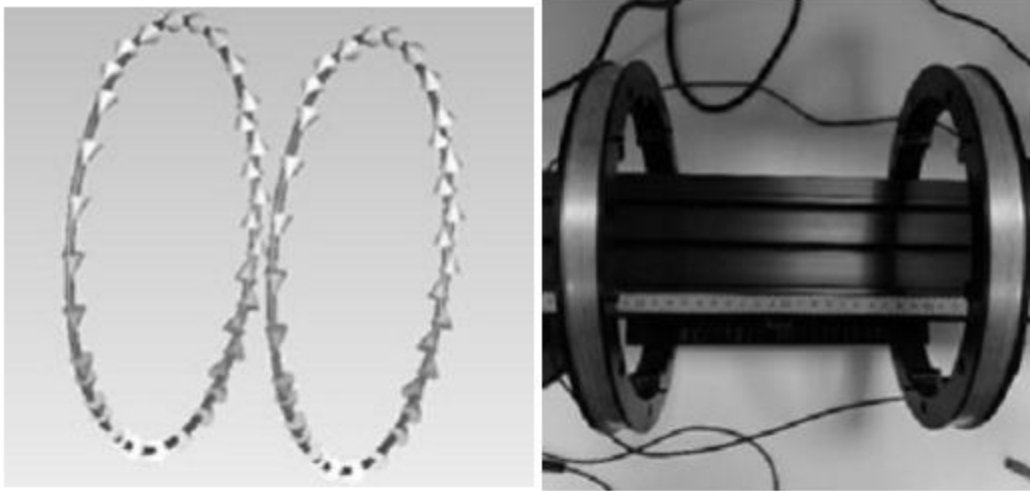


Şekil 6: Helmholtz coil ile PEMF invitro uygulanması

2.7.2. Darbeli elektromanyetik alan (PEMF) uygulamaları ve parametreler

PEMF uygulamalarındaki ana parametreler frekans, dalga şekli ve alanın yoğunluğu ve maruz kalma süresidir. Uyarılmak istenen bölgeye elektrik alanın teslimi en önemli amaçlardandır. Bu nedenle etkili stimülasyon için, bobin şekli ve boyutunun önemli parametrelerden biri olduğu kabul edilmiştir. Farklı şekillerde bobinler, farklı özelliklere sahip elektrik alanlarını indükler.

Geniş alanların uyarılması gerektiğinde, elektromanyetik alanın alan üzerinde tek biçimli olması gereklidir. Bu gibi durumlarda, kayda değer bir hacim üzerinde homojen bir manyetik alan sağlayan ve bobinin dışından kolayca erişilebilen bir bobin sisteminin olması arzu edilir. Helmholtz's and Ruben's bobinleri bunlara örnek olarak verilebilir.



Şekil 7: Helmholtz bobini şematik ve esas görüntüsü.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Hücre hattı

Çalışmamızda etken maddelerimiz ve harici uygulamalarımızın etkisini incelemek için ovaryum kanseri hücre hattı olan SKOV-3(ATCC-HTB-77™) kullanılmıştır. Hücreler Dr. Öğr. Üyesi Sibel ERDEM'den [Medipol Üniversitesi, Rejeneratif ve Restoratif Tıp araştırmaları merkezi (REMER)] temin edilmiştir.

3.1.2. Hücre kültüründe kullanılan araçlar

Sıcak su banyosu, -80 buzdolabı, +4 ve – 18 buzdolabı (Vestel), CO₂ inkübatör (Heraus), Flow cabin, İverted mikroskop, Fleurasan mikroskop, Mikropipet, Distile, su cihazı, Etüv (nüve), Otoklav cihazı (nüve).

3.1.3. Hücre kültüründe kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar

DMEM medium, (Thermo-31330038), McCoy's 5A medium,, Penisilin-streptomisin (Thermo-15140122), L-Glutamin (Thermo- 250300024), Fetal Bovine Serum (Thermo-10500064), DMSO, PBS, Etil alkol, MTT test, DOX, Resveratrol, TUNEL test

3.2 YÖNTEM

3.2.1. Deney gruplarının belirlenmesi

Çalışmada deney grupları aşağıdaki tablodaki gibi olacaktır.

Tablo 1: Deney grupları

Kontrol	Darbeli elektromanyetik alan uygulaması
DOX (IC ⁵⁰)	DOX (IC ⁵⁰)
RES (IC ⁵⁰)	RES (IC ⁵⁰)
DOX (IC ⁵⁰)+RES (IC ⁵⁰)	DOX (IC ⁵⁰)+RES (IC ⁵⁰)
Uygulamasız flask	Uygulamasız flask

3.2.1.1 Kullanılan etken maddelerin IC⁵⁰ değerlerinin tespiti

IC⁵⁰ değeri, bir maddenin belirli bir biyolojik veya biyokimyasal fonksiyonu %50 seviyesinde inhibe etmesini sağlayan maksimum konsantrasyonu ifade eder.

Bu kantitatif ölçüm belirli bir hücre reseptörü, organizma,enzim, hücre v.b yapıları yarı yarıya indirmek için gerekli bir ilaç, etken madde veya inhibitörün miktarını belirlemede kullanılır. Değerler molar konsantrasyon olarak ifade edilir.

Farmakolojik araştırmalarda, antagonist ilaç potansiyelinin bir ölçüsü olarak kullanılır. FDA'ya göre, IC₅₀, in vitro olarak % 50 inhibisyon için gerekli olan bir ilacın konsantrasyonunu temsil eder.

Etken madde uygulamalarını takiben yapılacak MTT test sonuçları istatistiksel olarak

İşlenerek IC⁵⁰ değeri elde edilmektedir. Çalışmamızda MTT test sonuçları Graph Pad adlı istatistik uygulaması ile hesaplanarak IC⁵⁰ değeri hesaplanacaktır.

3.2.2-SKOV-3 Hücre hattının açılması

1. -80 derece buzdolabından çıkarılan dondurulmuş SKOV-3 hücrelerinin bulunduğu viyal 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda eritilir.
2. Eriyen hücre laminar flow kabin içerisinde steril 15 ml falkon tüpler içine alınır ve üzerine 5 ml 37°C'ye ısıtılmış tam besi yeri ilave edilir.
3. Hücre süspansiyonu oda sıcaklığında 10 dk 400 x g'de santrifüj edilir. (1200 rpm – 5dk)
4. Laminar flow kabin içerisinde süpernatant atılır ve pellet 5ml tam besiyeri ile resüspanse edilir.
5. Daha sonra süspansiyondaki canlı hücreler hemositometre ile sayılır. Sayılan hücre süspansiyonu içinden 7×10^5 hücre alınır ve steril 15ml'lik falkonda toplam hacmi 5 ml'ye tam besi yeri eklenerek tamamlanır. Bu ml'lik süspansiyon T25 kültür kabına eklenir ve kültür kabı inkübatöre kaldırılır.
6. 24 saat sonra hücrelerin tutundukları alan yüzdesi kontrol edilir. Bu kontroller yapıldıktan sonra hücre flaskın besi yeri alınarak 5 ml taze besi yeri eklenir.
7. Daha sonra hücreler %80-90 kaplama yüzdesine ulaşıncaya kadar 2 günde bir tam besi yeri ile değiştirilir.
8. Hücreler buldukları kültür kabının alanını %80-90 kaplayınca pasajlama işlemine geçilir.

3.2.3-Hemositometre ile hücre sayımı

1. Laminar flow kabin içinde T25 kültür kabındaki hücrelerin tam besiyeri üzerinden atılır ve hücreler 37°C'deki 5 ml PBS ile yıkanır.
2. Hücrelerin üzerine 37°C'deki %0,05'lik tripsin/EDTA çözeltisinden 1 ml konulur ve kültür kabı inkübatöre kaldırılır.
3. Hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrılmalrı sağlandıktan sonra, hücreler 5 ml tam besi yeri ile resüspanse edilir ve hücre resüspansiyonu steril 15 ml falkon

tüpler içine alınır. Hücre süspansiyonu oda sıcaklığında 10 dk 400 x g'de santrifüj edilir.

4. Santrifüj sonrası süpernatant atılır ve pellet 5ml besiyerinde resüspanse edilir.
5. Karışından 20 µl bir santrifüj tüpüne alınır ve üzerine 20 µl %0.4'lük tripan blue eklenir.
6. Neubauer lamının üzerine lamel kapatılır.
7. Tripan blue ile karıştırılan hücre süspansiyonundan 15µl alınır ve lam ile lamelin birleştiği yerden yavaşça bırakılır. Lam ve lamel arasında yayılan süspansiyon mikroskop altına alınır ve sayım gerçekleştirilir.
8. Hücreler sayılırken mavi boyanmış hücreler ölü (mavi), boyayı içine almamış hücreler (parlak beyaz) canlı hücreler olarak kabul edilir.
9. Sayım yapıldıktan sonra 1 ml içindeki hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

3.2.4-Hücre pasajlanması/alt kültür yapılması

1. Kültür kabında %80 oranında çoğalan hücreler laminar akımlı kabin içinde 37°C'deki 5 ml PBS ile yıkanır.
2. Hücrelerin üzerine 37°C'deki 1 ml % 0,05'lik tripsin-EDTA çözeltisi konular ve inkübatöre kaldırılır.
3. Hücrelerin kültür kabından ayrılmasını sağlandıktan sonra üzerlerine 5 ml tam besiyeri konular.
4. Hücre süspansiyonu 15 ml steril falkona alınır ve oda sıcaklığında 10 dk 400 x g'de santrifüj edilir.
5. Süpernatant atılır ve pellet üzerine 15 ml tam besiyeri konular. Oluşan karışım 3 adet T25 flaska eşit olarak paylaşılır.
6. Ertesi gün hücrelerin besiyeri 5 ml tam besi yeri ile değiştirilir. Hücrelerin tutundukları alanı kaplama yüzdesi takip edilir.
7. Daha sonra hücrelerin alan kaplama yüzdesi %80-90'ulaşımaya kadar 2 günde bir besi yeri tam besi yeri ile değiştirilir.

3.2.5.Hücrelerin dondurulması

1. T25 kabın yüzeyini %80 kaplayan hücreler laminar flow kabin içinde 37°C'deki 5 ml PBS ile yıkanır.
2. Hücrelerin üzerine 37°C'deki 1 ml % 0,05'lik tripsin-EDTA çözeltisi konular ve inkübatöre kaldırılır.
3. Hücrelerin kültür kabından ayrılımları sağlandıktan sonra üzerlerine 5 ml tam besiyeri konular.
4. Hücre süspansiyonu 15 ml steril falkona alınır ve oda sıcaklığında 10 dk. 400 x g'de santrifüj edilir.
5. Santrifüj sonrası süpernatant atılır ve pellet dondurma vasatı ile karıştırılarak 2 ml soğuğa dayanıklı cryo viallere bölüştürülür. (dondurma vasatı: 200µl steril DMSO+1800 µl FBS).

3.2.6- Hücre canlılığının MTT test ile ölçülmesi

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), MTT'yi mavi / mor renk veren formazan boyalara indirgeyen canlı hücrelerde mitokondriyal redüktaz aktivitesinin ölçülmesi için bir kolorimetrik yöntemdir. MTT'nin metabolik olarak aktif hücreler tarafından formazan kristallerine bölünmesi ve membran geçirgen sarı tetrazolyum tuzunun oluşmasıyla meydana gelen renk değişimi canlılık derecesi hakkında yorum yapmamızı sağlar.

540 nm'de MTT-formazanın spektrofotometrik ölçümü, hücre canlılığının miktarlanmasını sağlar. Kullanılan reaktifler düşük arka plan absorbansı verir; Hücre sayısı ile üretilen sinyal arasında kuvvetli bir korelasyon vardır ve bu da hücre canlılığının doğru bir şekilde ölçülmesini sağlar.

3.2.7.MTT test protokolü

1. 96 kuyucuklu plate ekim yapılacaktır. Her bir plate için 3000 hücre ekilecek şekilde hemositometre ile hücre sayılır.
2. Hücre yoğunluğı %70'e ulaştığında besi yeri değiştirilir. Hücre  l m  indüklenir.
3. 24 veya 48 saat sonra besi yeri uzaklaştırılır.
4. Hücrelerin  zerine 200 l besi yeri eklenir.
5. Her bir kuyucuğa 50 l 1g/L konsanrasyonunda MTT  zeltisi eklenir ve hücreler 3 saat inkübatörde bekletilir.
6. Inkübasyon sonrası çukurlardaki karışım uzaklaştırılır.
7. Her çukura 160 l DMSO ilave edilir.ve formazan moleküllerinin  z nmesi için her bir çukur pipetlenir.
8. 570 nm'de absorbanları okutulur.

3.2.8.- TUNEL testi ile apoptoza uğrayan hücrelerin tayini

3.2.8.1. TUNEL Testi

Hücrelerin apoptozu sonucu oluşan DNA kırıkları terminal deoksinükleotidil transferaz (TDT) kullanılarak işaretlenebilmektedir. Parafine gömülmüş dokulardan alınan kesitler ve hücre dizileri, TDT ve nonizotopik işaretleli nikleotidler kullanılarak yapılan işretleme ardından floresan veya enzimatik görüntüleme ile apoptotik hücreleri ile sağlıklı hücreleri ayırmada kullanılır.

3.2.8.2. Tunel test protokolü

1. Deney karanlık ortamda gerçekleştirilir.
2. 8 Çukurlu hücre kültürü kabına uygun miktarda ekilmiş ve deney uygulanmış besi yeri uzaklaştırılır. Hücre kültür kabının her bir çukuru 2 kez 500 l PBS ile yıkanır ve PBS uzaklaştırılır.

3. Hücrelerin üzerine %2.5'lik taze hazırlanmış 500µl paraformaldehit ilave edilir ve oda sıcaklığında 15 dk fikse edilir.
4. Her bir çukur 4 kez 500µl pbs ile yıkanır.
5. Hücrelerin üzerine 500µl %0.2'lik Triton X-100 ilave edilir ve 5 dk. Permabilize edilir.
6. Hücreler 3 kere 500µl pbs ile yıkanır.
7. Her bir çukura 150 µl TUNEL reaksiyon karışımı ilave edilerek hücre kültür kabı karanlıkta ve nemli bir ortamda 1.5 saat inkübe edilir.
8. Her çukur 3 kez 500µl PBS ile yıkanır.
9. Total çekirdek sayısının belirlenmesi için DAPI boyamasına geçilir. Hücreler 0.1 µg/ml konsantrasyona sahip 250 µl DAPI çözeltisi ile oda sıcaklığında 15 dk boyunca inkübe edilir.
10. Her çukur 500µl pbs ile yıkanır.
11. Yıkama sonrası çukurlara 150µl antifade çözeltisi eklenir. Floresan mikroskop yardımıyla TUNEL pozitif hücre sayısı ve DAPI ile de toplam hücre sayısı belirlenir. TUNEL pozitif hücre sayısı/DAPI pozitif hücre sayısı oranıyla apoptotik hücre sayısı hesaplanır.

3.2.9 In vitro yara iyileşme modeli (scratch assay)

Yara iyileşme modeli, in vitro olarak hücre göçü ve proliferasyonunun değerlendirilmesi için kullanılan basit ve etkili bir metottur. Bu deney modelinde hücre kültür kabını kaplayan hücreler bir pipet ucu yardımıyla çizilerek/kazınarak in vitro yara oluşturulur. Daha sonra bu çizilin kapanma miktarı hesaplanır. Hücrelerin bu yarayı kapatmasını sağlayan iki olay vardır. Bunlardan biri hücre göçü diğeri ise hücre proliferasyonudur.

3.2.9.1 Protokol:

- 1- 75×10^4 hücre 60 mm kültür petrisine ekilir.

- 2- 2 gün sonra tutundukları kabın yüzeyini %100 dolduran hücreler pipet ucu ile yara oluşturulur. Kültür kabındaki welleri kaplayan hücreler bir uçtan diğer uca çizilir.
- 3- Hücreler 1 kez PBS ile yıkanır, bu sayede çizme esnasında kopan hücreler uzaklaştırılır.
- 4- Hücrelerin üzerine tam besi yeri konulur.
- 5- Hücrelerin T⁰ yara aralık mesafesinin tespiti için faz kontrast mikroskopta fotoğrafı çekilir.
- 6- DOX, RES, düşük darbeli elektromanyetik alan ve kombine uygulamalar gerçekleştirilir.
- 7- Daha sonra 12,24,36,48 saat aralıklarla fotoğraf çekim işi gerçekleştirilir.
- 8- Yara kapanma mesafesi image J gibi fotoğraf analiz programları ile hesaplanır ve ilaçların etkisi incelenir.

3.2.10-Görüntülerin değerlendirilmesi

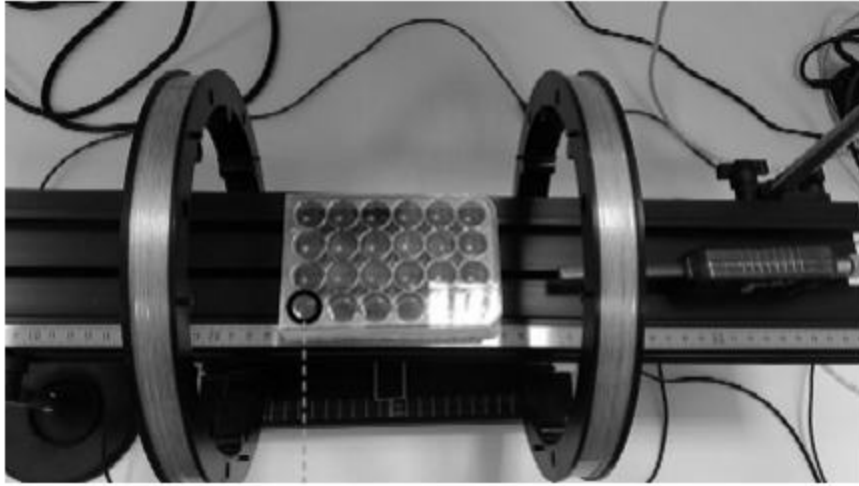
Görüntülerin değerlendirilmesi için Image J programı kullanıldı.

- 1- Ücretsiz ve açık kaynak bir program olan image J indirilir ve yüklenir.
- 2- Program açıldıktan sonra 'Analyze' menüsünden 'Set measurements' tıklanır ve burdan 2area' seçeneği seçilir.
- 3- T⁰ ve uygulama sonrası çekilen fotoğraflar program üzerinde açılır .
- 4- Freehand selection yapılarak yara oluşumda çizilen alan seçilir.
- 5- Analyze kısmından measure tıklanır ve çıkan results tablosundan alan ölçülmüş olur.
- 6- Daha sonra, uygulama öncesi ve sonrası değerler oranlanarak yara iyileşme oranı tespit edilir.

3.2.11-Darbeli elektromanyetik alanın uygulanması

Yukarıda belirtilen protokoller çerçevesinde inokülasyonları ve pasajları yapılan hücreler metota uygun flasklara ya da well platelere alınarak 2 saat 0.2-1.5 mT şiddetinde 75 Hz frekansında 5 volt darbeleri elektromanyetik alana maruz kalacaktır.

Kontrol grupları aynı süre içerisinde inkübatörden dışarı çıkarılarak elektromanyetik alan dışında aynı koşullara maruz bırakılacaktır.



Şekil 8: Helmholtz bobini uygulaması.

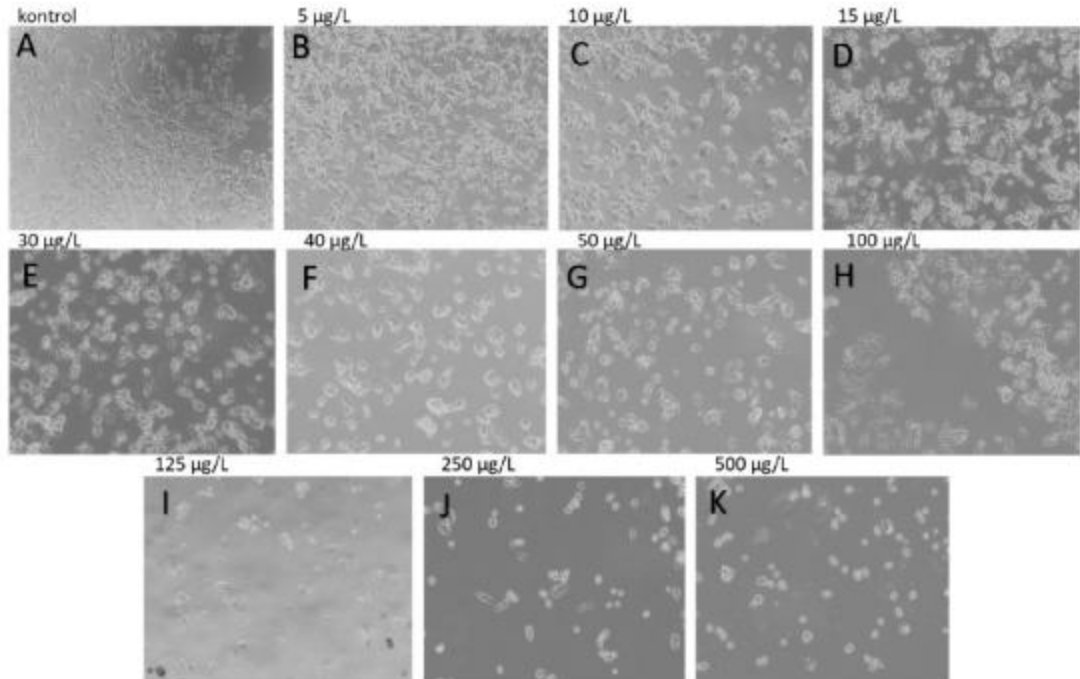
3.2.12-Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Tanımlayıcı istatistikler birim sayısı (n), yüzde (%), ortalama \pm standart sapma ($\bar{x} \pm ss$), medyan, en küçük değer, en büyük değer ve persentil değerler olarak verildi. Sayısal değişkenlere ait verilerin normal dağılımını Shapiro Wilk normallik testi ve Q-Q grafikleri ile değerlendirildi. Sayısal değişkenler için gruplar arası karşılaştırmalar verilerin normal dağılması durumunda genel doğrusal modeller aracılığı ile yapıldı. Verilerin normal dağılmaması durumunda Kruskal-Wallis ve Friedman analizleri kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalar değişkenin özelliğine göre Bonferroni, Tukey HSD, Student-Newman-Keuls, Fisher LSD ve Dunn-Bonferroni testleri ile yapıldı. Sayısal değişkenler arasındaki ilişki Pearson ve Spearman korelasyon analizi, kategorik değişkenler arasındaki ilişki kıkare analizi ile değerlendirildi. Tüm karşılaştırmalarda hipotezler iki yönlü olacak ve $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecektir.

TUNEL verileri immunoreaktivite şiddetleri hafif (+), orta (++) , şiddetli (+++) ve çok şiddetli (++++) olarak skorlanacak Boyanan hücrelerin yüzdesi ve boyanma şiddetleri skorlanıp, gruplar arasında karşılaştırmalı olarak ANOVA istatistik testleri ile değerlendirilecektir.

4.1. Etkin Doxorubicin dozunun belirlenmesi

SKOV-3 ovaryum kanseri hücre hattı üzerine DOXin etkisi ve etkin dozun belirlenebilmesi için bir adet kontrol ve 10 farklı dozda uygulama yapıldı. Farklı dozların hücre proliferasyonuna etkilerinin morfolojik olarak görülmesi için invert mikroskop görüntüleri alındı. Hücrelerin yoğunluklarının gözlenebilmesi için flaskın genel görüntülerini veren 4x görüntüler tercih edildi.



Şekil 9: SKOV-3 hücrelerine farklı DOX dozlarının etkisini gösteren invert mikroskop görüntüleri 4x.

4.1.1. Doxorubicinin SKOV-3 hücre hattı üzerine sitotoksik etkilerinin MTT yöntemiyle belirlenmesi

SKOV-3 hücreleri üzerine DOXin toksik etkileri bilinmektedir. Ancak çalışma şartlarımıza göre IC⁵⁰ etken değerin belirlenmesi amaçlandı ve MTT yöntemi ile 24, 48, 72 ve satte etkileri araştırıldı. MTT test sonucunda veriler değerlendirilerek hücre proliferasyonunu baskılayıcı konsantrasyon olan IC⁵⁰ değeri tespit edildi.

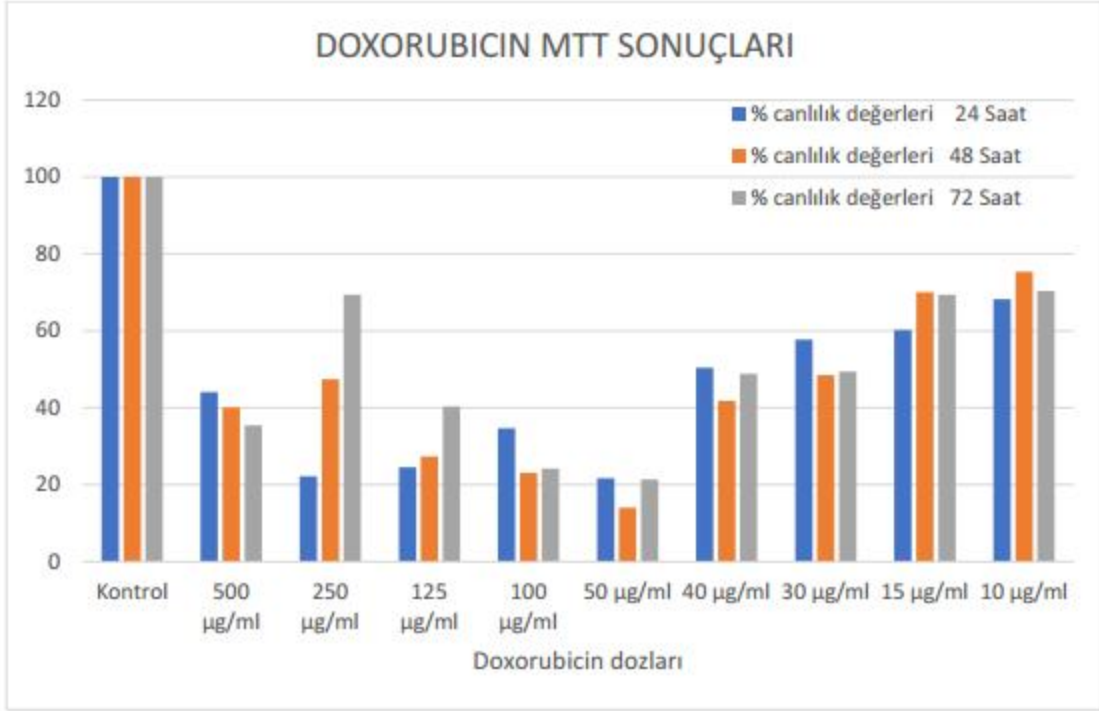
Elde edilen veriler ışığında etken dozun 24 satte kontrole oranla canlılığı yarı yarıya indiren 40 µg/ml doz 24 saatlik uygulama ve 30 µg/ml doz 48 ve 72 saatlik uygulamada tespit edildi. IC⁵⁰ değeri 40 µg/ml olarak kabul edildi. İnvitro yara iyileşme ve TUNEL testlerinde 40 µg/ml doz kullanıldı.

DOX uygulanmasında tüm saat aralıklarında ve dozlarda hücre ölümünün başladığı tespit edildi. Uygulama süresi arttıkça hücre ölümü artsada 72 saat gruplarında düşük dozlarda tekrar proliferasyonun başladığı tespit edildi. Hücrelerin uygulama süresi arttıkça direnç gösterebildikleri düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında en ideal süre ve doz 24 saat - 40 µg/ml doz olarak belirlenmiştir.

Tablo 2: 24, 48, 72 saat DOX uygulaması sonrası % hücre canlılığı ve IC⁵⁰ değeri.

DOX konsantrasyonları	% canlılık değerleri 24 Saat	% canlılık değerleri 48 Saat	% canlılık değerleri 72 Saat
Kontrol	100	100	100,00
500 µg/ml	44,05333	40,05333	35,40741
250 µg/ml	22,18667	47,3813	69,35802
125 µg/ml	24,52	27,366618	40,34568
100 µg/ml	34,65333	23,1033	24,17284
50 µg/ml	21,72	14,048	21,3827
40 µg/ml	*50,38667	41,8375	48,8025
30 µg/ml	57,74667	48,4875	49,3827
15 µg/ml	60,25333	70,0861	69,358

10 µg/ml	68,254	75,3659	70,3569
-----------------	--------	---------	---------



Şekil 10: SKOV-3 hücresi için farklı konsantrasyon ve saatlerdeki DOX uygulamasının MTT sonuç grafiği.

Tablo 3: DOX farklı dozlarının 24 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması ($p > 0,05$).

24 Saat için			
DOX Konsantrasyonları (µg/ml)	% Canlılık Değerleri	İstatistiksel Analiz (One-Simple t Test)	
	Ortalama Standart Sapma	t	p
500 µg/ml	44,05333±1,178	76,205	0,000
250 µg/ml	22,18667±2,622	37,933	0,001
125 µg/ml	24,52±2,173	40,101	0,001
100 µg/ml	34,65333±1,249	55,543	0,000
50 µg/ml	21,72±2,129	33,971	0,001
40 µg/ml	50,38667±0,844	84,740	0,000
30 µg/ml	57,74667±1,456	91,057	0,000
15 µg/ml	60,25333±2,322	102,974	0,000
10 µg/ml	68,254±1,489	116,678	0,000

Tablo 4: DOX farklı dozlarının 48 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması (p>0,05).

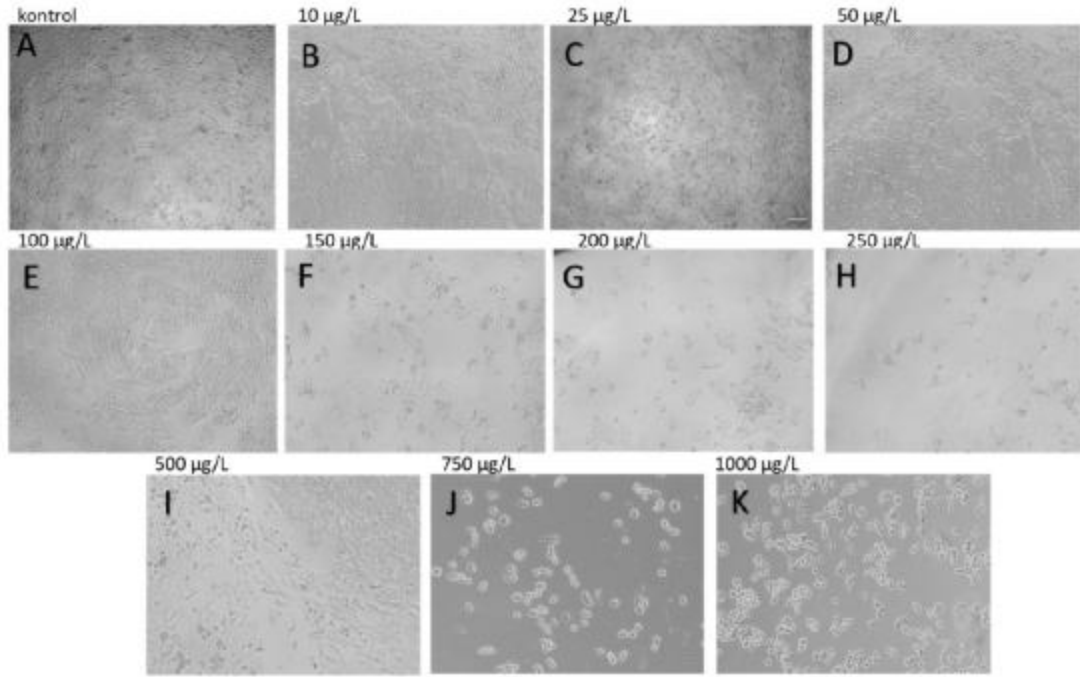
48 Saat için			
DOX Konsantrasyonları (µg/ml)	% Canlılık Değerleri	İstatistiksel Analiz (One-Simple t Test)	
	Ortalama Standart Sapma	t	p
500 µg/ml	40,05333±1,127	69,280	0,000
250 µg/ml	47,3813±1,122	79,718	0,000
125 µg/ml	27,366618±2,344	45,959	0,000
100 µg/ml	23,1033±0,160	39,826	0,001
50 µg/ml	14,048±1,278	24,267	0,002
40 µg/ml	41,8375±1,279	64,368	0,000
30 µg/ml	48,4875±1,120	80,300	0,000
15 µg/ml	70,0861±1,165	121,144	0,000
10 µg/ml	75,3659±0,987	127,305	0,000

Tablo 5: DOX farklı dozlarının 72 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması (p>0,05).

72 Saat için			
DOX Konsantrasyonları (µg/ml)	% Canlılık Değerleri	İstatistiksel Analiz (One-Simple t Test)	
	Ortalama Standart Sapma	t	p
500 µg/ml	35,40741±1,135	59,240	0,000
250 µg/ml	69,35802±1,193	117,240	0,000
125 µg/ml	40,34568±1,152	68,138	0,000
100 µg/ml	24,17284±0,576	41,263	0,001
50 µg/ml	21,3827±1,276	35,732	0,001
40 µg/ml	48,8025±2,675	75,855	0,000
30 µg/ml	49,3827±1,276	83,087	0,000
15 µg/ml	69,358±1,193	11,240	0,000
10 µg/ml	70,3569±1,196	118,951	0,000

4.2. Etkin Resveratrol Dozunun belirlenmesi

SKOV-3 ovaryum kanseri hücre hattı üzerine RESün etkisi ve etkin dozun belirlenebilmesi için bir adet kontrol ve 10 farklı dozda uygulama yapıldı. Farklı dozların hücre proliferasyonuna etkilerinin morfolojik olarak görülmesi için invert mikroskop görüntüleri alındı.



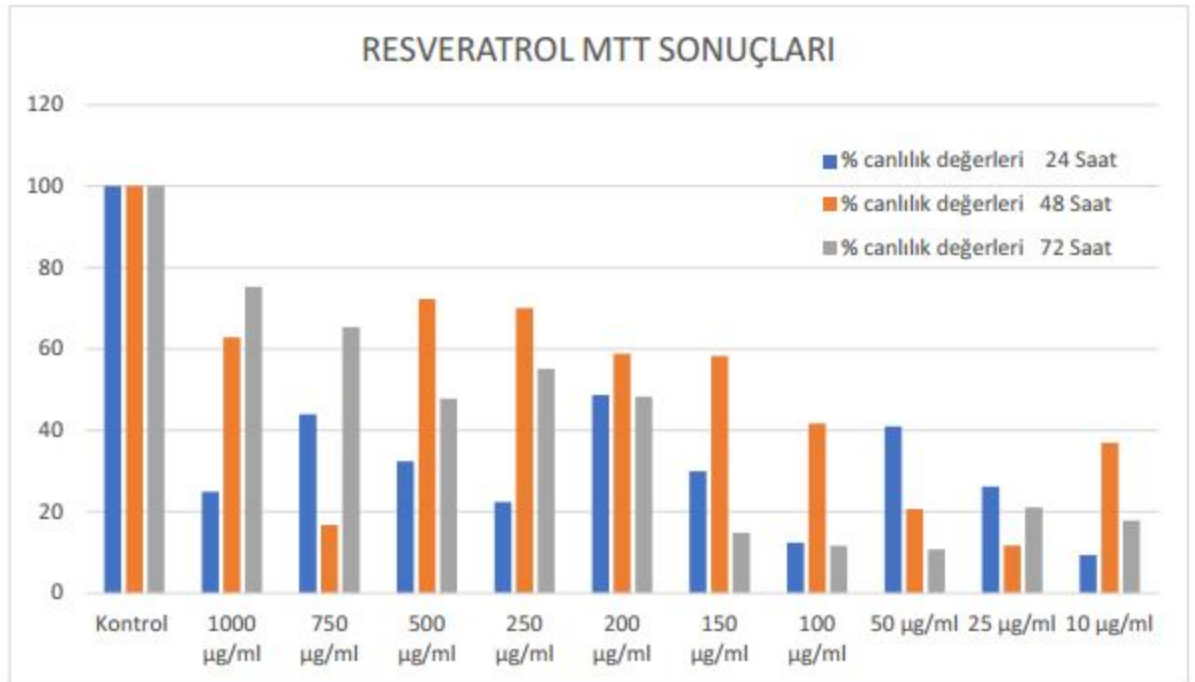
Şekil 11: SKOV-3 hücrelerine farklı Resveratrol dozlarının etkisini gösteren invert mikroskop görüntüleri 4x.

Elde edilen veriler ışığında etken dozun 24 saatte kontrole oranla canlılığı yarı yarıya indiren 200 µg/ml doz 24 saatlik uygulama ve yine 50 µg/ml doz 48 ve 72 saatlik uygulamada tespit edildi. IC^{50} değeri 50 µg/ml olarak kabul edildi. İn vitro yara iyileşme ve TUNEL testlerinde 200 µg/ml doz kullanıldı.

RES uygulanmasında tüm saat aralıklarında düşük dozlarda hücre ölümünün başladığı tespit edildi. Uygulama süresi arttıkça hücre ölümü artsa da 72 saat gruplarında düşük dozlarda tekrar proliferasyonun başladığı tespit edildi. Hücrelerin uygulama süresi ve RES dozu arttıkça direnç gösterebildikleri düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında en ideal süre ve doz 24 saat – 50 µg/ml doz olarak belirlenmiştir.

Tablo 6: 24, 48, 72 saat RES uygulaması sonrası % hücre canlılığı ve IC⁵⁰ değeri.

RES Konsantrasyonları	% canlılık değerleri 24 Saat	% canlılık değerleri 48 Saat	% canlılık değerleri 72 Saat
Kontrol	100	100	100,00
1000 µg/ml	24,84009	62,81494	75,2648
750 µg/ml	43,89659	16,68983	65,3267
500 µg/ml	32,3694	72,285	47,8105
250 µg/ml	22,37473	70,082	55,1319
200 µg/ml	*48,63006	58,8184	*48,256
150 µg/ml	29,90405	58,2103	14,77663
100 µg/ml	12,38006	41,616	11,544827
50 µg/ml	40,96482	20,5908	10,715983
25 µg/ml	26,10608	11,69331	21,0112
10 µg/ml	9,315032	36,92441	17,80633



Şekil 12: SKOV-3 hücresi için farklı konsantrasyon ve saatlerdeki RES uygulamasının MTT sonuç grafiği.

Tablo 7: RES farklı dozlarının 24 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması ($p>0,05$).

24 Saat için			
RES Konsantrasyonları ($\mu\text{g/ml}$)	% Canlılık Değerleri	İstatistiksel Analiz (One-Simple t Test)	
	Ortalama Standart Sapma	t	p
1000 $\mu\text{g/ml}$	24,84009 \pm 2,813	37,838	0,001
750 $\mu\text{g/ml}$	43,89659 \pm 2,989	66,602	0,000
500 $\mu\text{g/ml}$	32,3694 \pm 1,231	54,415	0,000
250 $\mu\text{g/ml}$	22,37473 \pm 1,249	37,455	0,001
200 $\mu\text{g/ml}$	48,63006 \pm 2,112	78,472	0,000
150 $\mu\text{g/ml}$	29,90405 \pm 3,014	44,991	0,000
100 $\mu\text{g/ml}$	12,38006 \pm 1,267	20,516	0,002
50 $\mu\text{g/ml}$	40,96482 \pm 3,216	61,012	0,000
25 $\mu\text{g/ml}$	26,10608 \pm 0,354	45,010	0,000
10 $\mu\text{g/ml}$	9,315032 \pm 1,050	15,516	0,004

Tablo 8: RES farklı dozlarının 48 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması ($p>0,05$).

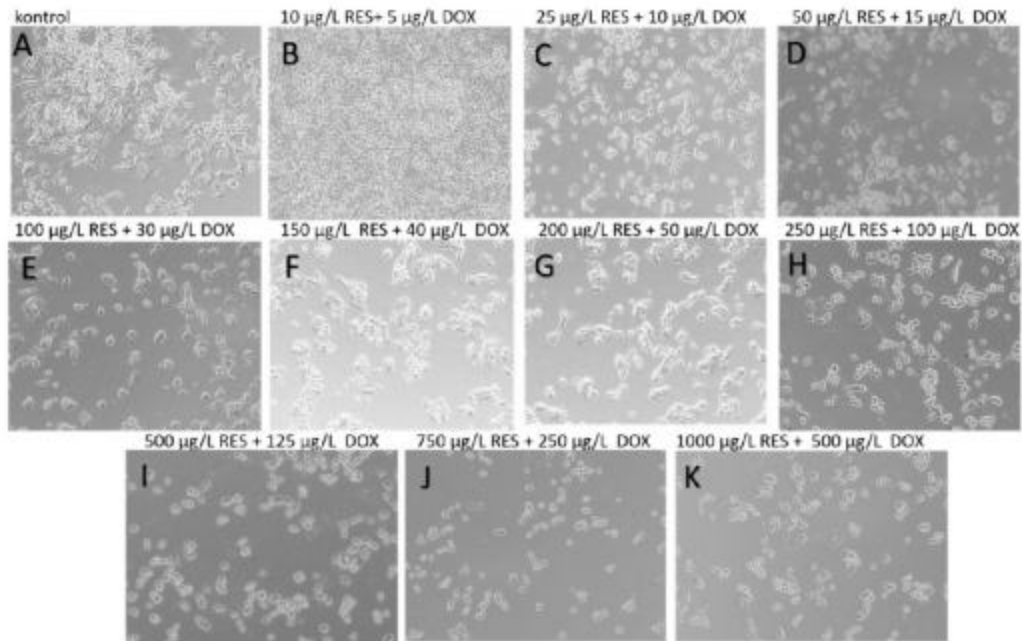
48 Saat için			
RES Konsantrasyonları ($\mu\text{g/ml}$)	% Canlılık Değerleri	İstatistiksel Analiz (One-Simple t Test)	
	Ortalama Standart Sapma	t	p
1000 $\mu\text{g/ml}$	62,81494 \pm 0,526	97,595	0,000
750 $\mu\text{g/ml}$	16,68983 \pm 2,229	26,116	0,001
500 $\mu\text{g/ml}$	72,285 \pm 0,950	123,215	0,000
250 $\mu\text{g/ml}$	70,082 \pm 2,730	121,155	0,000
200 $\mu\text{g/ml}$	58,8184 \pm 2,728	91,257	0,000
150 $\mu\text{g/ml}$	58,2103 \pm 1,701	99,847	0,000
100 $\mu\text{g/ml}$	41,616 \pm 2,053	67,244	0,000
50 $\mu\text{g/ml}$	20,5908 \pm 1,969	33,109	0,001
25 $\mu\text{g/ml}$	11,69331 \pm 2,311	18,060	0,003
10 $\mu\text{g/ml}$	36,92441 \pm 3,081	55,480	0,000

Tablo 9: RES farklı dozlarının 72 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması ($p>0,05$).

72 Saat için				
RES Konsantrasyonları ($\mu\text{g/ml}$)	% Canlılık Değerleri		İstatistiksel Analiz (One-Simple t Test)	
	Ortalama	Standart Sapma	t	p
1000 $\mu\text{g/ml}$	75,2648	$\pm 0,883$	128,563	0,000
750 $\mu\text{g/ml}$	65,3267	$\pm 1,089$	110,818	0,000
500 $\mu\text{g/ml}$	47,8105	$\pm 2,702$	74,157	0,000
250 $\mu\text{g/ml}$	55,1319	$\pm 0,853$	95,064	0,000
200 $\mu\text{g/ml}$	48,256	$\pm 2,589$	82,391	0,000
150 $\mu\text{g/ml}$	14,77663	$\pm 1,816$	22,535	0,002
100 $\mu\text{g/ml}$	11,544827	$\pm 2,387$	18,475	0,003
50 $\mu\text{g/ml}$	10,715983	$\pm 0,372$	16,389	0,004
25 $\mu\text{g/ml}$	21,0112	$\pm 2,688$	34,454	0,001
10 $\mu\text{g/ml}$	17,80633	$\pm 1,305$	27,116	0,001

4.3. Etkin Doxorubicin + Resveratrol kombine dozunun belirlenmesi

SKOV-3 ovaryum kanseri hücre hattı üzerine DOX ve RESün kombine uygulandıklarındaki etkisi ve etkin dozların belirlenebilmesi için bir adet kontrol ve 10 farklı dozda uygulama yapıldı. Farklı dozların hücre proliferasyonuna etkilerinin morfolojik olarak görülmesi için invert mikroskop görüntüleri alındı.

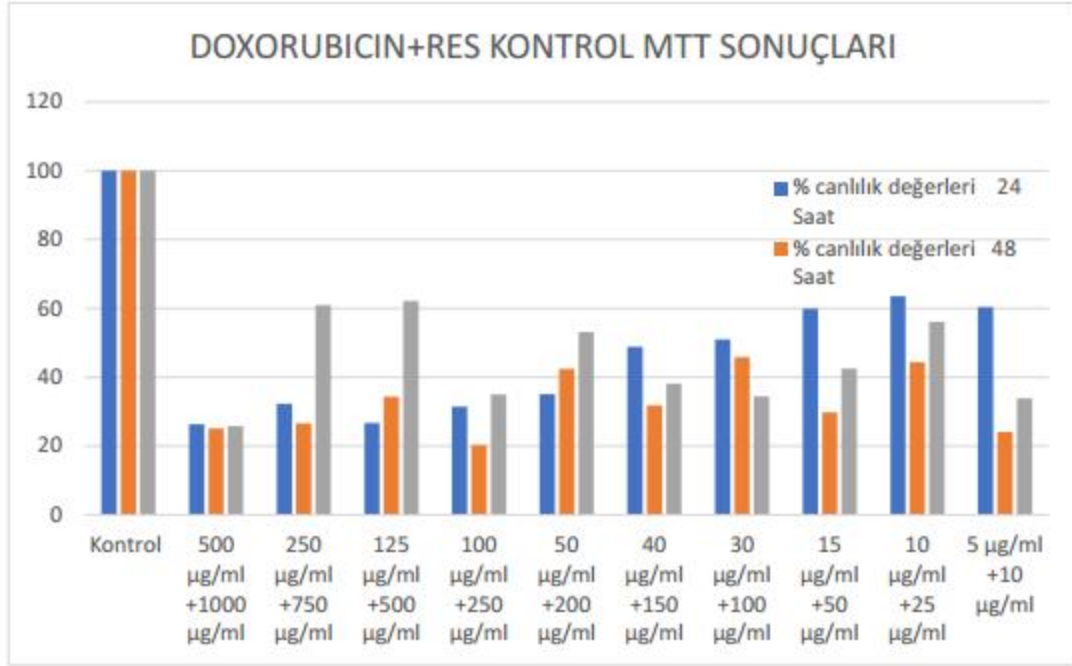


Şekil 13: SKOV-3 hücrelerine farklı DOX + RES dozlarının etkisini gösteren invert mikroskop görüntüleri 4x.

Yüzde canlılık değerleri incelendiğinde etkin dozun 30 µg/ml DOX +100 µg/ml RES kombine uygulamasında olduğu görülmüştür. 50 µg/ml DOX +250 µg/ml RES 72 saatlik uygulamada IC⁵⁰ değerine ulaşmıştır. 24 saatlik 30 µg/ml DOX +100 µg/ml RES kombine uygulaması düşük doz ve erken sonuç verdiği için bu değer esas alınarak yara iyileşme ve TUNEL deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Tablo 10: 24, 48, 72 saat DOX + RES kombine uygulaması sonrası % hücre canlılığı ve IC⁵⁰ değeri.

DOX+RES Konsantrasyonları	% canlılık değerleri 24 Saat	% canlılık değerleri 48 Saat	% canlılık değerleri 72 Saat
Kontrol	100	100	100,00
500 µg/ml +1000 µg/ml	26,23934	25,1086	25,68034
250 µg/ml +750 µg/ml	32,23614	26,55864	60,9062
125 µg/ml +500 µg/ml	26,649787	34,2676	62,06258
100 µg/ml +250 µg/ml	31,43657	20,2198	34,93576
50 µg/ml +200 µg/ml	35,03465	42,4144	53,0598
40 µg/ml +150 µg/ml	48,83849	31,734	38,1406
30 µg/ml +100 µg/ml	*50,96429	45,8	34,4108
15 µg/ml +50 µg/ml	59,84168	29,761	42,4465
10 µg/ml +25 µg/ml	63,50267	44,2919	56,0989
5 µg/ml +10 µg/ml	60,381663	24,04257	33,8583



Şekil 14: SKOV-3 hücrelerine farklı DOX + RES dozlarının etkisini gösteren MTT grafiği.

Tablo 11: DOX+ RES farklı dozlarının 24 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması (p>0,05).

24 Saat için			
DOX+RES Konsantrasyonları (µg/ml)	% Canlılık Değerleri	İstatistiksel Analiz (One-Simple t Test)	
		Ortalama Standart Sapma	t
500 µg/ml	26,23934±0,798	44,746	0,000
250 µg/ml	32,23614±1,865	55,053	0,000
125 µg/ml	26,649787±2,166	42,515	0,001
100 µg/ml	31,43657±1,455	52,31	0,000
50 µg/ml	35,03465±0,116	60,63	0,000
40 µg/ml	48,83849±2,795	75,267	0,000
30 µg/ml	50,96429±3,214	76,153	0,000
15 µg/ml	59,84168±1,676	92,35	0,000
10 µg/ml	63,50267±1,272	105,074	0,000
5 µg/ml	60,381663±0,186	101,704	0,000

Tablo 12: DOX+ RES farklı dozlarının 48 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması (p>0,05).

48 Saat için			
RES Konsantrasyonları (µg/ml)	% Canlılık Değerleri	İstatistiksel Analiz (One-Simple t Test)	
	Ortalama Standart Sapma	t	p
500 µg/ml	25,1086±0,362	39,470	0,001
250 µg/ml	26,55864±1,862	43,166	0,001
125 µg/ml	34,2676±0,892	58,352	0,000
100 µg/ml	20,2198±0,733	34,491	0,001
50 µg/ml	42,4144±1,381	70,982	0,000
40 µg/ml	31,734±2,667	49,828	0,000
30 µg/ml	45,8±2,537	71,179	0,000
15 µg/ml	29,761±0,973	46,389	0,000
10 µg/ml	44,2919±0,243	75,317	0,000
5 µg/ml	24,04257±2,482	41,581	0,001

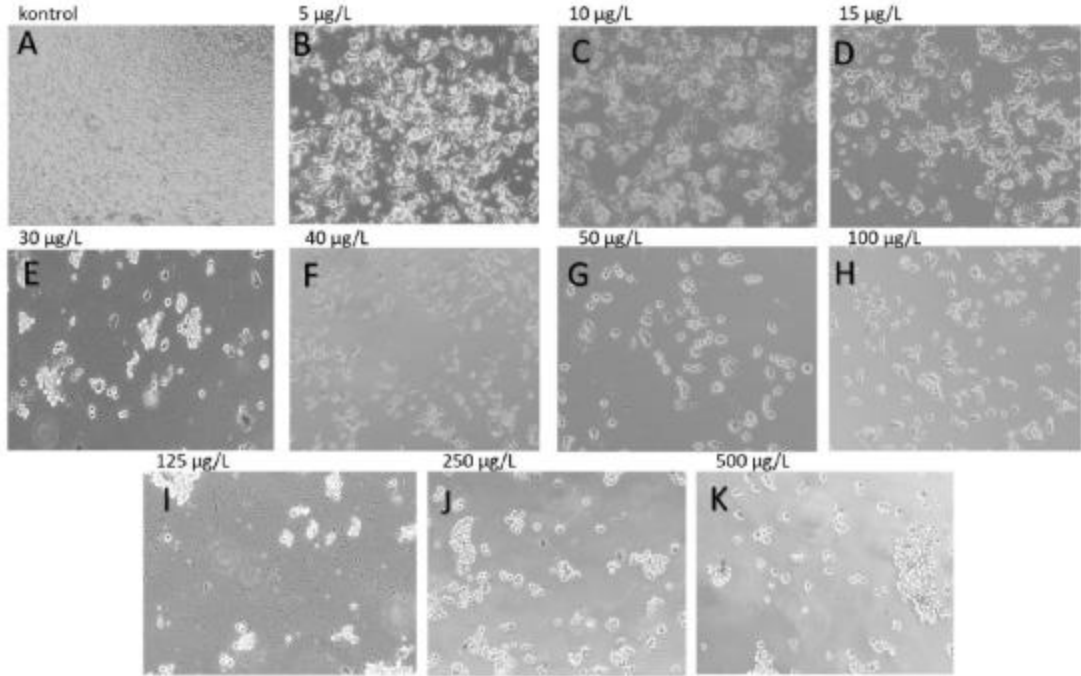
Tablo 13 : DOX+ RES farklı dozlarının 72 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması (p>0,05).

72 Saat için			
RES Konsantrasyonları (µg/ml)	% Canlılık Değerleri	İstatistiksel Analiz (One-Simple t Test)	
	Ortalama Standart Sapma	t	p
500 µg/ml	25,68034±2,268	40,669	0,001
250 µg/ml	60,9062±3,021	92,545	0,000
125 µg/ml	62,06258±0,209	107,353	0,000
100 µg/ml	34,93576±3,119	52,287	0,000
50 µg/ml	53,0598±0,199	91,779	0,000
40 µg/ml	38,1406±1,139	65,683	0,000
30 µg/ml	34,4108±1,368	57,531	0,000
15 µg/ml	42,4465±",488	70,693	0,000
10 µg/ml	56,0989±0,330	96,894	0,000
5 µg/ml	33,8583±2,861	51,658	0,000

4.4. Elektromanyetik alan uygulaması yapılan flaskta etkin Doxorubicin dozunun belirlenmesi

SKOV-3 ovaryum kanseri hücre hattı üzerine düşük darbeli elektromanyetik alan ile uygulanan DOXin etkisi ve etkin dozun belirlenebilmesi için bir adet kontrol ve 10 farklı dozda uygulama yapıldı. Farklı dozların hücre proliferasyonuna etkilerinin morfolojik olarak görülmesi için invert mikroskop görüntüleri alındı. Hücrelerin

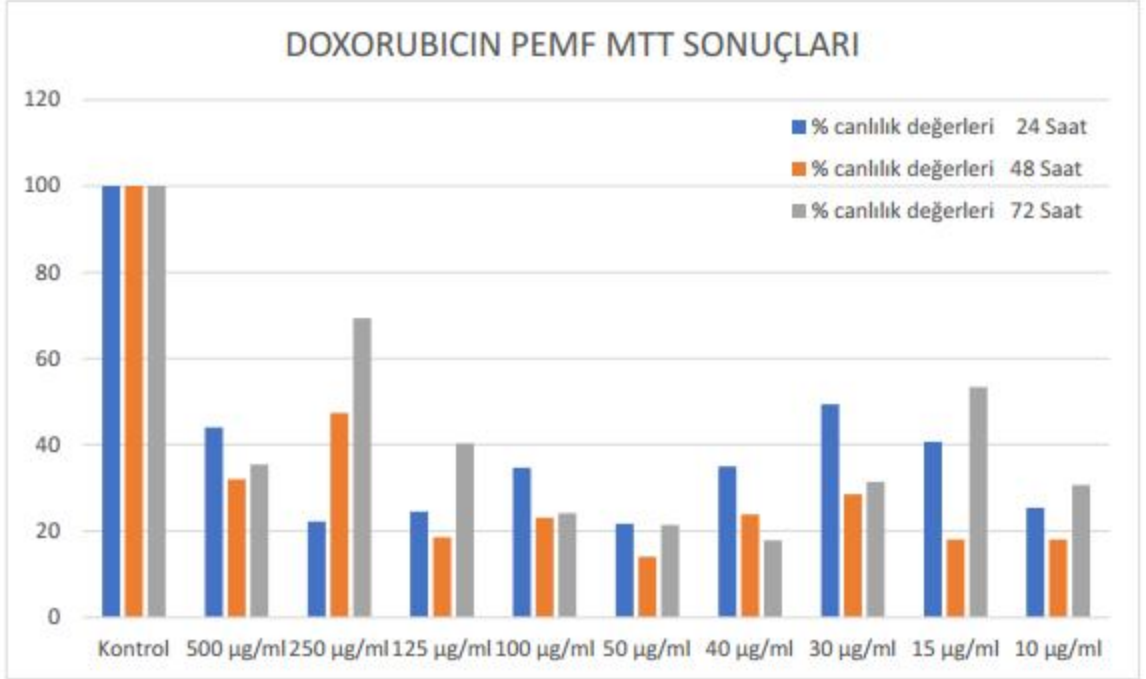
yoğunluklarının gözlenebilmesi için flaskın genel görüntülerini veren 4x görüntüler tercih edildi.



Şekil 15: SKOV-3 hücrelerine farklı DOX dozlarının ve elektromanyetik alanın etkisini gösteren invert mikroskop görüntüleri 4x.

Tablo 14: 24, 48, 72 saat DOX + elektromanyetik alan kombine uygulaması sonrası % hücre canlılığı ve IC⁵⁰ değeri.

DOX + PEMF Konsantrasyonları	% canlılık değerleri 24 Saat	% canlılık değerleri 48 Saat	% canlılık değerleri 72 Saat
Kontrol	100	100	100,00
500 µg/ml	44,05333	32	35,40741
250 µg/ml	22,18667	47,3813	69,35802
125 µg/ml	24,52	18,56	40,34568
100 µg/ml	34,65333	23,1033	24,17284
50 µg/ml	21,72	14,048	21,3827
40 µg/ml	35	23,8375	17,8025
30 µg/ml	*49,368	28,4875	31,3827
15 µg/ml	40,695	18,0861	53,358
10 µg/ml	25,38667	18,0861	30,642



Şekil 16: SKOV-3 hücrelerine farklı DOX + dozlarının elektromanyetik alan ile kombine uygulanmasının etkisini gösteren MTT grafiği.

Tablo 15: Elektro manyetik alan uygulanan DOX farklı dozlarının 24 saat sonrasında ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması ($p > 0,05$).

24 Saat için			
DOX + PEMF Konsantrasyonları (µg/ml)	% Canlılık Değerleri	İstatistiksel Analiz (One-Simple t Test)	
	Ortalama Standart Sapma	t	p
500 µg/ml	44,05333±0,178	76,205	0,000
250 µg/ml	22,18667±0,622	37,993	0,001
125 µg/ml	24,52±1,733	40,101	0,001
100 µg/ml	34,65333±2,178	55,453	0,000
50 µg/ml	21,72±2,459	33,971	0,001
40 µg/ml	35±0,232	60,622	0,000
30 µg/ml	49,368±1,227	83,225	0,000
15 µg/ml	40,695±1,289	64,671	0,000
10 µg/ml	25,38667±2,317	42,479	0,001

Tablo 16: Elektro manyetik alan uygulanan DOX farklı dozlarının 48 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması (p>0,05).

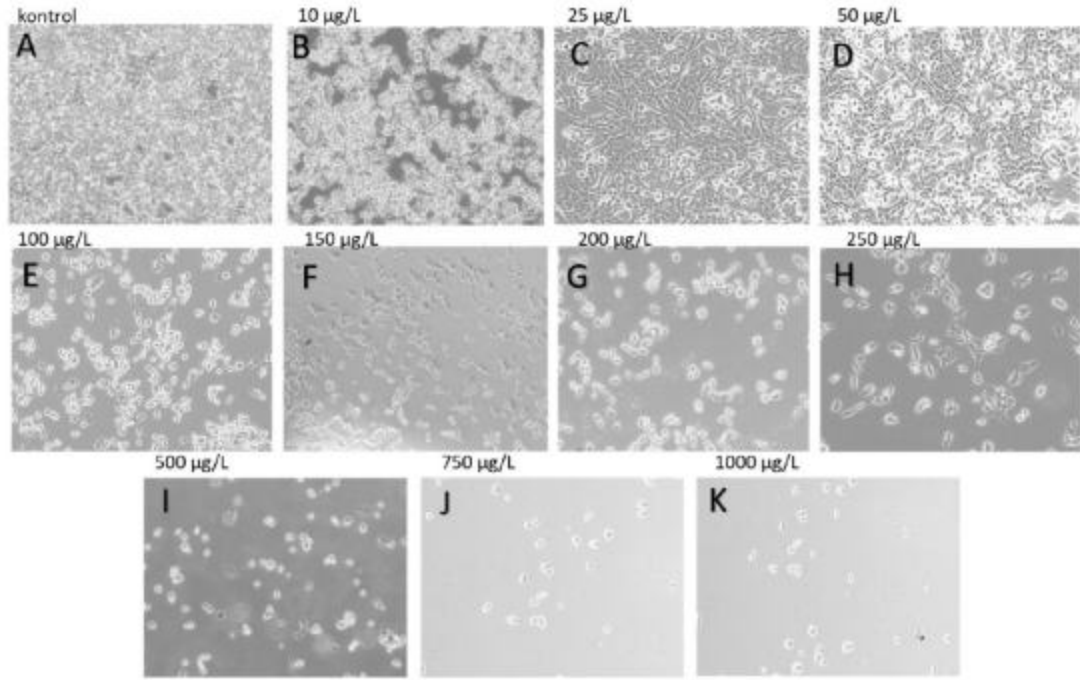
48 Saat için				
DOX + PEMF Konsantrasyonları (µg/ml)	% Canlılık Değerleri		İstatistiksel Analiz (One-Simple t Test)	
	Ortalama Standart Sapma	t	p	
500 µg/ml	32±0,132	55,426	0,000	
250 µg/ml	47,3813±1,271	79,718	0,000	
125 µg/ml	18,56±1,867	29,973	0,001	
100 µg/ml	23,1033±0,244	39,826	0,001	
50 µg/ml	14,048±0,160	24,267	0,002	
40 µg/ml	23,8375±2,792	36,300	0,001	
30 µg/ml	28,4875±1,625	46,954	0,000	
15 µg/ml	18,0861±0,872	31,188	0,001	
10 µg/ml	18,0861±0,145	31,188	0,001	

Tablo 17: Elektro manyetik alan uygulanan DOX farklı dozlarının 72 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması (p>0,05).

72 Saat için				
DOX + PEMF Konsantrasyonları (µg/ml)	% Canlılık Değerleri		İstatistiksel Analiz (One-Simple t Test)	
	Ortalama Standart Sapma	t	p	
500 µg/ml	35,40741±1,358	59,24	0,000	
250 µg/ml	69,35802±1,193	117,24	0,000	
125 µg/ml	40,34568±1,152	68,138	0,000	
100 µg/ml	24,17284±0,576	41,463	0,001	
50 µg/ml	21,3827±1,276	35,732	0,001	
40 µg/ml	17,8025±2,675	27,137	0,001	
30 µg/ml	31,3827±1,276	52,645	0,000	
15 µg/ml	53,358±1,193	90,101	0,000	
10 µg/ml	30,6422,140	49,07	0,000	

4.5. Elektromanyetik alan uygulaması yapılan flaskta etken RES dozunun belirlenmesi

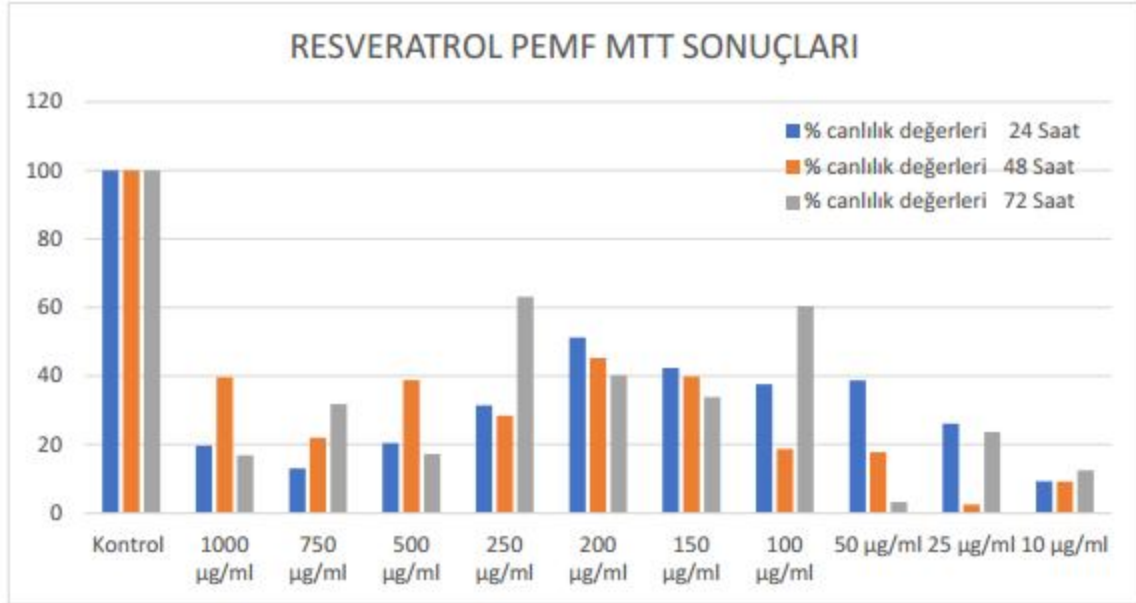
SKOV-3 ovaryum kanseri hücre hattı üzerine düşük darbeli elektromanyetik alan ile uygulanan DOXin etkisi ve etkin dozun belirlenebilmesi için bir adet kontrol ve 10 farklı dozda uygulama yapıldı. Farklı dozların hücre proliferasyonuna etkilerinin morfolojik olarak görülmesi için invert mikroskop görüntüleri alındı. Hücrelerin yoğunluklarının gözlenebilmesi için flaskın genel görüntülerini veren 4x görüntüler tercih edildi.



Şekil 17: SKOV-3 hücrelerine farklı RES dozlarının ve elektromanyetik alanın etkisini gösteren invert mikroskop görüntüleri 4x.

Tablo 18: 24, 48, 72 saat RES + elektromanyetik alan kombine uygulaması sonrası % hücre canlılığı ve IC⁵⁰ değeri.

RES Konsantrasyonları	Pemf	% canlılık değerleri 24 Saat	% canlılık değerleri 48 Saat	% canlılık değerleri 72 Saat
Kontrol		100	100	100,00
1000 µg/ml		19,64286	39,67205	16,7982
750 µg/ml		12,9748	22,0016	31,7915
500 µg/ml		20,368	38,7665	17,1682
250 µg/ml		31,379	28,3769	63,12284
200 µg/ml		*51,256	45,212	40,212
150 µg/ml		42,3113	39,79295	33,83325
100 µg/ml		37,56663	18,74694	60,3355
50 µg/ml		38,69936	17,76799	3,23138
25 µg/ml		26,10608	2,471855	23,705
10 µg/ml		9,315032	9,202154	12,452



Şekil 18: SKOV-3 hücrelerine farklı DOX + dozlarının elektromanyetik alan ile kombine uygulanmasının etkisini gösteren MTT grafiği.

Tablo 19: Elektro manyetik alan uygulanan RES farklı dozlarının 24 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması ($p>0,05$).

24 Saat için				
RES Konsantrasyonları (µg/ml)	Pempf	% Canlılık Değerleri	İstatistiksel Analiz (One-Simple t Test)	
			Ortalama Standart Sapma	t
1000 µg/ml		19,64286±2,143	31,2	0,001
750 µg/ml		12,9748±3,249	18,603	0,003
500 µg/ml		20,368±1,228	34,092	0,001
250 µg/ml		31,379±1,228	43,683	0,001
200 µg/ml		51,256±1,123	16,473	0,004
150 µg/ml		42,3113±1,889	71,776	0,000
100 µg/ml		37,56663±2,331	61,22	0,000
50 µg/ml		38,69936±0,342	61,405	0,000
25 µg/ml		26,10608±1,053	41,161	0,001
10 µg/ml		9,315032±1,750	15,516	0,004

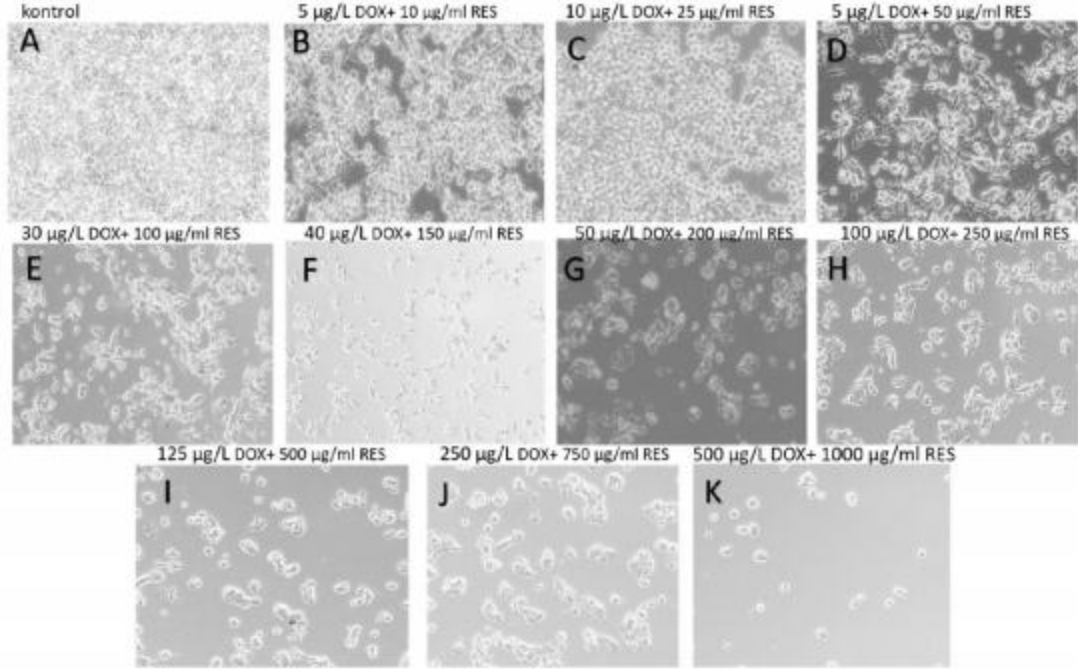
Tablo 20: Elektro manyetik alan uygulanan RES farklı dozlarının 48 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması (p>0,05).

48 Saat için				
RES Konsantrasyonları (µg/ml)	Pemf	% Canlılık Değerleri	İstatistiksel Analiz (One-Simple t Test)	
			Ortalama Standart Sapma	t
1000 µg/ml		39,67205±2,240	63,337	0,000
750 µg/ml		22,0016±1,256	38,106	0,001
500 µg/ml		38,7665±0,788	60,592	0,000
250 µg/ml		28,3769±2,654	47,601	0,000
200 µg/ml		45,212±2,490	77,486	0,000
150 µg/ml		39,79295±2,573	61,836	0,000
100 µg/ml		18,74694±1,573	29,024	0,001
50 µg/ml		17,76799±1,576	27,323	0,001
25 µg/ml		2,471855±0,674	7,046	0,020
10 µg/ml		9,202154±2,871	15,599	0,004

Tablo 21: Elektro manyetik alan uygulanan RES farklı dozlarının 72 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması (p>0,05).

72 Saat için				
RES Konsantrasyonları (µg/ml)	Pemf	% Canlılık Değerleri	İstatistiksel Analiz (One-Simple t Test)	
			Ortalama Standart Sapma	t
1000 µg/ml		16,7982±2,651	25,587	0,002
750 µg/ml		31,7915±2,638	49,252	0,000
500 µg/ml		17,1682±0,561	29,404	0,001
250 µg/ml		63,12284±0,409	108,917	0,000
200 µg/ml		40,212±0,707	68,89	0,000
150 µg/ml		33,83325±2,778	51,941	0,000
100 µg/ml		60,3355±1,118	102,217	0,000
50 µg/ml		3,23138±0,771	7,963	0,015
25 µg/ml		23,705±2,350	19,718	0,003
10 µg/ml		12,452±1,507	20,364	0,002

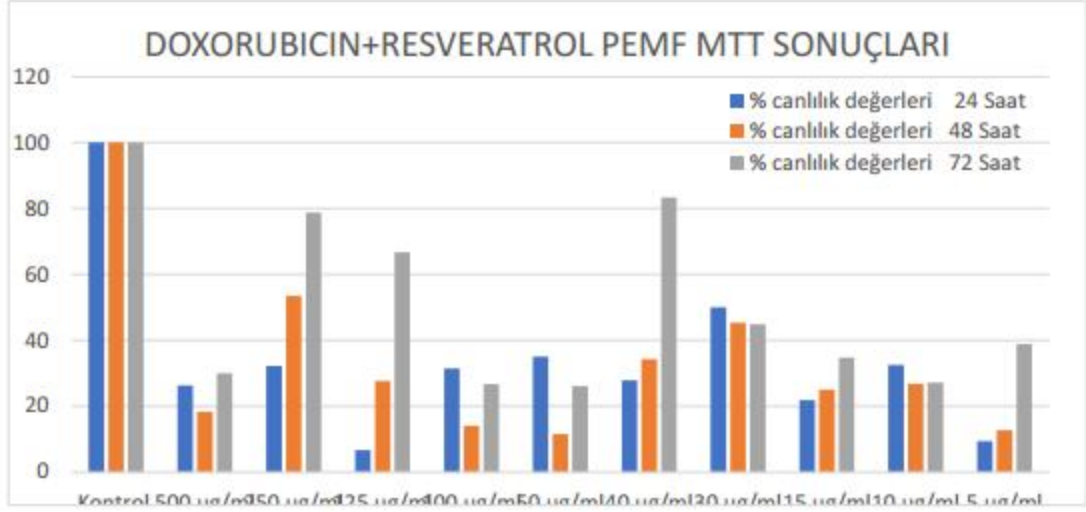
4.6. Elektromanyetik alan uygulaması yapılan flaskta etken DOX + RES kombine dozunun belirlenmesi



Şekil 19: SKOV-3 hücrelerine farklı Docorubicin + RES dozlarının ve elektromanyetik alanın etkisini gösteren invert mikroskop görüntüleri 4x.

Tablo 22: 24, 48, 72 saat DOX + RES + elektromanyetik alan kombine uygulaması sonrası % hücre canlılığı ve IC⁵⁰ değeri.

DOX+RES Konsantrasyonları +PEMF		% canlılık değerleri 24 Saat	% canlılık değerleri 48 Saat	% canlılık değerleri 72 Saat
Kontrol		100	100	100,00
500 µg/ml	1000 µg/ml	26,23934	18,25746	29,94573
250 µg/ml	750 µg/ml	32,23614	53,49976	78,78638
125 µg/ml	500 µg/ml	6,649787	27,67988	66,69956
100 µg/ml	250 µg/ml	31,43657	14,048	26,61569
50 µg/ml	200 µg/ml	35,03465	11,4782	26,12235
40 µg/ml	150 µg/ml	27,83849	34,25844	83,34978
30 µg/ml	100 µg/ml	49,96429	45,3691	44,7953
15 µg/ml	50 µg/ml	21,84168	24,99266	34,7015
10 µg/ml	25 µg/ml	32,50267	26,7744	27,1584
5 µg/ml	10 µg/ml	9,381663	12,66765	38,8555



Şekil 20: SKOV-3 hücrelerine farklı DOX + RES dozlarının elektromanyetik alan ile kombine uygulanmasının etkisini gösteren MTT grafiği.

Tablo 23: Elektro manyetik alan uygulanan DOX + RES farklı dozlarının 24 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması ($p>0,05$).

24 Saat için		% Canlılık Değerleri	İstatistiksel Analiz (One-Simple t Test)	
DOX+RES Konsantrasyonları +PEMF (µg/ml)	Ortalama Standart Sapma		t	p
500 µg/ml	1000 µg/ml	26,23934±0,765	44,746	0,000
250 µg/ml	750 µg/ml	32,23614±0,787	55,053	0,000
125 µg/ml	500 µg/ml	6,649787±2,166	10,081	0,010
100 µg/ml	250 µg/ml	31,43657±1,458	52,31	0,000
50 µg/ml	200 µg/ml	35,03465±0,116	60,63	0,000
40 µg/ml	150 µg/ml	27,83849±2,795	42,528	0,001
30 µg/ml	100 µg/ml	49,96429±2,134	74,639	0,000
15 µg/ml	50 µg/ml	21,84168±2,890	33,152	0,001
10 µg/ml	25 µg/ml	32,50267±1,676	53,508	0,000
5 µg/ml	10 µg/ml	9,381663±1,272	15,438	0,004

Tablo 24: Elektro manyetik alan uygulanan DOX + RES farklı dozlarının 48 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması (p>0,05).

48 Saat için					
DOX+RES Konsantrasyonları +PEMF (µg/ml)		% Canlılık Değerleri		İstatistiksel Analiz (One-Simple t Test)	
		Ortalama	Standart Sapma	t	p
500 µg/ml	1000 µg/ml	18,25746±0,858		30,985	0,001
250 µg/ml	750 µg/ml	53,49976±1,666		88,478	0,000
125 µg/ml	500 µg/ml	27,67988±2,266		43,897	0,001
100 µg/ml	250 µg/ml	14,048±0,160		24,267	0,002
50 µg/ml	200 µg/ml	11,4782±1,594		18,632	0,003
40 µg/ml	150 µg/ml	34,25844±0,861		58,392	0,000
30 µg/ml	100 µg/ml	45,3691±1,230		76,439	0,000
15 µg/ml	50 µg/ml	24,99266±2,642		7,451	0,018
10 µg/ml	25 µg/ml	26,7744±2,541		41,520	0,001
5 µg/ml	10 µg/ml	12,66765±2,226		19,753	0,003

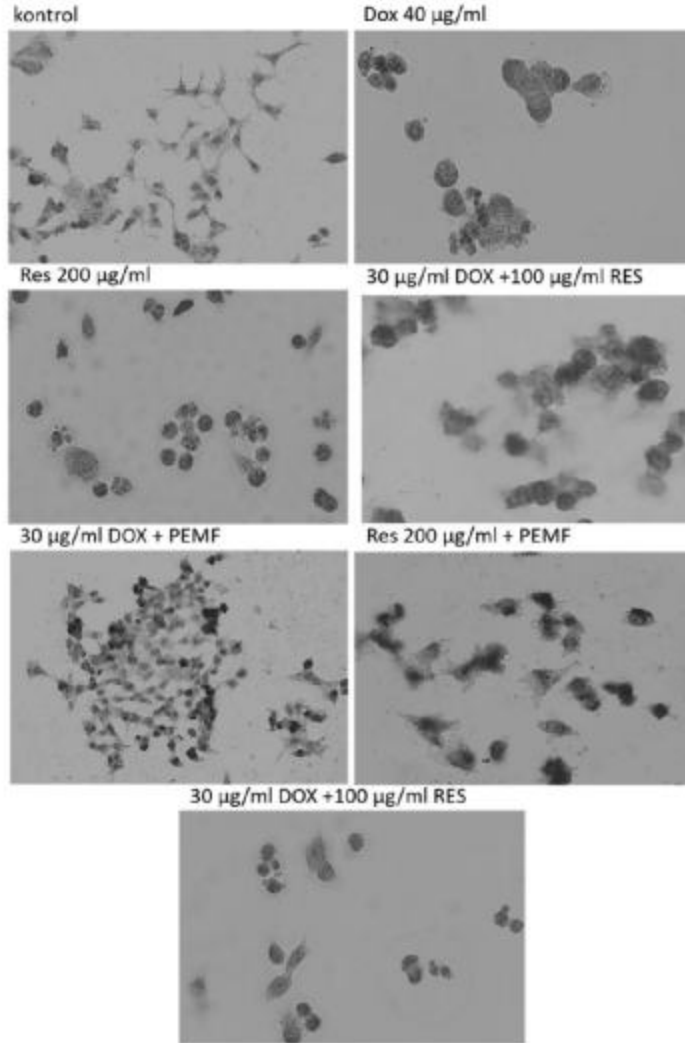
Tablo 25: Elektro manyetik alan uygulanan DOX + RES farklı dozlarının 72 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 (etkin doz) değeriyle karşılaştırılması (p>0,05).

72 Saat için					
DOX+RES Konsantrasyonları +PEMF (µg/ml)		% Canlılık Değerleri		İstatistiksel Analiz (One-Simple t Test)	
		Ortalama	Standart Sapma	t	p
500 µg/ml	1000 µg/ml	29,94573±1,163		44,56503	0,001
250 µg/ml	750 µg/ml	78,78638±1,094		123,4284	0,000
125 µg/ml	500 µg/ml	66,69956±2,742		106,3708	0,000
100 µg/ml	250 µg/ml	26,61569±2,443		42,76716	0,001
50 µg/ml	200 µg/ml	26,12235±2,076		44,99185	0,000
40 µg/ml	150 µg/ml	83,34978±3,112		141,1135	0,000
30 µg/ml	100 µg/ml	44,7953±2,865		69,67545	0,000
15 µg/ml	50 µg/ml	34,7015±2,338		54,9583	0,000
10 µg/ml	25 µg/ml	27,1584±1,563		10,12308	0,010
5 µg/ml	10 µg/ml	38,8555±2,895		59,45494	0,000

4.7. TUNEL Sonuçları

SKOV-3 hücre hatının MTT testleri sonucunda belirlenen etken dozlarının apoptotik etkilerinin ışık mikroskopik olarak da gösterilmesi amaçlı TUNEL testleri yapılmıştır. Değerlendirilmenin yapılması için TUNEL yöntemi ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu altında incelenerek 5 farklı alanda toplam 100 hücre sayıldı ve apoptotik hücre yüzdesi belirlendi. Uzantılarını kaybetmemiş ve açık renk

boyanan hücreler TUNEL (-) olarak, apoptotoik figür sergileyen, morfolojik olarak uzantılarını kaybetmiş koyu boyanan hücreler TUNEL (+) olarak kabul edildi. 24 saat ardından alınan etken doz gruplarına ait görüntüler aşağıdaki gibi gözlemlendi.



Şekil 21: Tunel sonuçları 4x görüntüleri.

Tablo 26: Grupların TUNEL skorları

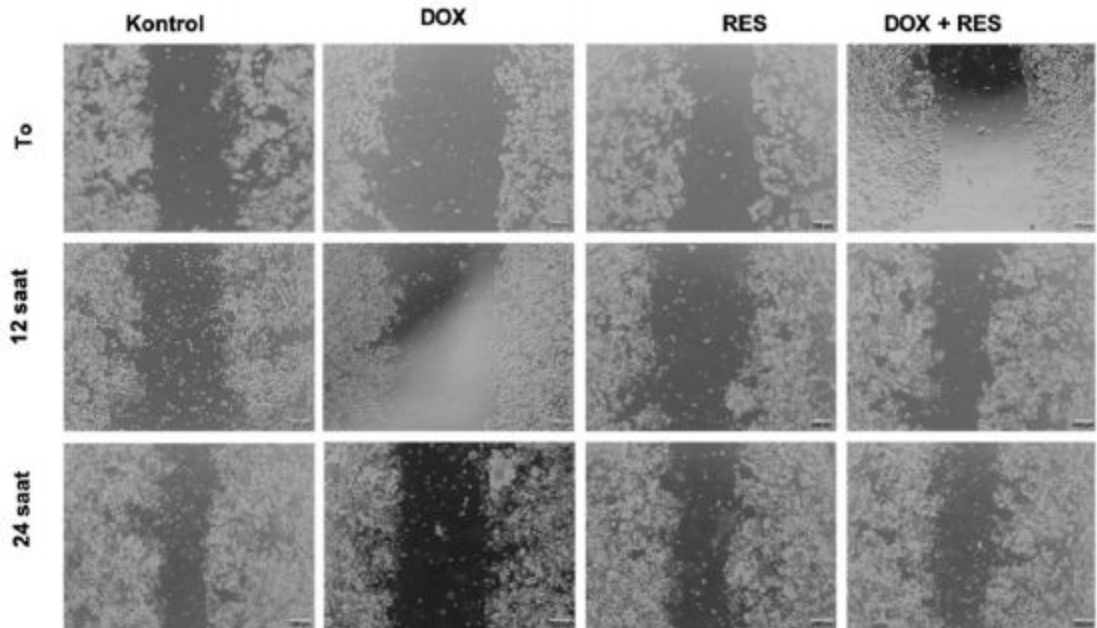
Gruplar	Tunel (+) hücre sayısı %
Kontrol	9
Dox 40 µg/ml	44
Res 200 µg/ml	31
30 µg/ml DOX +100 µg/ml RES	40
30 µg/ml DOX + PEMF	*47
Res 200 µg/ml + PEMF	33
30 µg/ml DOX +100 µg/ml RES + PEMF	46

4.8. SKOV-3 hücre hattında proliferasyon ve hücre migrasyonuna etkisinin gösterilmesi için in vitro yara iyileşme modelinin uygulanması

Uygulamaların SKOV-3 hücre hattının proliferasyon ve migrasyonuna etkilerini gözlemlemek için yara iyileşme deneyi yapıldı. Well-plate tabanında %100 yoğunluğa ulaşan hücrelerin üzerine pipet ucu yardımıyla çizikler atılmıştır. Böylece o bölgedeki hücreler kazınarak boşalan alanın doldurulması 0, 12, 24 saat sürelerinde fotoğraflanarak incelenmiştir.

4.8.1. Elektromanyetik alan uygulanmayan grupların yara iyileşme sonuçları

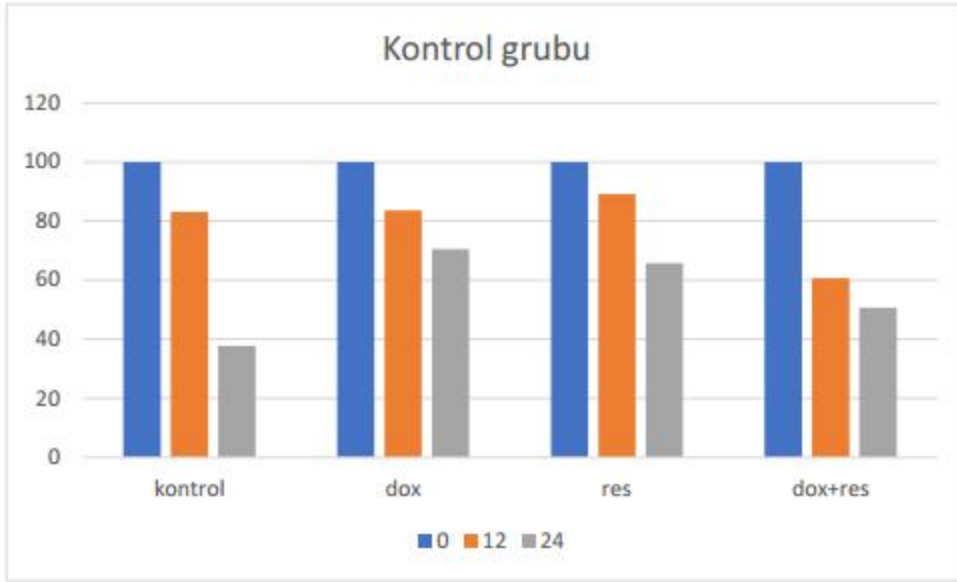
Fotoğraflar 0, 12, 24, saatlerinde yara alanlarının durumu gözlenmesi için çekildi. İlk gözlemlerde beklendiği gibi DOX uygulanan grupta yara iyileşmesinin en az olduğu görüldü. 24 saat sonucunda DOX uygulanan flaskın %70 yara alanına sahip olduğu görüldü. Kontrol grubu ise en çok yara iyileşmesi (dolayısıyla proliferasyon ve hücre migrasyonu) görülen grup olmuştur.



Şekil 22: Etkin dozlar uygulanan elektromanyetik alan uygulanmayan grupların yara iyileşme deney sonuçları

Tablo 27: Kontrol grubuna ait 0,12,24 saat sonuçları. Sonuçlar imaj analizi ile hesaplandığından birim pikselkare olarak alınmıştır.

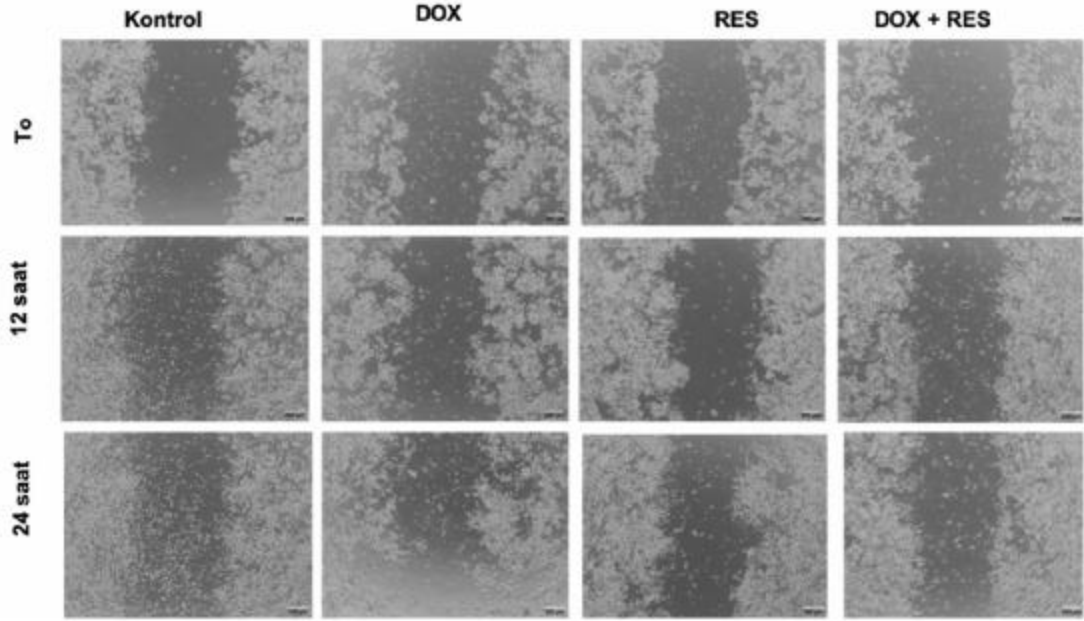
Yara alan %	kontrol	dox	res	dox+res
0 saat	100	100	100	100
12 saat	83,0557406	83,6170213	89,1894541	60,6382979
24 saat	37,7822193	70,4551716	65,7192982	50,6407719



Şekil 23: Elektromanyetik alan kullanılmayan gruplardaki yara alanlarının yüzdesi.

4.8.2. Elektromanyetik alan uygulanan grupların yara iyileşme sonuçları

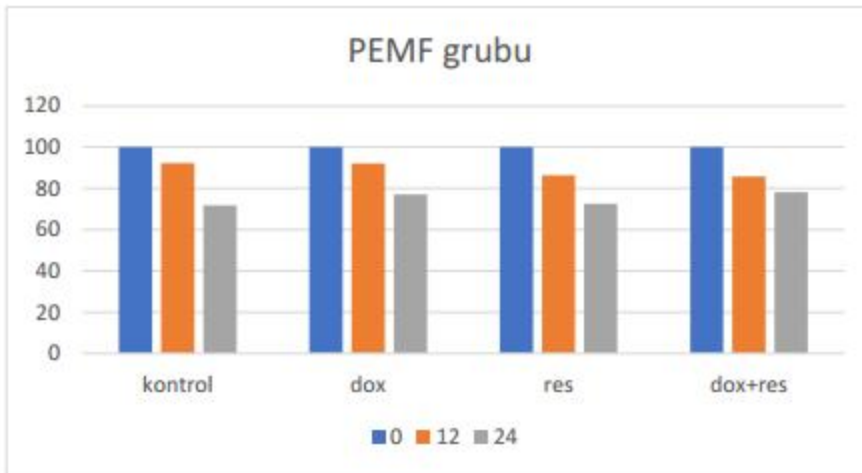
Fotoğraflar 0, 12, 24, saatlerinde yara alanlarının durumu gözlenmesi için çekildi. İlk gözlemlerde beklendiği gibi DOX+PEMF uygulanan grupta yara iyileşmesinin en az olduğu görüldü. 24 saat sonucunda DOX uygulanan flaskın %77 yara alanına sahip olduğu görüldü. Kontrol grubu ise en çok yara iyileşmesi (dolayısı ile proliferasyon ve hücre migrasyonu) görülen grup olmuştur.



Şekil 24: Etken dozlar uygulanan elektromanyetik alan uygulanmayan grupların yara iyileşme deney sonuçları

Tablo 28: PEMF grubuna ait 0,12,24 saat sonuçları. Sonuçlar imaj analizi ile hesaplandığından birim pikselkare olarak alınmıştır.

	kontrol	dox	res	dox+res
0	100	100	100	100
12	92,2077922	92,0742232	86,3583815	85,6721191
24	71,7209302	77,0218642	72,6040462	78,1006026



Şekil 25: Elektromanyetik alan kullanılan gruplardaki yara alanlarının yüzdesi.

5. TARTIŞMA

Ovaryum kanseri, kadın reproduktif sistem kanserleri arasında en çok ölüme sebep olan kanser türüdür . Güncel tedaviler ölüm oranlarını azaltmış ve sağkalım süresi , sağkalım sonrası yaşam kalitesi gibi kavramlar önem kazanmaya başlamıştır. (64, 65, 66, 67).

DOX (DOX); ovaryum, meme, akciğer ve karaciğer kanseri gibi birçok kanser türünde yaygın olarak kullanılan antitümör ajandır (68, 69, 70, 71) .

DOX ile ilgili çalışmalar, etki mekanizması gereği DNA zincir kırıklarına, serbest oksijen radikallerinin oluşumuna, hücrede apoptozun indüklenmesine sebep olduğunu ve teratojenik ve mutajenik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. (1, 2, 3).

RES, insan ovaryum kanseri hücrelerinde VEGF ve HIF-la'nın ekspresyonunu, PI3K / Akt ve MAPK sinyal yolunu inhibe ederek baskıladığı bildirilmiştir (72).

Kanser hücreleri zamanla kemoterapötik ajanlara karşı direnç geliştirebilmektedir. Bu dirençin yüksek dozla aşılması sağlıklı hücre ve dokulara zarar verebileceğinden alternatif yollar aranmış ve kombine ilaç uygulamaları araştırılmaya başlanmıştır. İlaç-ilaç, ilaç-antioksidan, ilaç-kök hücre vb birçok uygulama halen çalışmalara konu olmaktadır.

DOX direnci gösteren meme kanseri hücre hatlarıyla yapılan çalışmada, RESün, MCF-7 / ADR ve MDA-MB-231 hücrelerinde DOX kaynaklı sitotoksiteyi arttırdığı gösterilmiştir (73).

Patankar 2013, Topotekan + DOX kombinasyonları kullanılmış ve SKOV-3 ve OVCAR-3 ovaryum kanseri hücre hatlarında bu kombinasyonun tekli uygulamalara göre daha iyi sonuçlar verdiğini göstermiştir (74).

Pashaei-Asl, 2017 , SKOV-3 hücre hattı üzerinde, 48 saatlik uygulamadan sonra hücre büyümesini paklitaksel + silibinin kombinasyonu ile önemli ölçüde inhibe edildiğini apoptozu indüklediğini raporlamıştır (75).

Nguyen ve arkadaşları, kalsiyumun, DOX sitotoksitesisi üzerindeki baskılayıcı bir etkisi olduğunu gözlemlenmiş; eşzamanlı kalsiyum + DOX tedavisi, sadece DOX ile muamele edilmiş hücreler ile karşılaştırıldığında, önemli ölçüde daha yüksek hücre sağ kalımı ile sonuçlandığını raporlamıştır (76).

Kalsiyum homeostazi, hücre dışı kalsiyum konsantrasyonundaki değişikliklere cevap veren gerilime bağlı kalsiyum kanalları tarafından sıkı bir şekilde düzenlendiği, kanalların Ca^{2+} için seçici geçirgenlik yoluyla etki ettiği ve birkaç alt birimin etkileşimi ile oluşturulduğu raporlanmıştır (77).

Kemoteröpatiklere karşı direnç kazanmış hücrelerde kalsiyum kanal bloke edici verapamilin iç direncin aşılmasında ve apoptozisin indüklenmesinde etkin olduğu raporlanmıştır (78, 79)

Doku bakımı, onarımı ve yenilenmesi ile ilgili önerilen elektro manyetik alan sinyal iletim yolu, calmoduline voltaj bağlı Ca^{2+} (fiziksel ve kimyasal uyarılarla aktiveleştirilen ve sayısı arttıran Ca^{2+}) bağlanması ile başlamaktadır (80, 81, 82, 83, 84).

Goudarzi ve arkadaşları tarafından diyabet hastalık modeli oluşturulan visar albino tipi sıçanlarda deride yara iyileşmesine elektromanyetik alan etkisi incelenmiş ve sıçanlarda yara iyileşmesinin daha hızlı gerçekleştiği rapor edilmiştir (85)

PEMF'e maruz kalma ile indüklenen hücre içi Ca^{2+} 'nın salınımı, Ca^{2+} 'nın calmoduline daha fazla bağlanmasına ve metabolizma, enflamasyon, apoptoz, vasküler tonus ve diğerleri ile ilgili çeşitli akış sinyal yollarını aktifleştirdiği rapor edilmiştir (86).

Crocetti ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, ultra-düşük yoğunluklu ve frekanslı PEMF tedavisinin, insan meme adenokarsinom hücrelerinde (MCF7) apoptozu indükleyip indükleyemeyeceği araştırılmıştır, PEMF'e maruz kalma MCF7 hücrelerine sitotoksik etki gösterirken, MCF10 hücrelerinde aynı etkiyi göstermemiştir (87).

Filipovic ve arkadaşları insan meme kanseri (MDA-MB-231) ve kolon kanseri (SW-480 ve HCT-116) hücre hatlarında PEMF'in etkisini incelemiş ve 24 – 72 saat 50 Hz 10 mT pemf uygulamasının apoptozisi arttırdığını raporlamışlardır (88).

Yapılan çalışmalarda PEMF tedavisinin proliferatif inhibisyon ve mitotik iğ bozulmasını etkileyebileceğini, tümör beslemesi için gerekli neovaskülarizasyonu engellediğini göstermiştir. (89, 90).

Rihova ve arkadaşları fareler üzerine EL4 T-cel lenfoma hücre hattı inoküle ederek tümör geliştirmiş ve tümör çapının küçülmesine DOX ile birlikte uygulanan elektromanyetik alanın etkilerini incelemişlerdir. DOX + elektromanyetik alanın sinerjik etkisinin yalnızca DOX uygulanan gruplara göre anlamlı şekilde daha fazla olduğu gösterilmiştir (91).

Tang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, düşük yoğunluklu bir EMF ile birlikte 7.83 Hz frekansında bir Schumann rezonansının B16F10 kanser hücrelerinin büyümesini inhibe edebileceğini göstermiştir (92).

Suryani ve arkadaşları , hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve mineralleşmesini etkin bir şekilde düzenlemek için optimal PEMF stimülasyon parametrelerinin ve osteojenik ortam takviyelerinin gerekli olduğunu göstermiştir (93).

U87 glioblastoma hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, uygulanan ELF - PEMF'in U87 hücrelerinin büyümesini durduran uygulama süresi ve elektromanyetik alan yoğunluğunun tespitinin yeni terapötik yaklaşımlar geliştirmenin yolunu açabileceğini raporlanmıştır (94).

Yapılan çalışmalarda elektromanyetik alana maruz kalan insan hücrelerinin hücre zarı geçirgenliğini pozitif etkilediği ve tripan mavisi ve indigokarmin boyasına geçirgenliğinin arttırdığı gösterilmiştir [94,95,96,97,98].

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. SKOV-3 hücrelerine Canlılık testleri yapılarak DOX, RES , DOX + RES, DOX+ PEMF, RES + PEMF, DOX + RES + PEMF uygulamalarının baskılayıcı konsantrasyonları bulundu. Bu değerler; DOX için 40 µg/ml, RES için 200 µg/ml, DOX+ RES 30 µg/ml DOX +100 µg/ml RES , DOX + PEMF uygulaması için 30 µg/ml + PEMF 75 Hz 5 volt, RES + PEMF için 200 µg/ml + PEMF 75 Hz 5 volt, DOX + RES + PEMF için 30 µg/ml DOX +100 µg/ml RES + PEMF 75 Hz 5 volt olarak belirlenmiştir.

2. SKOV-3 hücrelerine uygulanan TUNEL testi ve yara iyileşme modeli ile dozların etkinliği tekrar test edilmiş ve sonuçlar teyit edilmiştir.

3. İn vitro yara iyileşme modeli SKOV-3 hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonuna kombine ve tekli uygulamaların etkileri gözlemlenmiştir. Kontrol gruplarında hızla çoğalan SKOV- 3 hücreleri çizik atılan kısmı kapatırken, DOX 30 µg/ml + PEMF 75 Hz 5 volt gruplarında proliferasyon ve migrasyon minimum seviyede görülmüştür.

3. DOX ve PEMF'in hücre zarı kalsiyum kanalları ile direkt ilgili olduğu bilinmektedir. DOX ve PEMF'in kombine uygulamasının tekli uygulamalara göre daha etkili olduğu sonucu bu birlikteliğin kalsiyum kanallarını etkilemesiyle ilgili olduğunu düşündürmektedir.

4. Kalsiyum kanal yapısı ve kalsiyum mekanizmasının DOX + PEMF birlikteliğindeki etkisinin kesin olarak anlaşılabilmesi için moleküler düzeyde kalsiyum kanal proteinlerinin ekspresyonu, hücre içi ve dışı kalsiyum seviyelerinin ölçümleri incelenerek bu birlikteliğe dair yeni kanıtlar bulunabilir.

5. DOX PEMF ile kombine kullanıldığında, DOXin tekli kullanımına göre daha düşük dozda etkin değere ulaştığını göstermektedir. DOXin sağlıklı hücreler üzerindeki toksik etkisi bilinmektedir. PEMF gibi harici bir uygulama irritasyona yol açmadan düşük dozlarda etkin kanser tedavisi sağlanmasına yardımcı bir aparat kullanılabilir.

6. Kullanılan kemoteröpatik ilaçların dozlarının PEMF ile düşürülmesi, kemoerapinin yan etkilerini azaltacağı gibi yüksek sağlık giderlerinin düşmesine de katkıda bulunabilir ve ülkemizin dışa bağımlılığını azaltmada etkili olabilir.

7. Çalışmada elde edilen bulguların yayın olarak sunulması ile kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar kazandırılması ve tedavilerin geliştirilmesine yardımcı olması amaçlanmaktadır.

8. Sonuç olarak tüm verilerimiz değerlendirildiğinde düşük darbeli elektromanyetik alan kanser tedavisinde kemoteröpatik ajanların etkisini arttırıcı bir aparat kullanılabileceği gösterilmiştir.

7. KAYNAKÇA

1. Y. Bendale, V. Bendale, S. Paul, Evaluation of cytotoxic activity of platinum nanoparticles against normal and cancer cells and its anticancer potential through induction of apoptosis, *Integr. Med. Res.* 6 (2017) 141–148.
2. Mordente A, Meucci E, Silvestrini A, Martorana GE, Giardina B. New developments in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Curr Med Chem.* 2009; 16:1656–1672.
3. M.J. Vallejo, L. Salazar, M. Grijalva, Oxidative Stress Modulation and ROS-Mediated Toxicity in Cancer: A Review on In Vitro Models for Plant-Derived Compounds, *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2017). doi:10.1155/2017/4586068.
4. Yu M, Liu H, Shi A, et al. Preparation of resveratrol-enriched and poor allergenic protein peanut sprout from ultrasound treated peanut seeds. *Ultrason Sonochem.* 2016; doi:10.1016/j.ultsonch.2015.08.008.
5. Bastin J, Djouadi F. Resveratrol and Myopathy. *Nutrients.* 2016; doi:10.3390/nu8050254.
6. Waterhouse AL. Wine phenolics. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;957:21–36.
7. Athar M, Back JH, Tang X, et al. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;224:274–83.
8. Selvam, R., Ganesan, K., Raju, K. N., Gangadharan, A. C., Manohar, B. M., & Puvanakrishnan, R. (2007). Low frequency and low intensity pulsed electromagnetic field exerts its antiinflammatory effect through restoration of

- plasma membrane calcium ATPase activity. *Life sciences*, 80(26), 2403-2410.
9. Standring, Susan, ed. *Gray's anatomy e-book: the anatomical basis of clinical practice*. Elsevier Health Sciences, 2015.
 10. Ross, Michael H., and Wojciech Pawlina. *Histology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
 11. Kierszenbaum, Abraham L., and Laura Tres. *Histology and Cell Biology: an introduction to pathology E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2015.
 12. Junqueira, L. C. U., & Carneiro, J. (2005). *Basic histology: text & atlas*. McGraw-Hill Professional.
 13. Sadler, Thomas W. *Langman's medical embryology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
 14. Moore, Keith L., Trivedi Vidhya Nandan Persaud, and Mark G. Torchia. *The Developing Human-E-Book: Clinically Oriented Embryology*. Elsevier Health Sciences, 2018.
 15. Dudek, Ronald W. *Embryology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2010.
 16. Fışkın, K. 2002. Genetik Kavramlar. Altıncı baskıdan çeviri. Öner, C. (635-651).
 17. Weinberg, Robert A. *The Biology of Cancer: Second International Student Edition*. WW Norton & Company, 2013.

18. Tomatır, A.G. 2003. Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. T Klin Tıp Bilimleri, 23:499-508.
19. Melet, A., Song, K., Bucur, O., Jagani, Z., Grassian, A.R., Khosravi-Far, R. Apoptotic pathways in tumor progression and therapy. *Adv Exp Med Biol.* 2008;615:47-79.
20. Kopnin, B.P. 2000. Targets of oncogenes and tumor suppressors: Key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry.* Vol 65. No 1, pp. 2-27.
21. Akbulut, H ve Akbulut K.G. 2005. Tıbbi Onkoloji Kitabı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antıp Yayınları, Editör İçli F. (23)
22. Pierotti MA, Sozzi G, Croce CM. Oncogenes. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al, eds. *Cancer Medicine.* 6th ed. Hamilton, Ontario: BC Decker Inc; 2003: 73–85.
23. Zetter, B.R.. The scientific contributions of M. Judah Folkman to cancer research.
Nature Reviews/ Cancer Volume 8 (2008)
24. Tingulstad, S., Skjeldestad, F. E., Halvorsen, T. B., & jørn Hagen, B. (2003). Survival and prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Obstetrics & Gynecology*, 101(5), 885-891.
25. Torre, L. A., Trabert, B., DeSantis, C. E., Miller, K. D., Samimi, G., Runowicz, C. D., ... & Siegel, R. L. (2018). Ovarian cancer statistics,

2018. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(4), 284-296.
26. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
27. Lengyel, E. (2010). Ovarian cancer development and metastasis. *The American journal of pathology*, 177(3), 1053-1064.
28. Bilgen, T., (2008). Malign epitelyal over tümörlerinde metastaz supresör genlerlerin düzeylerinin belirlenmesi ve MDR1 geninin ilaç dirençliliği üzerine etkisinin araştırılması, Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
29. Mastanabad, M- V., (2008). Kaspaz promotör bölge polimorfizmleri ve ovaryum kanseri arasındaki ilişki, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
30. Wentzensen, N., Poole, E. M., Trabert, B., White, E., Arslan, A. A., Patel, A. V., ... & Black, A. (2016). Ovarian cancer risk factors by histologic subtype: an analysis from the ovarian cancer cohort consortium. *Journal of Clinical Oncology*, 34(24), 2888.
31. Kurman, R. J., & Shih, I. M. (2016). The dualistic model of ovarian carcinogenesis: revisited, revised, and expanded. *The American journal of pathology*, 186(4), 733-747.
32. Howlader, N., Noone, A. M., Krapcho, M., Miller, D., Bishop, K., Altekruse,

- S. F., ... & Mariotto, A. (2016). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, National Cancer Institute. Bethesda, MD.
33. Curran S, Dundas S. R, Buxton J, Leeman M. F, Ramsay R, ve Murray G. I., (2004). Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. *Clinical Cancer Research* Vol: 10 8229-8234.
34. Chabner, B.A., Brunton, L.L., and Knollmann, B.C., 1996. Antineoplastic agents. In: J.G. Hardman and L.E. Limbird, eds. *Goodman & Gilman's—the pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill, 233–287.
35. Vendramini, V., Sasso-Cerri, E., and Miraglia, S.M., 2010. Amifostine reduces the seminiferous epithelium damage in doxorubicin-treated prepubertal rats without improving the fertility status. *Reproductive Biology and Endocrinology*,8,3.
36. Quiles, J. L., Huertas, J. R., Battino, M., Mataix, J., & Ramírez-Tortosa, M. C. (2002). Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology*, 180(1), 79-95.
37. Shahzadi, A., & Yazici, Z. (2014). Effect of Ciprofloxacin on the Plasma Concentration of Doxorubicin, Following Acute and Chronic Dose Protocol in Sprague Dawley Rats. *International Journal of Pharmacology*, 10(1), 69-77.
38. Hideg, K., & Kálai, T. (2007). Novel antioxidants in anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovascular toxicology*, 7(2), 160-164.
39. Muggia, F. M., & Green, M. D. (1991). New anthracycline antitumor

- antibiotics. *Critical reviews in oncology/hematology*, 11(1), 43-64.
40. Meadors, M., Floyd, J., & Perry, M. C. (2006, February). Pulmonary toxicity of chemotherapy. In *Seminars in oncology*(Vol. 33, No. 1, pp. 98-105).
41. Floyd, J., Mirza, I., Sachs, B., & Perry, M. C. (2006, February). Hepatotoxicity of chemotherapy. In *Seminars in oncology* (Vol. 33, No. 1, pp. 50-67). WB Saunders.
42. Perez, G. I., Knudson, C. M., Leykin, L., Korsmeyer, S. J., & Tilly, J. L. (1997). Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. *Nature medicine*, 3(11), 1228.
43. Gonfloni, S., Di Tella, L., Caldarola, S., Cannata, S. M., Klinger, F. G., Di Bartolomeo, C., ... & Cesareni, G. (2009). Inhibition of the c-Abl–TAp63 pathway protects mouse oocytes from chemotherapy-induced death. *Nature medicine*, 15(10), 1179.
44. Nishi, K., Ramakrishnan, S., Gunasekaran, V. P., Parkash, K., Ramakrishnan, A., Vijayakumar, N., & Ganeshan, M. (2018). Protective effects of p-coumaric acid on ethanol induced male reproductive toxicity. *Life sciences*, 209, 1-8.
45. Knobf, M. T. (2006). The influence of endocrine effects of adjuvant therapy on quality of life outcomes in younger breast cancer survivors. *The oncologist*, 11(2), 96-110.
46. Meirow, D., Assad, G., Dor, J., & Rabinovici, J. (2004). The GnRH antagonist cetrorelix reduces cyclophosphamide-induced ovarian follicular

destruction in mice. *Human reproduction*, 19(6), 1294-1299.

47. Lee, E., Nichols, P., Spicer, D., Groshen, S., Mimi, C. Y., & Lee, A. S. (2006). GRP78 as a novel predictor of responsiveness to chemotherapy in breast cancer. *Cancer research*, 66(16), 7849-7853.
48. Perez, G. I., Knudson, C. M., Leykin, L., Korsmeyer, S. J., & Tilly, J. L. (1997). Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. *Nature medicine*, 3(11), 1228.
49. Abdulla, A., Zhao, X., & Yang, F. (2013). Natural polyphenols inhibit lysine-specific demethylase-1 in vitro. *Journal of biochemical and pharmacological research*, 1(1), 56.
50. Yu M, Liu H, Shi A, et al. Preparation of resveratrol-enriched and poor allergic protein peanut sprout from ultrasound treated peanut seeds. *Ultrason Sonochem*. 2016; doi:10.1016/j.ultsonch.2015.08.008
51. Wenzel, E., & Somoza, V. (2005). Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Molecular nutrition & food research*, 49(5), 472-481.
52. De La Lastra, C. A., & Villegas, I. (2007). Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications.
53. Das, D. K., & Maulik, N. (2006). Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Molecular interventions*, 6(1), 36-47.
54. Pace-Asciak, Cecil R., et al. "The red wine phenolics trans-resveratrol and

- quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease." *Clinica chimica acta* 235.2 (1995): 207-219.
55. Uguralp, S., B. Mizrak, and A. Bay Karabulut. "Resveratrol reduces ischemia reperfusion injury after experimental testicular torsion." *European journal of pediatric surgery* 15.02 (2005): 114-119.
56. Gautam, S. C., Xu, Y. X., Dumaguin, M., Janakiraman, N., & Chapman, R. A. (2000). Resveratrol selectively inhibits leukemia cells: a prospective agent for ex vivo bone marrow purging. *Bone marrow transplantation*, 25(6), 639.
57. Nigdikar, Shailja V., et al. "Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo." *The American journal of clinical nutrition* 68.2 (1998): 258-265.
58. Kaplan, S., Bisleri, G., Morgan, J. A., Cheema, F. H., & Oz, M. C. (2005). Resveratrol, a natural red wine polyphenol, reduces ischemia-reperfusion-induced spinal cord injury. *The Annals of thoracic surgery*, 80(6), 2242-2249.
59. Kiziltepe, Ugursay, et al. "Resveratrol, a red wine polyphenol, protects spinal cord from ischemia-reperfusion injury." *Journal of vascular surgery* 40.1 (2004): 138-145.
60. Wang, Jingxuan, et al. "Resveratrol protects against cisplatin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage." *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 24.6 (2009): 675-680.
61. Aaltonen, T., Adelman, J., Akimoto, T., González, B. Á., Amerio, S.,

- Amidei, D., ... & Apresyan, A. (2009). Observation of electroweak single top-quark production. *Physical review letters*, 103(9), 092002.
62. Singh, M., Kapoor, A., & Bhatnagar, A. (2015). Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls. *Chemico-biological interactions*, 234, 261-273.
63. Hug, K., Röösl, M., & Rapp, R. (2006). Magnetic field exposure and neurodegenerative diseases—recent epidemiological studies. *Sozial-und Präventivmedizin*, 51(4), 210-220.
64. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., & Thun, M. J. (2008). Cancer statistics, 2008. *CA: a cancer journal for clinicians*, 58(2), 71-96.
65. Sankaranarayanan, R., & Ferlay, J. (2006). Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 20(2), 207-225.
66. Saika, K., & Sobue, T. (2013). Cancer statistics in the world. *Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy*, 40(13), 2475-2480.
67. Lowe, K. A., Chia, V. M., Taylor, A., O'Malley, C., Kelsh, M., Mohamed, M., ... & Goff, B. (2013). An international assessment of ovarian cancer incidence and mortality. *Gynecologic oncology*, 130(1), 107-114.
68. Singal, P. K., & Iliskovic, N. (1998). Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, 339(13), 900-905.
69. Chatterjee, K., Zhang, J., Honbo, N., & Karliner, J. S. (2010). Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*, 115(2), 155-162.

70. Arcamone, F. (2012). *Doxorubicin: anticancer antibiotics*. Elsevier.
71. Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and genomics*, *21*(7), 440.
72. Cao, X., Luo, T., Luo, X., & Tang, Z. (2014). Resveratrol prevents AngII-induced hypertension via AMPK activation and RhoA/ROCK suppression in mice. *Hypertension Research*, *37*(9), 803.
73. Kim, T. H., Shin, Y. J., Won, A. J., Lee, B. M., Choi, W. S., Jung, J. H., ... & Kim, H. S. (2014). Resveratrol enhances chemosensitivity of doxorubicin in multidrug-resistant human breast cancer cells via increased cellular influx of doxorubicin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1840*(1), 615-625.
74. Patankar, N. A., Pritchard, J., van Grinsven, M., Osooly, M., & Bally, M. B. (2013). Topotecan and doxorubicin combination to treat recurrent ovarian cancer: the influence of drug exposure time and delivery systems to achieve optimum therapeutic activity. *Clinical Cancer Research*, *19*(4), 865-877.
75. Pashaei-Asl, R., Pashaei-Asl, F., Gharabaghi, P. M., Khodadadi, K., Ebrahimi, M., Ebrahimie, E., & Pashaiasl, M. (2017). The inhibitory effect of ginger extract on Ovarian cancer cell line; application of systems biology. *Advanced pharmaceutical bulletin*, *7*(2), 241.

76. Nguyen, T. T. T., Lim, Y. J., Fan, M. H. M., Jackson, R. A., Lim, K. K., Ang, W. H., ... & Chen, E. S. (2016). Calcium modulation of doxorubicin cytotoxicity in yeast and human cells. *Genes to Cells*, 21(3), 226-240.
77. Pall, M. L. (2013). Electromagnetic fields act via activation of voltage-gated calcium channels to produce beneficial or adverse effects. *Journal of cellular and molecular medicine*, 17(8), 958-965.
78. Sarkadi, B., Homolya, L., Szakács, G., & Váradi, A. (2006). Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiological reviews*, 86(4), 1179-1236.
79. Zhou, Y., Shi, J., Cui, J., & Deng, C. X. (2008). Effects of extracellular calcium on cell membrane resealing in sonoporation. *Journal of Controlled Release*, 126(1), 34-43.
80. Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and genomics*, 21(7), 440.
81. Barnett, S. E., & Varley, S. J. (1987). The effects of calcium alginate on wound healing. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 69(4), 153.
82. Pilla, A., Fitzsimmons, R., Muehsam, D., Wu, J., Rohde, C., & Casper, D. (2011). Electromagnetic fields as first messenger in biological signaling: application to calmodulin-dependent signaling in tissue repair. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1810(12), 1236-1245.

83. Li, J. K. J., Lin, J. C. A., Liu, H. C., Sun, J. S., Ruaan, R. C., Shih, C., & Chang, W. H. S. (2006). Comparison of ultrasound and electromagnetic field effects on osteoblast growth. *Ultrasound in medicine & biology*, 32(5), 769-775.
84. Markov, M. S. (2007). Expanding use of pulsed electromagnetic field therapies. *Electromagnetic biology and medicine*, 26(3), 257-274.
85. Goudarzi, I., Hajizadeh, S., Salmani, M. E., & Abrari, K. (2010). Pulsed electromagnetic fields accelerate wound healing in the skin of diabetic rats. *Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association*, 31(4), 318-323.
86. Gaynor, J. S., Hagberg, S., & Gurfein, B. T. (2018). Veterinary applications of pulsed electromagnetic field therapy. *Research in veterinary science*, 119, 1-8.
87. Crocetti, S., Beyer, C., Schade, G., Egli, M., Fröhlich, J., & Franco-Obregón, A. (2013). Low intensity and frequency pulsed electromagnetic fields selectively impair breast cancer cell viability. *PloS one*, 8(9), e72944.
88. Filipovic, N., Djukic, T., Radovic, M., Cvetkovic, D., Curcic, M., Markovic, S., ... & Jeremic, B. (2014). Electromagnetic field investigation on different cancer cell lines. *Cancer Cell International*, 14(1), 84.
89. Fang, K. S., Farboud, B., Nuccitelli, R., & Isseroff, R. R. (1998). Migration of human keratinocytes in electric fields requires growth factors and extracellular calcium. *Journal of investigative dermatology*, 111(5), 751-756.

90. Da Silva, F. L. (1996). The generation of electric and magnetic signals of the brain by local networks. In *Comprehensive human physiology* (pp. 509-531). Springer, Berlin, Heidelberg.
91. Říhová, B., Etrych, T., Šírová, M., Tomala, J., Ulbrich, K., & Kovář, M. (2011). Synergistic effect of EMF–BEMER-type pulsed weak electromagnetic field and HPMA-bound doxorubicin on mouse EL4 T-cell lymphoma. *Journal of drug targeting*, 19(10), 890-899.
92. Tang, J. Y., Yeh, T. W., Huang, Y. T., Wang, M. H., & Jang, L. S. (2019). Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on B16F10 cancer cells. *Electromagnetic biology and medicine*, 38(2), 149-157.
93. Suryani, L., Too, J. H., Hassanbhai, A. M., Wen, F., Lin, D. J., Yu, N., & Teoh, S. H. (2019). Effects of Electromagnetic Field on Proliferation, Differentiation, and Mineralization of MC3T3 Cells. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 25(2), 114-125.
94. Akbarnejad, Z., Eskandary, H., Vergallo, C., Nematollahi-Mahani, S. N., Dini, L., Darvishzadeh-Mahani, F., & Ahmadi, M. (2017). Effects of extremely low-frequency pulsed electromagnetic fields (ELF-PEMFs) on glioblastoma cells (U87). *Electromagnetic biology and medicine*, 36(3), 238-247.
95. Shkorbatov, Y. G., Shakhbazov, V. G., Navrotskaya, V. V., Grabina, V. A., Sirenko, S. P., Fisun, A. I., ... & Kiyko, V. I. (2002). Application of intracellular microelectrophoresis to analysis of the influence of the low-level microwave radiation on electrokinetic properties of nuclei in human epithelial

cells. *Electrophoresis*, 23(13), 2074-2079.

96. Shckorbatov, Y., Rudneva, I., Pasiuga, V., Grabina, V., Kolchigin, N., Ivanchenko, D., ... & Dumin, O. (2010). Electromagnetic field effects on *Artemia* hatching and chromatin state. *Open Life Sciences*, 5(6), 785-790.
97. Shckorbatov, Y. (2014). The main approaches of studying the mechanisms of action of artificial electromagnetic fields on cell. *Journal of Electrical & Electronics*, 3(2), 1.
98. Shckorbatov, Y. (2018, September). The Application of Pulsed Electric Fields and Other Types of Electromagnetic Radiation in Therapy of Cancer. In *2018 9th International Conference on Ultrawideband and Ultrashort Impulse Signals (UWBUSIS)*(pp. 69-73). IEEE.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı:	Erdi KESELİK
Doğum Tarihi:	04.11.1988
Doğum Yeri:	Adana

Eğitim Bilgileri

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	Mersin Üniversitesi	2006-2011
Lisans-Erasmus Öğrenci Değişim Programı	Fakultat für Biologie	Julius Maximilian Universität, Würzburg	2009-2010
Yüksek Lisans	Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü	Mersin Üniversitesi	2012-2015
Yüksek Lisans	Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Ab.D.	İzmir Katip Çelebi Üniversitesi	2016-halen

Yabancı Dil Bilgisi

İngilizce	İyi (B1)
Almanca	İyi (B2)

Bildiri, Bilimsel Aktivite ve Etkinlikler

-
- Erasmus Öğrenci Değişim Programı, Julious Maximilian Üniversiteät, Würzburg, Eylül, 2009 - Ağustos, 2010

-
- 24. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi Katılım- 2019
 - 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi – 2018
 - TSRM İzmir Sempozyumu- Tüp Bebeğin 40. Yılında Geçmişten Geleceğe İnfertilite – 2018
 - 5. Onkolojide Araştırma Uygulamaları Kursu ve Moleküler Yöntemler Kursu- 2019
 - TSRM İzmir Sempozyumu – 2019
 - 3. Uluslararası Kök Hücre Sempozyumu – Manisa - 2017

Staj ve Gönüllü Organizasyonlar

XVII. Akdeniz Oyunları-Mersin Haziran 2013-Temmuz 2013

Projeler

MEÜ BAP Birimi Yüksek Lisans Tezi Ocak 2013-Aralık 2013

İKÇÜ BAP Birimi

- Polikistik Over Sendromu 2018-ÖNAP-TIPF-0003
Oluşturulmuş Sıçanlarda D
Vitamini İle Kombine Edilen
Aronia Melanocarpa’Nın
Ovaryum Dokusu Üzerine
Etkilerinin Ultrastrüktürel Ve
Histopatolojik İncelenmesi

-
- Tavşan Karotid Arter 2018-ÖNAP-TIPF-0005
Anastomozunda Polyethylene Glycol Polymer(Co-Seal®) Ve Bovin Serum Albumin Glutaraldehyde(Bioglue®)'in Neointimal Hiperplazi Üzerine Etkisi
 - Skov-3 Hücre Hattında 2018-TYL-SABE-0067
Doksorubicin İle İndüklenen Apoptozise Resveratrol Ve Pemf İn Etkisinin İncelenmesi

Setifika - Eğitim - Kongre katılımları

-
- GLP-İyi Laboratuvar Uygulamaları, GMP-İyi Üretim Uygulamaları
 - ISO/IEC 17025:2005 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği
 - Deney hayvanları kullanım Sertifikası-2016 Dokuz Eylül Üniversitesi
 - Dokuz Eylül Üniversitesi ,DNA Hasarı, Onarımı ve Tandem Kütle Spektrometrik Değerlendirilmesi Teorik ve Pratik Kursu – 2018
 - 5. Onkolojide Araştırma Uygulamaları Kursu ve Moleküler Yöntemler Kursu-2019
 - 13. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Teknikler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu – 2017
 - 13. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Teknikler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu – Kök Hücrede Uygulamalı Flow Sitometri Eğitimi – 2017

077

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	SKOV-3 hücre hattında Doksorubicin ile indüklenen apoptozise Resveratrol ve PEMF'in etkisinin incelenmesi
VARSA ARAŞTIRMA PROTOKOL/PLAN KODU	-

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi 35360 Karabağlar / İZMİR
	TELEFON	0 232 245 04 38 --- 0 232 244 44 44 / 1034
	FAKS	0 232 245 04 38
	E-POSTA	


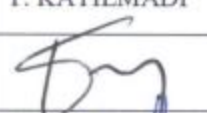





KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Meltem KURUŞ			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji ve Embriyoloji – Prof. Dr. İKÇÜ Tıp Fakültesi -Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalı başkanı – Öğretim Üyesi			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ DESTEKLEYİCİ	Histoloji ve Embriyoloji – Prof. Dr. İKÇÜ Tıp Fakültesi -Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalı başkanı – Öğretim Üyesi			
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	-			
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	İn-vitro			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	13.10.2018		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama		

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 25	Tarih: 23.01.2019
	Yukarıda bilgileri verilen çalışmanız Kurulumuzun 14.11.2018 tarihli ve 383 sayılı kararı ile ilaç etkinliği olduğu gerekçesi ile Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna başvurulması önerilmiş ve reddedilmiştir. Söz konusu çalışmanız için 2019-0771 sayılı yazınızla yapmış olduğunuz itiraz başvurusu kurulumuzca kabul edilmiş ve çalışmanız kurulumuzda tekrar incelenmiştir. İnceleme sonucunda çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Çalışma Esasları Yönergesi
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Doç. Dr. Orhan GÖKALP

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Doç. Dr. Orhan GÖKALP / Başkan	Kalp Damar Cerrahisi	İKÇÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	T. KATILMADI
Doç. Dr. Serdar BAYATA / Başkan Yardımcısı	Kardiyoloji	İKÇÜ Atatürk EAH	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	T. KATILMADI
Prof. Dr. Yasemin TOKEM / Üye	İç Hastalıklar Hemsireliği	İKÇÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Belde Kasap DEMİR/ Üye	Çocuk Sağ. Ve Hastalıkları A.B.D	İKÇÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	T. KATILMADI
Doç. Dr. Özgür TOSUN / Üye	Radyoloji	İKÇÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ashı Baysal / Üye	Ortodonti	İKÇÜ Hekimliği Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. D. Barış KILIÇÇIOĞLU / Raportör	Adli Tıp	Sağlık Bakanlığı	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Ayşenur ATAY/ Üye	Tıbbi Biyokimya	Sağlık Bakanlığı	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Mehmet ERTAN / Üye	Sağlık Hukuku	İKÇÜ Atatürk EAH	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Gülay OYUR ÇELİK	Cerrahi Hastalıklar Hemsireliği	İKÇÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

Sayın Prof. Dr. Meltem KURUŞ

Karar No: 25
Tarih : 23.01.2019


KARAR

SKOV-3 hücre hattında Doksorubicin ile indüklenen apoptozise Resveratrol ve PEMF'in etkisinin incelenmesi adlı çalışmanız için yapmış olduğunuz etik kurul izni maksatlı müracaatınız;

Kurulumuzun 14.11.2018 tarihli ve 383 sayılı kararı ile ilaç etkinliği olduğu gerekçesi ile Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna başvurulması önerilmiş ve reddedilmiştir. Söz konusu çalışmanız için 2019-0771 sayılı yazınızla yapmış olduğunuz itiraz başvurusu kurulumuzca kabul edilmiş ve çalışmanız kurulumuzda tekrar incelenmiştir. İnceleme sonucunda çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.

T. KATILMADI
Doç. Dr. Orhan GÖKALP
Başkan

T. KATILMADI
Doç. Dr. Serdar BAYATA
Başkan Yardımcısı


Prof. Dr. Yasemin TOKEM
Üye

T. KATILMADI
Prof. Dr. Belde Kasap DEMİR
Üye


Doç. Dr. Özgür TOSUN
Üye


Doç. Dr. Aslı BAYSAL
Üye


Uzm. Dr. Ayşenur ATAY
Üye


Dr. Mehmet ERTAN
Üye

Uzm. Dr. D. Barış KILIÇÇIOĞLU
Raportör Üye


Dr. Öğr. Üyesi Gülşay OYUR ÇELİK
Üye

KARŞI OY _____ :

T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ UNIVERSITY
Non-Interventional Clinical Studies
Institutionel Review Board

To : *Meltem KURUŞ*, MD
From : Assoc. Prof. Orhan GÖKALP, MD, Chair
Date : 23.01.2019
IRB # : 25

Study Title : Investigation of the effect of Resveratrol and PEMF on Doxorubicin-induced apoptosis in the SKOV-3 cell line.

At its board meeting **23.01.2019** your submission for the above referenced research study has received review and approval from İzmir Kâtip Celebi Non-Interventional Clinical Studies Institutional Review Board.

Assoc. Prof. Orhan GÖKALP


T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
Adil Tıp İzmeni
Uz. Dr. D. Orhan Gökalp

Kurul Raporları