

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TRANSLASYONEL BİREYE ÖZGÜ BİR TEDAVİ
MODELİ OLARAK DEDİFERANSİYE
KONDROSARKOMLARDA İN VİTRO İLAÇ
DİRENCİNİN NANOPARTİKÜL BAĞLI
HEDEFLENMİŞ MOLEKÜLLERLE AŞILMASI**

ECE ÇAKIROĞLU

**TEMEL ONKOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2016

Tez kodu: 2013970182

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TRANSLASYONEL BİREYE ÖZGÜ BİR TEDAVİ
MODELİ OLARAK DEDİFERANSİYE
KONDROSARKOMLARDA İN VİTRO İLAÇ
DİRENCİNİN NANOPARTİKÜL BAĞLI
HEDEFLENMİŞ MOLEKÜLLERLE AŞILMASI**

**TEMEL ONKOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ECE ÇAKIROĞLU

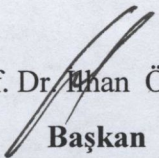
Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. İlhan ÖZTOP

İZMİR-2016

(Bu araştırma Tailor of Science Biyoteknoloji İnovasyon A.Ş. tarafından TSCI.Project.002
sayı ile desteklenmiştir.)

Tez kodu: 2013970182

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Temel Onkoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi Ece ÇAKIROĞLU ‘‘TRANSLASYONEL BİREYE ÖZGÜ BİR TEDAVİ MODELİ OLARAK DEDİFERANSİYE KONDROSARKOMLARDA İN VİTRO İLAÇ DİRENCİNİN NANOPARTİKÜL BAĞLI HEDEFLENMİŞ MOLEKÜLLERLE AŞILMASI’’ konulu Yüksek Lisans tezini 11.01.2017 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Prof. Dr.  Ehan ÖZTOP

Başkan

Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Nur OLGUN

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Yasemin BASKIN

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Hülya ELLİDOKUZ

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Serap AKSOYLAR

ÜYE

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Tuğba YAVUZŞEN

YEDEK

Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Nazan ÇETİNGÜL

YEDEK

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLOLAR DİZİNİ.....	iv
ŞEKİL DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR.....	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	4
1.1. Problemin Tanımı Ve Önemi	4
1.2. Araştırmanın Amacı	4
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kemik Tümörleri	5
2.1.1. Epidemiyoloji.....	5
2.1.2. Etiyoloji	5
2.1.3. Klinik özellikler	6
2.1.4. Tanı	6
2.1.5. Evreleme ve Derecelendirme	6
2.1.5.1. Derecelendirme	6
2.1.5.2. Evreleme	7
2.1.6. Histolojik Sınıflandırma	9
2.2. Kondrosarkom	9
2.2.1. Berrak Hücreli Kondrosarkom	11
2.2.2. Mezenkimal Kondrosarkom	12
2.2.3. Dediferansiye Kondrosarkom	13
2.2.3.1. Epidemiyoloji.....	14
2.2.3.2. Patogenez	14

2.2.3.3. Klinik görünüm	15
2.2.3.4. Teşhis	15
2.2.3.5. Tedavi	16
2.2.3.6. Prognoz.....	18
2.3. Translasyonel tıp	19
2.3.1. Nanotıp uygulamaları.....	20
2.3.1.1. Lipozomlar.....	22
2.3.1.1.1. Lipozomal doksorubisin	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM	24
3.1. Araştırmanın Tipi	24
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	24
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi.....	24
3.4. Çalışma Materyali	24
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	24
3.6. Veri Toplama Araçları.....	24
3.6.1. Hücre kültürü.....	24
3.6.1.1. İki boyutlu hücre kültürü	25
3.6.1.2. Üç boyutlu hücre kültürü	25
3.6.2. Üç boyutlu yapının gösterilmesi	26
3.6.3. MDR1 gen ekspresyonunun arttırılması.....	27
3.6.3. Real time PCR ile MDR1 gen ekspresyonunun ölçümü	27
3.6.4. Doz tayini.....	30
3.6.4.1. WST-1 ile canlılık analizi	30
3.6.4.2. xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi sistemi ile canlılık analizi	31
3.6.5. İki boyutlu hücre kültüründe WST-1 ile sitotoksosite ölçümü	32
3.6.6. Üç boyutlu hücre kültüründe WST-1 ile sitotoksosite ölçümü.....	32

3.6.7. Akım sitometri ile apoptoz analizi	33
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi.....	34
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	35
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	35
3.10. Etik Kurul Onayı	35
4.BULGULAR	35
4.1. Dediferansiye Kondrosarkom Hücrelerinin Çoğaltılması	35
4.2. Üç boyutlu yapının gösterilmesi.....	36
4.3. Uygun doz aralığının tayin edilmesi.....	37
4.4. MDR1 gen ekspresyon artışının gösterilmesi.....	39
4.4.1. Real-time PCR Özgüllüğü: Erime Eğrisi Analizi ve Agaroz jel Elektroforezi Sonuçları	39
4.4.2. Standart Eğrilerin Oluşturulması	40
4.4.3. MDR1 ekspresyon düzeyleri	40
4.5. MDR-1 ekspresyonu aracılı direncin iki boyutlu kültürde gösterilmesi	41
4.6. MDR-1 ekspresyonu aracılı direncin üç boyutlu kültürde gösterilmesi.....	43
4.7. Üç boyutlu yapının ilaç etkinliği üzerine etkisi.....	45
4.8. Apoptoz Analizi.....	47
5.TARTIŞMA.....	49
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	53
7.KAYNAKLAR	54
8.EKLER	58
8.1. Etik Kurul Onayı	58
8.2. Özgeçmiş	61
8.3. Tez Destek Mektubu.....	64

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Kemik tümörleri için evreleme sistemi.	8
Tablo 2. MDR1 ve β -aktin primer dizileri.....	29
Tablo 3. Gerçek Zamanlı PCR Isı Profili	29
Tablo 4. Standart Eğrilerin Oluşturulması ve Etkinlikleri.....	40
Tablo 5. CAL-78 hücre hattında MDR-1 gen ekspresyon artışı aracılı direnç gelişimi sonucu elde edilen CAL-78 (Rifampin) hücre hattında IC50 değerleri.....	41
Tablo 6. CAL-78 hücre hattında, üç boyutlu kültürde MDR-1 gen ekspresyon artışı aracılı direnç gelişimi sonucu elde edilen CAL-78 (Rifampin) hücre hattında IC50 değerleri.	43



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kemik tümörlerinde eksizyon şekilleri.	11
Şekil 2. Berrak hücreli kondrosarkom histolojisi.	12
Şekil 3. Mezenkimal kondrosarkom histolojisi.	13
Şekil 4. Dediferansiye kondrosarkom histolojisi.	14
Şekil 5. Tıpta yaygın olarak kullanılan nanopartiküller.	21
Şekil 6. PEGile lipozomal doksorubisinin yapısı.	23
Şekil 7. Üç boyutlu pellet modelinin oluşturulması.	26
Şekil 8. Rifampin kapsülün deneylere uygun olarak hazırlanması.	27
Şekil 9. Çalışmada kullanılan anti-kanser ilaçlar.	31
Şekil 10. WST-1 ile canlılık analizi.	31
Şekil 11. xCELLigence RTCA sistemi ile canlılık analizi akış şeması.	32
Şekil 12. FITCH Annexin V Apoptoz Kiti.	33
Şekil 13. CAL-78 hücrelerinin JuLI Br canlı hücre görüntüleme sistemi altında görüntüsü ...	36
Şekil 14. Üç boyutlu pelletlerden alınan, hematoksilin eozin ile boyanmış kesitlerin mikroskop altında görüntüsü.	36
Şekil 15. CAL-78 hücre hattında (A) doksorubisin, (B) lipozomal doksorubisin ve (C) sisplatinin doza bağlı sitotoksikite eğrileri.	38
Şekil 16. Erime eğrisi analizi ile MDR1 için elde edilen pikler.	39
Şekil 17. Real-time ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri.	39
Şekil 18. CAL-78 (Rifampin) hücre hattının CAL-78 hücre hattına kıyasla MDR1 ekspresyonu.	41
Şekil 19. İki boyutlu kültürde, CAL-78 ve CAL-78 (Rifampin) hücre hattında, (A)doksorubisin, (B)lipozomal doksorubisin ve (C)sisplatin uygulaması sonrası hücre canlılığı.	42
Şekil 20. Üç boyutlu kültürde, CAL-78 ve MDR1 ekspresyonu arttırılmış CAL-78 (Rifampin) hücre hattında (A)doksorubisin ve (B) lipozomal doksorubisin uygulaması sonrası hücre canlılığı.	44
Şekil 21. İki ve üç boyutlu kültürde, CAL-78 hücre hattında üzerinde (A)doksorubisin ve (B) lipozomal doksorubisin uygulaması sonrası hücre canlılığı.	46

Şekil 22. CAL-78 hücre hattında (A)kontrol ve IC50 dozlarında (B)doksorubisin, (C)lipozomal doksorubisin ve (D)sisplatin uygulanan hücrelerin apoptoz analizi sonuçları...	48
Şekil 23. Hidrofobik ilaçların hücre dışına MDR pompası aracılığıyla atılması.....	50



KISALTMALAR

SEER: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program

MDR: Multi-drug resistance

WHO: World Health Organization

NCCN: National Comprehensive Cancer Network

FDA: Food and Drug Administration

PEG: Polietilen glikol

PXR: Pregnane X receptor

IC50: Inhibitory concentration 50%

CAL-78: Dediferansiye kondrosarkom hücre hattı

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

FBS: Fötal sığır serumu

PBS: Phosphat buffered saline

RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute 1640 kültür ortamı

ml: Mililitre

μ l: Mikrolitre

nM: nanomolar

μ M: Mikromolar

TEŞEKKÜR

Öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum, lisansüstü eğitim hayatım boyunca benden desteğini esirgemeyen değerli hocalarım Prof.Dr. İlhan ÖZTOP ve Doç.Dr.Yasemin BASKIN'a;

Kıymetli öneri ve deneyimlerini paylaşarak yol gösteren saygıdeğer Onkoloji Enstitüsü müdürümüz Prof. Dr. Nur OLGUN'a, Temel Onkoloji Anabilim Dalı'ndaki saygı değer hocalarıma ve Onkoloji Enstitüsü idari personeline;

Tez İzleme Kurulu'nda ve Tez Jürisi'nde bulunarak çok değerli önerilerini paylaşan ve vakitlerini ayıran kıymetli hocalarıma;

Her koşulda yanımda olan annem Kadriye ŞENGÜN, teyzelerim Aysel ve Fatma ŞENGÜN, dayım Yusuf ŞENGÜN ve kız kardeşim Değer ÖZERDEM TEZCAN'a;

Laboratuvarıda çalışmalarımızı birlikte yürüttüğümüz, ekip arkadaşından daha fazlası olan ekürim Tuğba UYSAL'a ve dostlarım Gizem ÇALIBAŞI KOÇAL, Şeniz İNANÇ SÜRER ve Mahdi AKBARPOUR'a;

Bende her zaman hatırı olacak olan Nermin TUNÇSİPER, Nurçin KAYACIK ve Aynur UZUNOVALI'ya;

Temel Onkoloji Yüksek Lisans ve Doktora programlarındaki arkadaşlarıma;

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ece ÇAKIROĞLU

İzmir, Aralık 2016

TRANSLASYONEL BİREYE ÖZGÜ BİR TEDAVİ MODELİ OLARAK
DEDİFERANSİYE KONDROSARKOMLARDA İN VİTRO İLAÇ DİRENCİNİN
NANOPARTİKÜL BAĞLI HEDEFLENMİŞ MOLEKÜLLERLE AŞILMASI

Ece ÇAKIROĞLU

Yazışma adresi: Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim
Dalı, İZMİR

ÖZET

Kondrosarkom, en sık görülen ikinci malign kemik tümörüdür. Alt tipleri arasında en kötü sağkalım oranına sahip olan çeşidi dediferansiye kondrosarkomdur. Kondrosarkomlarda kemoterapi ve radyoterapi direncinin sık görülmesinden dolayı, ana tedavi olarak cerrahi müdahale kullanılmaktadır. Bu direncin nedenleri olarak, ekstraselüler matriksin yoğunluğunun fazla olması, hücre bölünmesinin az olmasından ötürü hücre siklusu hedefli ilaçların az etki göstermesi ile zayıf vaskülerite sonucu ilacın hedef bölgelere ulaşamaması ve çoklu ilaç direnci (multi-drug resistance, MDR) gen ekspresyonunun artmasıyla P-glikoprotein ekspresyonunun artmasından ötürü hidrofobik ilacın hücreden dışarıya atılması gösterilmektedir. Bu direnç, kondrosarkom sağkalım sürelerindeki başarısızlığın temel nedenidir. Bu durum, özellikle en kötü sağkalım oranlarına sahip olan dediferansiye kondrosarkomda, başarısızlık oranlarını arttırmaktadır. Bu çalışmada, MDR1 ekspresyonunun regülatörlerinden biri olan, pregnane X receptor (PXR)'nin güçlü ve spesifik agonisti olduğu bilinen rifampin uygulaması ile MDR1 ekspresyonu artırılarak, MDR1 ekspresyon artışı ilişkili direnç, nanopartikül bağlı ilaç olan lipozomal doksorubisin ile aşılmaya çalışılmıştır. Dediferansiye kondrosarkomda lipozomal doksorubisin kullanımı, doksorubisine oranla daha az olmakla birlikte, hücre çoğalmasını inhibe etmiştir. Aynı zamanda, IC50 dozundan düşük dozlarda bile apoptotik etki gösterilmiştir. Ancak, efflux proteini ekspresyonu artırılarak sağlanan direncin aşılmasında etkin bulunmamıştır. Ayrıca, aynı çalışma üç boyutlu pellet modelinde de uygulanmış ve üç boyutlu yapının iki boyutluya göre daha dirençli olduğu saptanmıştır. Burada, oluşan ilaç direncinin efflux protein ekspresyonundan başka nedenleri de olabileceği gibi; lipozomal taşıyıcıların ortam şartlarına bağlı olarak değişen salınım mekanizmaları da etkin olabilir. Bu açıdan, araştırma modelimizde doksorubisinin farklı nanotaşıyıcılar ile enkapsüle edilerek çalışılması planlanmıştır. Ayrıca, nanopartikül dizaynında

dirence neden olan diğ er faktörlerin de paralel olarak değerlendirildiği kapsamlı bir çalışmanın yapılması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Dediferansiye kondrosarkom,    boyutlu hücre kültürü, doksorubisin direnci, nanopartikül taşıyıcılar



OVERCOMING IN VITRO DRUG RESISTANCE WITH NANOPARTICLE-BOUND TARGETED MOLECULES IN DEDIFFERENTIATED CHONDROSARCOMAS AS A TRANSLATIONAL PERSONALIZED TREATMENT MODEL

ABSTRACT

Chondrosarcoma is the second most recent malignity of bone. Among its subtypes dedifferentiated chondrosarcoma has the worst survival rates. Because of resistance to chemo- and radiotherapy, surgery is the main treatment option in chondrosarcoma. Intense extracellular matrix, slow cell division, poor vascularity and increased activity of multi-drug resistance (MDR) pump have reported as reasons of resistance. This resistance is the main reason of the poor survival rates. Especially, dedifferentiated chondrosarcoma, survival rate of which is the worst increases the failure rates. In this study, we tried to overcome the resistance associated with MDR1 expression by increasing the expression of MDR1 by administration of rifampin, a potent and specific agonist of pregnane X receptor (PXR), one of the regulators of MDR1 expression, with a nanoparticle-bounded drug liposomal doxorubicin. The use of liposomal doxorubicin in the dedifferentiated chondrosarcoma inhibited cell proliferation, however it was less effective than doxorubicin. At the same time, apoptotic effects were shown even at lower doses than the IC₅₀ dose. However, it wasn't found to be effective in increasing resistance acquired with increased expression of efflux protein. Here, as well as the drug resistance may have other causes than efflux protein expression, release mechanisms that vary depending on the ambient conditions of liposomal carriers may also be effective. In this respect, it has been planned in our standardized research model to encapsulate doxorubicin with different nanostructures. In addition, it is recommended to perform a comprehensive study in which other factors causing resistance are evaluated in nanoparticle design.

Keywords: Dedifferentiated chondrosarcoma, tree dimensional cell culture, doxorubicin resistance, nanoparticle carriers

1. GİRİŞ VE AMAC

1.1. Problemin Tanımı Ve Önemi

Kondrosarkom en sık görülen ikinci malign kemik tümörüdür ve kıkırdak matriks üreten hücrelerle karakterize edilir (1). Yıllık tahmini 200000/1 insidansı ile nadir görülen bir tümördür (1,2). Ekstraselüler matriksin yoğunluğu, hücre bölünmesinin kısmen az olması, zayıf vaskülarite ve yüksek P-glikoprotein ekspresyonu nedeniyle sistemik tedavi ve radyoterapi direncine yatkındırlar (3-5), bu yüzden kondrosarkomların çoğunda cerrahi müdahale ana tedavi olarak kullanılmaktadır (1-6).

Konvansiyonel, dediferansiye, mezenkimal ve berrak hücreli olmak üzere çeşitli histolojik kondrosarkom alt tipleri tanımlanmıştır. Bindiganavile S. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, hastalığa özgü sağkalımın histolojik alt tipler arasında önemli oranda değişiklik gösterdiği ve dediferansiye tipin en kötü sağkalım oranına (25 ± 15.3 , 10 yıllık) sahip olduğu gösterilmiştir (7).

Dediferansiye kondrosarkom tüm kondrosarkomların %9-10'unu (7) tüm primer kemik tümörlerinin ise %1-2'sini oluşturur (8). Düşük derece kondrosarkom ve yüksek derece dediferansiye bileşen olmak üzere iki bileşenden oluşur. Kötü prognozu olan, yüksek oranda malign bir tümördür. Birincil tedavi seçeneği cerrahidir, kemoterapi bazı hastalarda yararlı olabilir. Eksizyon yapılan hastalarda lokal nüks görülme oranı %50'ye kadar çıkabilir; ancak radikal amputasyondan sonra lokal hastalıkta daha iyi kontrol sağlanır. Metastatik nüks sık görülür. Medyan sağkalım yaklaşık altı aydır ve beş yıllık sağkalım oranları %10-13'tür. Hastalar nadiren iki yıldan fazla yaşamaktadır (9,10). Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) veri tabanı çalışmasına göre son 30 yılda kondrosarkom sağkalımında önemli bir gelişme olmamıştır. Birçok çalışmada da vurgulandığı gibi kondrosarkom tedavisinde, özellikle rezeke edilemeyen ve/veya metastatik hastalıkta sistemik bir tedaviye ihtiyaç vardır.

1.2. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, dediferansiye kondrosarkomlarda iki ve üç boyutlu in vitro modelde, P-glikoproteini ilişkili ekspresyona bağlı ilaç direncinin gelişimini gözlemlemek ve rolünü araştırmak; bir moleküler özelliğe bağlı gelişen ilaç direncinin aşılmasında nanopartikül ile hedeflenmiş ilacın performansını gözlemlemek ve araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Tümörleri

2.1.1. Epidemiyoloji

Primer kemik tümörlerinin büyük çoğunluğu iyi huyludur ve çoğu semptomatik olmamasından dolayı fark edilmez veya başka sebeplerden dolayı yapılan radyografi muayenelerinde tesadüfen saptanır. Bu nedenle benign kemik tümörlerinin gerçek insidansının belirlenmesi zor olmuştur. Bununla birlikte, primer kemik malignitelerinin görülme sıklığı, çeşitli ulusal kanser kayıt listelerinde oldukça iyi belgelenmiştir (11).

Kemik sarkomları, ABD’de tanı alan malignitelerin %0,9’unu oluşturmaktadır. “SEER Cancer Statistics Review of the National Cancer Institute” analizine göre, 2016 yılında 3300 kişinin (1850 erkek, 1450 kadın) kemik ve ekstremitte kanseri tanısı alacağı ve 1490 (860 erkek, 630 kadın) kişinin bu yüzden öleceği tahmin edilmiştir. 2006-2012 yılları için beş yıllık relatif sağkalım %69 olarak saptanmıştır. Kemik sarkomlarının yaşa spesifik insidansları bimodal dağılım göstermektedir. Hayatın ikinci on yılında ve 60 yaş üstü hastalarda olmak üzere iki pik görülmektedir. Bu durum, ana histolojik alt tiplerin farklı yaş dağılımına bağlıdır. Ewing sarkom ve osteosarkom hayatın ikinci on yılında en sık görülen histolojik alt tiplerken kondrosarkom, malign fibröz fibroma, kordoma ve sekonder osteosarkomun dördüncü 10 yıldan sonra insidansı artmaktadır. SEER verilerine göre, 2009-2013 yılları arasında kemik ve eklem kanserlerinin tanı yaşı ortalaması 43’tür (12).

2.1.2. Etiyoloji

Primer kemik malignitelerinin çoğu de novo ortaya çıkmasına rağmen, bazılarının belli öncü lezyonlardan geliştiği de bilinmektedir. Bunların bazıları malign transformasyona yatkın, neoplastik olmayan lezyonlardır. Diğerleri ise, malign neoplastik bir sürecin kaynağı olabilen benign neoplazilerdir. Paget hastalığı, radyasyon tedavisi ve kırıkta displazileri kemik kanseri gelişimine neden olduğu bilinen pre-kanseröz durumlardan bazılarıdır. Primer malign kemik tümörü gelişim riski bazı durumlara göre değişmektedir. Yüksek risk taşıyan öncü durumlar Ollier hastalığı, Maffucci sendromu, ailesel retinablastom sendromu ve Rothmund Thompson sendromu iken; multiple osteokondrom, Paget hastalığı ve radyasyon osteiti orta derece risk taşır. Fibröz displazi, kemik infarktı, kronik osteomyelit, protez

implantları, osteogenesis imperfecta, dev hücreli tümör, osteoblastom ve kondroblastom ise düşük risk taşıyan durumlardır (13).

2.1.3. Klinik özellikler

Kemik tümörlerinin klinik özellikleri spesifik değildir, bu nedenle tümör teşhis edilene kadar uzun bir süre geçebilir. Ağrı, şişkinlik ve genel rahatsızlık kemik tümörlerinin teşhisini sağlayan temel semptomlardır. Bununla birlikte, hareketin sınırlanması ve spontan kırıklar da önemli semptomlar olabilir (14).

2.1.4. Tanı

Klinik bulgular ve görüntüleme çalışmaları ile belirli bir tanıya ulaşılabilsede, kemik tümörlerinin kesin tanısında morfolojik bulgular temel oluşturur. Primer kemik malignitelerinin nihai tanısında klinik, laboratuvar ve görüntüleme bulgularının uygun şekilde entegre edilmesi gerekmektedir. Bununla birlikte, immünohistokimyasal karakterizasyon, metastatik kemik hastalıklarının sınıflandırılmasında (primer alanların belirlenememesi durumunda), lenfematolojik malignitelerin ve özellikle Ewing sarkomu gibi küçük yuvarlak hücreli malignitelerin alt sınıflandırılmasında özel önem taşımaktadır.

Çeşitli kemik tümörlerinin genetik karakterizasyonu, doğalarının ve patogenetik mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmuş ve ayrıca morfolojiye dayalı sınıflandırmalar için destek sağlamıştır. Bunun en iyi örnekleri, osteokondrom, osteokondromatozis ve sekonder kondrosarkom gelişiminde EXT-1 ve 2 genlerinin rolünün tanımlanması ve anevrizmal kemik kistlerinde, 16-17 translokasyonun yol açtığı ve lezyonların muhtemelen neoplastik yapıda olduğunu gösteren CDH11-USP6 füzyon geninin tanımlanmasıdır (11).

2.1.5. Evreleme ve Derecelendirme

2.1.5.1. Derecelendirme

Kemik tümörlerinde hücresellik, diğer bir deyişle matrikse kıyasla hücrelerin nispi miktarı ve tümör hücrelerinin nükleer özellikleri sınıflandırma için kullanılan en önemli kriterlerdir. Genellikle, derecesi ne kadar yüksekse, tümör daha hücresel olur. Çekirdeklerin düzensizliği, genişlemesi ve hiperkromasi derecelendirme ile korelasyon gösterir. Mitotik

şekiller ve nekroz da derecelendirmede kullanışlı özelliklerdir. Birçok çalışma, histolojik derecelendirmenin kondrosarkom ve malign vasküler tümörlerdeki prognoz ile korele olduğunu göstermiştir.

2.1.5.2. Evreleme

Kemik tümörlerinde, evreleme, hastanın prognozunu tahmin etmek için farklılaşma derecesi ile lokal ve uzak yayılımı bir arada değerlendirir. Çoğu karsinom için kullanılan evrensel TNM evreleme sistemi, sarkomların lenf nodlarına metastazı nadir görüldüğünden sarkomlarda yaygın olarak kullanılmaz. Bu sebeple, ilk kez Enneking ve ark. tarafından tanımlanan ve kas-iskelet sistemi topluluğu tarafından benimsenen özel evreleme sistemi kabul görmüştür. Benign lezyonlar Arapça rakamlarla, malign lezyonlar ise Roma rakamlarıyla sınıflandırılmıştır. Evre bir benign lezyonlar, intrakapsüler eksizyon sonrasında ihmal edilebilir nüks oranı olan latent lezyonlardır. Evre iki benign lezyonlar, intrakapsüler prosedürlerden sonra anlamlı rekürrens oranı ile aktif olarak büyümekte ancak marjinal en-blok eksizyondan sonra ihmal edilebilir tekrarlama oranı göstermektedir. Üçüncü evre benign lezyonlar lokal olarak agresiftir ve intrakapsüler ya da marjinal prosedürlerden sonra rekürrens oranı yüksektir.

Malign lezyonlar için cerrahi evreleme cerrahi derecenin (G), lokal boyutun (T) ve bölgesel veya uzak metastazların varlığı veya yokluğunun (M) değerlendirilmesiyle yapılır. Herhangi bir neoplazi iki sınıfa ayrılabilir; Düşük (G1) ve yüksek (G2). Genelde, düşük dereceli lezyonlar Broders derece bir ve ikiye karşılık gelir ve metastaz riski %25'den azdır. Yüksek dereceli lezyonlar (Broders sınıf üç ve derece dört) lokal nüks riski yüksektir ve uzak yayılım riski %25'den fazladır. Metastaz varlığı veya yokluğu (M), hem prognoz hem de cerrahi planlama ile ilgili üçüncü önemli faktördür (Tablo 1) (14).

Tablo 1. Kemik tümörleri için evreleme sistemi.

Primer tümör (T)	TX: primer tümör saptanamadı T0: primer tümöre dair kanıt yok T1: tümör <8 cm T2: tümör >8 cm T3: primer kemik bölgesinde aralıklı tümörler
Bölgesel lenf nodu (N)	NX: bölgesel lenf nodu saptanamadı N0: bölgesel lenf nodu metastazı yok N1: bölgesel lenf nodu metastazı
Uzak metastaz (M)	MX: uzak metastaz saptanamadı M0: uzak metastaz yok M1: uzak metastaz M1a: akciğer M1b: diğer uzak bölge

Düşük derece	Grade 1
Yüksek derece	Grade 2 Grade 3

Evre IA	T1	N0, NX	M0	Düşük derece
Evre IB	T2	N0, NX	M0	Düşük derece
Evre IIA	T1	N0, NX	M0	Yüksek derece
Evre IIB	T2	N0, NX	M0	Yüksek derece
Evre III	T3	N0, NX	M0	Herhangi bir derece
Evre IVA	T	N0, NX	M1a	Herhangi bir derece
Evre IVB	T	N1	M	Herhangi bir derece
		N	M1b	Herhangi bir derece

2.1.6. Histolojik Sınıflandırma

Kemik tümörleri neoplastik hücrelerin farklılaşma durumuna ve normal eşlenikleriyle benzerliklerine göre sınıflandırılır. Bu kriterler kıkırdak oluşturan veya kemik oluşturan tümörlere kolayca uygulanabilirken, Ewing sarkom gibi normal bir dokuyla eşleştirilebilecek ayırt edici bir farklılaşmadan yoksun olan tümörlere uygulanamaz. Sınıflandırmada zorluğa neden olan bir diğer husus da mezenkimal tümörlerin orijin hücrelerinin bilinmemesidir. Çoğunlukla çok aşamalı bir karsinogenez süreci geçiren epitelyal tümörlerin aksine, mezenkimal tümörlerin öncü lezyonları tanımlanmamıştır. Sarkom oluşumunun, mezenkimal kök hücreleri etkileyen moleküler değişikliklerle ortaya çıktığı ve sonuçta belirli bir fenotipe neden olan neoplastik bir farklılaşma programının olduğu düşünülmektedir. Bu yüzden, mevcut Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) sınıflandırması primer kemik tümörlerinin sınıflandırılmasında histogenezis ve tümörün köken hücresi kavramlarını terk ederek morfoloji, fenotip ve genotipi içeren parametrelerin bir kombinasyonuna odaklanmıştır.

Primer benign ve malign kemik tümörleri kıkırdak, osteojenik, fibrojenik, fibrohistiyositik, hematopoietik, dev hücreli, notokordal, düz kas, vasküler, lipojenik ve nöral tümörler, Ewing sarkomu, primitif nöroektodermal tümör, karışık tümör ve lezyonlar ve eklem lezyonları olmak üzere 15 farklı kategoride sınıflandırılmıştır (13).

2.2. Kondrosarkom

Kondrosarkom, ikinci en sık görülen primer kemik sarkomu olmakla birlikte (15) erişkin yaşta en sık görülen kemik sarkomudur (16). Yıllık tahmini 200000/1 insidansı ile nadir görülen bir tümördür (1).

Çoğu kondrosarkom primer malign tümörler olarak ortaya çıkar. Çoğunluk düşük dereceli, lokal agresif, metastaz yapmayan tümörlerdir (derece bir), yüksek derece kondrosarkom (derece iki-üç) daha az görülür. Derece bir kondrosarkomlar atipik kondrojenik olarak değerlendirilebilir ve genellikle metastaz yapmazlar. Çoğu kondrosarkom merkezi, metafizyal uzun kemik bölgelerinde ortaya çıkar; ancak pelvis, kaburga ve skapula gibi düz kemiklerde de gelişebilirler. Yüksek dereceli kondrosarkomlar sıklıkla aksiyal iskelet ve uzun kemiklerde ortaya çıkar. Kondrosarkom, önceden var olan benign lezyonlarda (enkondrom ve osteokondrom gibi) ortaya çıkabilir. Bu koşullar altında sırasıyla sekonder olarak adlandırılırlar. Kondrosarkomların çoğunluğu konvansiyonel alt tiptir, ancak nadir alt tipler

arasında mezenkimal ve berrak hücreli kondrosarkom bulunur. Nadir durumlarda, konvansiyonel kondrosarkomlar, dediferansiye kondrosarkom olarak adlandırılan, kötü prognoza sahip çok yüksek dereceli bir tümöre dediferansiye olabilir (16).

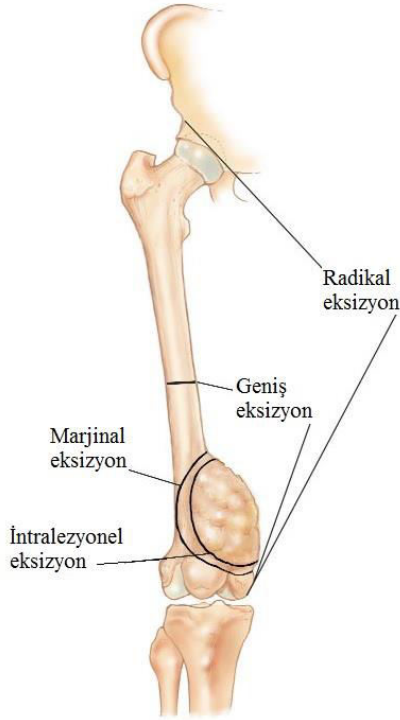
Yaş, cinsiyet, tümör yerleşimi ve boyutu, cerrahi evre ve sınırlar, lokal rekürrens ve derece, tümör nekrozu, mitotik sayı ve miksoid matriks gibi çeşitli histolojik parametreler kondrosarkomlu hastaların sağkalımı, rekürrensi ve metastazı ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, çok değişkenli analizlerde derece, evre, yerleşim ve cerrahi sınır önemli prognostik faktörlerdir (17).

Kemoterapi kondrosarkomlarda, özellikle en yaygın tip olan konvansiyonel ve berrak hücreli kondrosarkomlarda etkili değildir. Kemoterapi direncinin muhtemel açıklaması yavaş büyüme, MDR1 gen ekspresyonunun artması, ekstraselüler matriksin yoğun olması ve zayıf vaskülarite nedeniyle kemoterapötik ilaçların tümör dokusuna erişiminin sınırlı olmasıdır. Dediferansiye kondrosarkom için adjuvan kemoterapinin rolü henüz net değildir. Mezenkimal kondrosarkomda ise doksorubisin tabanlı kemoterapi kombinasyonu metastatik hastalığın hafifletilmesinde kullanılmaktadır.

Kondrojenik tümörler nispeten radyasyon dirençli kabul edilir. Bu durumun olası bir açıklaması tümör büyümesinin yavaş olmasıdır. Bazı araştırmalar, hücre döngüsünü düzenleyen başlıca tümör baskılayıcı proteinlerinden bir tanesi olan p16'nın kondrosarkom hücrelerinde radyasyon direncinde rol oynayabileceğini göstermiştir. Radyasyon tedavisi, inkomplet rezeksiyon sonrasında maksimal lokal kontrolü sağlamak için ve rezeksiyon mümkün değilse (örn; kafatası tümörü) veya morbiditeye neden olabilecekse düşünülebilir.

Kemoterapi ve radyasyon tedavisinin rolü sınırlı olduğundan kondrosarkomlar cerrahi bir hastalıktır. Özellikle yüksek dereceli (derece iki ve üç) kondrosarkomlar için en iyi tedavi seçeneği rezeksiyondur. Düşük dereceli (derece bir) kondrosarkomlar için lokal cerrahiyle sağlanabilen düşük metastatik potansiyel ve düşük lokal rekürrens oranı nedeniyle, bu tümörlerde geniş rezeksiyondan uzak durulabilmektedir. Bu vakalarda tedavi, tümörün sınırlarını çevreleyen kemik dokusuyla birlikte kürtajıyla sağlanır. Kemik defekti daha sonra allogreft veya otolog kemik grefti veya polimetilmetakrilat ile rekonstrükte edilebilir. Tümör boşluğunun sıvı azot veya diğer dondurucu yöntemlerle adjuvan kriyocerrahisi, düşük dereceli kondrosarkomlu hastalarda lokal rekürrens oranını düşürebilir, ancak kemiğin kırılması ve çevresindeki nörolojik yapıların hasarlanması gibi komplikasyonları artırır. Agresif radyolojik bulguları (örneğin; yumuşak doku kitlesi, kortikal yıkım veya uzun kemiğin genişlemesi),

büyük tümör boyutu olan ve intraartiküler veya pelvik bölgelerde görülen düşük dereceli kondrosarkomlar için ise geniş rezeksiyon tercih edilen tedavi olmaya devam etmektedir (17).



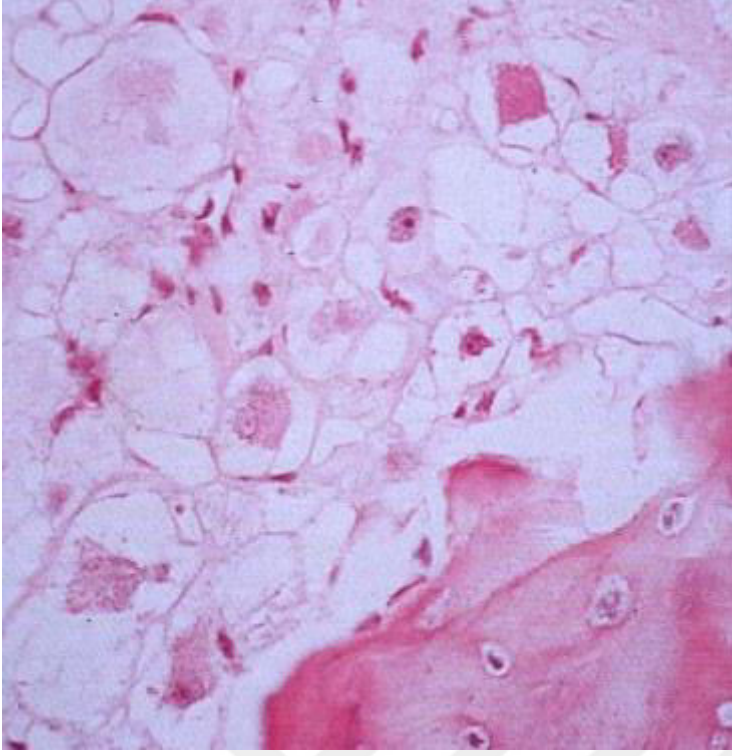
Şekil 1. Kemik tümörlerinde eksizyon şekilleri.

2.2.1. Berrak Hücreli Kondrosarkom

Berrak hücreli kondrosarkom çoğunlukla uzun kemiklerin epifizyal uçlarında görülen nadir, düşük dereceli bir kondrosarkom varyantıdır. Hiyalin kıkırdığa ek olarak histolojik olarak yumuşak saydam hücreler tarafından karakterize edilir (14).

Berrak hücreli kondrosarkom, kıkırdak tümörlerinin yaklaşık %1-2'sini oluşturur. Erkeklerde görülme olasılığı kadınların neredeyse iki katıdır (6). Kafatası, omurga, eller ve ayaklar da dahil olmak üzere iskeletteki birçok kemikte berrak hücreli kondrosarkom görüldüğü bildirilmiştir. Bununla birlikte lezyonların yaklaşık üçte ikisi humerus başı veya femur başında görülür.

Esas olarak yuvarlak, geniş, çekirdeği merkezi konumda, berrak sitoplazma ve belirgin sitoplazmik membranlara sahip lobüler hücre grubundan oluşur. Bazı hücreler soluk pembe bir sitoplazmaya sahiptir (Şekil 2).

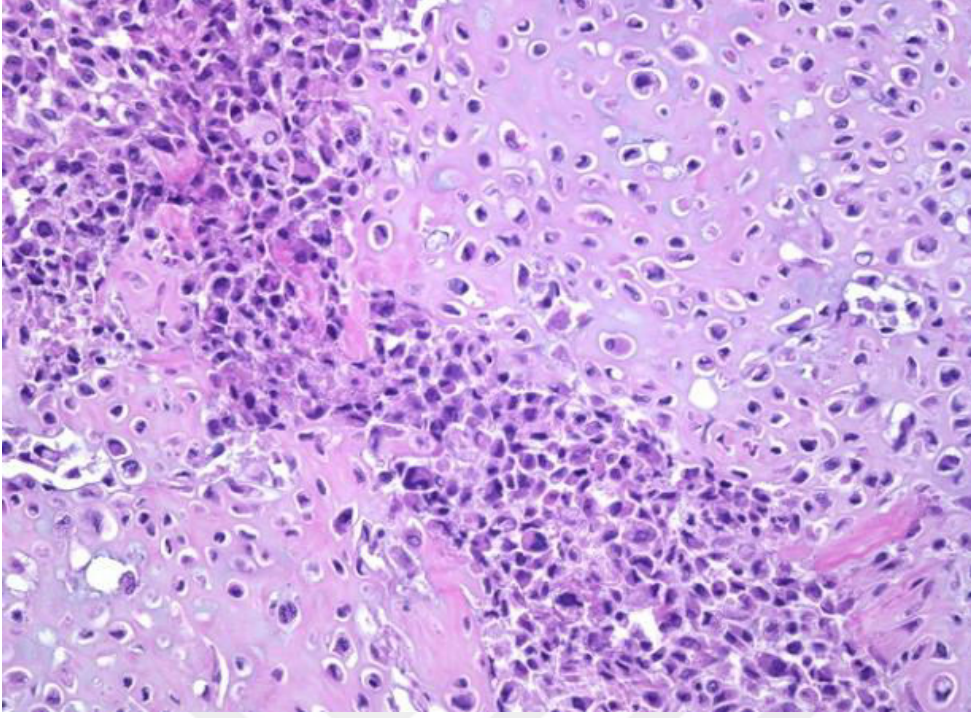


Şekil 2. Berrak hücreli kondrosarkom histolojisi.

Belirgin sınırlı en blok eksizyon ile genellikle iyileşme sağlanır. Bununla birlikte, marjinal eksizyon veya küretaj %86 tekrarlama oranı ile kabul edilemez sonuçlar vermektedir. Tümörün tamamen çıkarılmadığı bu vakalarda, genellikle akciğerlere ve diğer iskelet bölgelerine metastaz gelişebilir ve bu vakalarda genel mortalite oranı %15'tir (14).

2.2.2. Mezenkimal Kondrosarkom

Mezenkimal kondrosarkom, farklılaşmamış, küçük yuvarlak hücre adalarından ve iyi derecede farklılaşma gösteren hiyalin kıkırdaktan oluşan bimorfik bir yapı ile karakterize edilen, nadir görülen malign bir tümördür. Tüm primer kondrosarkomların %3-10'unu oluşturur. Kraniofasial kemikler (özellikle çene kemikleri), kaburgalar, iliyum ve omurlar en yaygın görüldüğü bölgelerdir (14). Farklılaşmamış, küçük yuvarlak hücrelerle karışık hiyalin kıkırdak bölgelerinden oluşan iki fazlı görünüm vardır (Şekil 3). Kıkırdak miktarı oldukça değişkendir. (14,17).

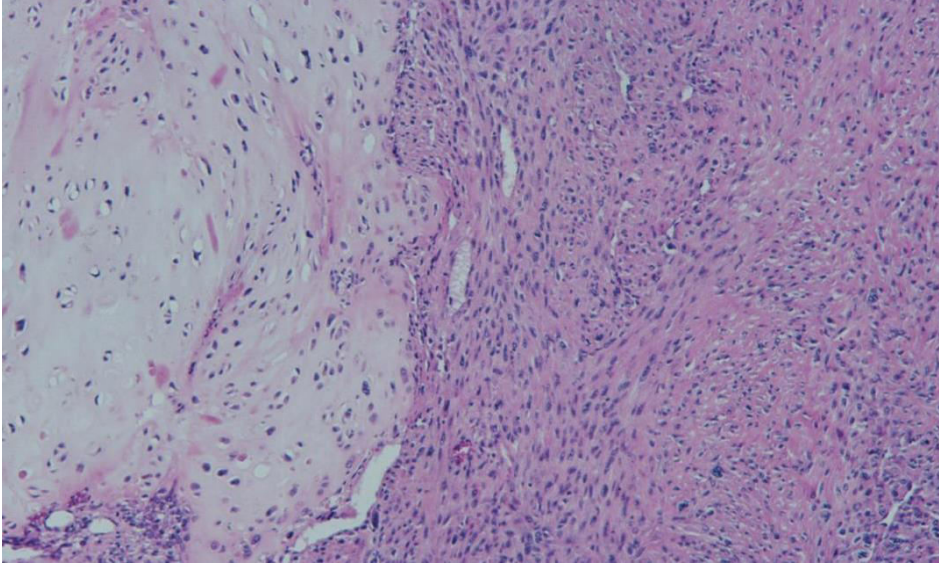


Şekil 3. Mezenkimal kondrosarkom histolojisi.

Mezenkimal kondrosarkom, lokal rekürens ve uzak metastaz yönünde güçlü bir eğilime sahip, 20 yıldan sonra bile nüks görülebilen, oldukça malign bir tümördür. Klinik seyir sıklıkla uzun ve kötüdür (14). Yakın zamanda elde edilen kanıtlar, mezenkimal kondrosarkomun kemoterapiye duyarlı olabileceğini ve adjuvan veya neoadjuvan tedavi kullanımının faydalı olabileceğini ileri sürmektedir (4,17).

2.2.3. Dediferansiye Kondrosarkom

Dediferansiye kondrosarkom, en malign primer kemik tümörlerinden biridir ve iki farklı histopatolojik bileşen ile karakterize edilir: iyi derecede benign kıkırdak lezyonu veya kondrosarkom (düşük, orta veya yüksek dereceli) ve yüksek dereceli, kıkırdak yapıda olmayan bileşen (Şekil 4). Genellikle iki doku türü arasında ani bir sınır geçişi vardır. Kondroid olmayan bileşen genellikle bir osteosarkom, fibrosarkom veya malign fibröz histiositomdur. Leiomyosarkom, dev hücreli tümör ve nadiren berrak hücreli kondrosarkom veya rabdomiyosarkoma dediferansiyasyon da görülebilmektedir (18).



Şekil 4. Dediferansiye kondrosarkom histolojisi.

2.2.3.1. *Epidemiyoloji*

Dediferansiye kondrosarkom tüm kondrosarkomların %9-10'unu (7, 14) ve tüm primer kemik tümörlerinin ise %1-2'sini oluşturur (8). Dediferansiye kondrosarkomlar sıklıkla yaşamın beşinci ve altıncı on yıllarında ortaya çıkarlar ve bu dağılım ikinci ile sekizinci on yıllar arasında değişir. Erkeklerde görülme oranları kadınlara göre 1:1 ile 3:2 arasında değişmektedir.

Anatomik olarak, femur, pelvis ve humerus dediferansiye kondrosarkomların en yaygın görüldüğü bölgelerdir. Küçük tübüler kemik ve ellerde kondrosarkom varlığı çok nadir olduğundan, dediferansiye kondrosarkomlar da nadir görülür. Nadir vakalarda, dediferansiye kondrosarkomlar Ollier hastalığı ve Maffucci sendromu gibi enkondromatozlu hastalarda ve diafizal aklazisi olan hastalarda saptanmıştır.

2.2.3.2. *Patogenezi*

Dediferansiye kondrosarkomun patogenezi belirsizdir. Dahlin ve Beabout, dediferansiyasyonun, iyi diferansiye bir kıkırdak lezyonunun doğrudan dönüşümü sonucu olduğunu ileri sürmektedir. Sanerkin ve Woods'a göre ise dediferansiyasyon, kemik infarktlarında ve kronik osteomyelitte, fibrosarkom gelişimine benzeyen bir süreçle, kıkırdak bileşen sınırında nekrotik alanları çevreleyen yoğun fibrotik reaksiyon içindeki dönüşüm ile ilişkilidir. Diğer araştırmacılar, dediferansiyasyonun iki farklı hücrenin klonundan

kaynaklandığını savunmaktadırlar; biri düşük dereceli kondrosarkoma farklılaşırken diğeri farklılaşmada başarısız olmakta ve yüksek dereceli bir sarkomun özelliklerini yansıtmaktadır.

Son zamanlarda yapılan moleküler çalışmalar ile genetik ve epigenetik araştırmalar, her iki tümör bileşeninin de ortak bazı genetik değişiklikleri olduğunu göstermektedir. İki klon tek bir prekürsörden türetilmekte; ancak iki bileşenin ayrılmasından sonra önemli miktarda genetik değişiklik meydana gelmektedir. Bu durum, bu iki klonun hastalık ilerlemesinin erken evrelerinde ayrıldığını ve daha sonra meydana gelen değişikliklerin yüksek dereceli anaplastik sarkoma dönüşümü tetiklediğini göstermektedir.

2.2.3.3. Klinik görünüm

Klinik semptomlar ağrı, şişlik, belirgin tümör kitleleri ve patolojik kırıklardır. Hastaların yaklaşık üçte birinde patolojik kırık görülürken, beşte birinde tanı sırasında metastaz saptanmaktadır. Birçok durumda tümör, kürtaj sonrasında veya düşük dereceli kondrosarkom olduğu düşünülen lezyonun rezeksiyonu sonrasında tesadüfen teşhis edilir.

2.2.3.4. Teşhis

Radyolojik olarak dediferansiyasyon, altta yatan kıkırdak yapıda bir lezyona ve ekstraosseöz yumuşak doku kitlesi varlığına bağlı olarak, agresif kemik yıkımı alanı şeklinde görünmektedir. Çoğunlukla, radyograflarda kıkırdak matriks mineralizasyonu olduğuna dair herhangi bir kanıt bulunmamaktadır. Bununla birlikte, dediferansiyasyon eğer periferik kondrosarkomun kıkırdak başlığına bağlı olarak ortaya çıkarsa radyolojik açıdan belirlenemeyebilir.

Dediferansiye kondrosarkomun üç radyografik tipi tanımlanmıştır. Tip birde, merkezi kondrosarkom görünümüne ek olarak çok agresif kemik yıkımına sahip bir bölge gözlenir. Tip ikide, lezyonlar benign bir enkondroma benzetmekle birlikte yıkıcı değişiklikler ya da büyük yumuşak doku kitlesi ya da her ikisi birden gözlenir. Tip üçte ise, lezyonlar radyografik olarak ayırıcı değildir ve çok yüksek dereceli, yıkıcı kemik lezyonu olarak görünürler.

Dediferansiye bileşen, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ile, sinyal yoğunluğunun azaldığı osteolitik alan ve bitişiğinde dediferansiyasyon bölgelerine karşılık gelen yoğun kıkırdak bileşeni olarak kolaylıkla tespit edilebilir. Potansiyel dediferansiyasyon

alanlarının MRI ile tanımlanması, en uygun biyopsi alanının seçilmesinde yardımcı olabilir ve böylece doğru teşhis koyulabilir.

Üç ayrı MRI paterni tanımlanmıştır. Birincisinde, iki bölge arasında yüksek ve düşük T2 (sinyalin azalma süresi) ağırlıklı sinyal yoğunluğu ile tanımlanan, açık sınırlarla belirlenmiş ikili bir model bulunur. Bu model tipik olarak tip bir radyolojik lezyon ile ilişkilidir. İkinci modelde, altta yatan bir kıkırdak lezyonunun varlığına dair tek MRI bulgusu, radyografik olarak matriks mineralizasyonuna karşılık gelen, sinyal boşluğu bulunan birden fazla alanının varlığıdır. Bu durum, altta yatan veya rezidüel enkondromların varlığını gösterir ve tip iki radyolojik lezyonla uyumlu bir bulgudur. Üçüncü MRI modelinde ise, lezyonun büyük çoğunluğunda tipik kıkırdak dokusuna kıyasla nispeten daha düşük sinyal yoğunluğu vardır ve MRI’de altta yatan bir kıkırdak bileşeni tanısı yapılamamıştır. Bu durumda, T2 ağırlıklı görüntülerde ana tümör kitlesi içinde daha küçük yoğun alanlar görülebilir. Bunlar muhtemelen kıkırdak dokusundan ziyade tümör nekrozuna karşılık gelir ve tip üç radyolojik lezyon ile korelasyon gösterir.

Dediferansiye kondrosarkomun kesin tanısı her zaman biyopsi ve histolojiye dayanmaktadır. Histolojik değerlendirme yüksek dereceli, mezenkimal, kıkırdak olmayan bir bileşene bitişik olarak düşük dereceli, kondrojenik tümörü (primer) ya da düşük dereceli bir kondrosarkomun rezeksiyonu sonrası lokal nüksü (sekonder) ortaya koyar. Yüksek dereceli bileşenin biyopsisi, dediferansiye tümörlerin teşhisi için gereklidir. Dediferansiye bileşen çok küçük olabilir; bu nedenle, tümörün titizlikle değerlendirilmesi gerekmektedir (18).

2.2.3.5. Tedavi

Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (National Comprehensive Cancer Network, NCCN) kılavuz ilkeleri, dediferansiye kondrosarkomun osteosarkoma benzer bir şekilde tedavi edilmesini önermektedir; ancak kemo- ve radyoterapi direnci nedeniyle daha uzun sağkalım sağlayan bir tedavi henüz belirlenememiştir. Dirence neden olan başlıca etmenler arasında şunlar vardır:

- a) Ekstraselüler matriksin yoğunluğu ve vaskülaritenin zayıf olması: Özellikle kıkırdak kökenli tümörlerde ekstraselüler matriksin çok yoğun olması ve vaskülarizasyonun çok az olması kemoterapötik ajanların tümör dokusunun içine ulaşımı ve etki etmesine engel oluşturmaktadır.

- b) Hücre bölünmesinin yavaş olması: Geleneksel kemoterapi ilaçlarının çoğu aktif olarak bölünen hücreler üzerinde etkili olduğundan, yavaş bölünme özelliğinde olan kıkırdak kökenli hücrelerin bu ilaçlara olan hassasiyeti büyük ölçüde azalmaktadır.
- c) MDR1 gen ekspresyonunun artması: MDR1 geni bir membran transporter proteini olan P-glikoproteinini kodlamaktadır. Bu glikoprotein, hidrofobik kemoterapötik ajanları aktif olarak hücre dışına ileten bir enerji-bağımlı hücre membran proteindir. Bazı çalışmalarda, MDR1 gen ekspresyonunun bazı tümör hücrelerinde mitomycin, vincristine ve doksorubisin gibi ajanlara zayıf yanıtı sorumlu olduğu gösterilmiştir. Wyman JJ ve arkadaşlarının iki kondrosarkom hücre hattı ile yaptığı çalışmada, MDR1 ekspresyonu açısından pozitif olan hücre hattında hücre içi doksorubisin miktarının negatif olana göre anlamlı miktarda az olduğu ve ilaç direncinin anlamlı miktarda fazla olduğu gösterilmiştir (20).

Dediferansiye kondrosarkom hastalarında geniş veya radikal cerrahi rezeksiyon zorunludur. Yüksek doz radyasyon terapisinin rolü ise, cerrahi olarak erişilmesi güç olan bölgelerin tedavisi ve lokal semptomların hafifletilmesi ile sınırlıdır. Genellikle dediferansiye bileşen kemoterapiye duyarlı olduğunda ve hasta genel olarak iyi durumda olduğunda kemoterapi tedaviye eklenir. Sağlık durumu sıklıkla sınırlayıcı bir faktördür, çünkü bu hastalar ortalama 60 yaş üstündedir ve sıklıkla önemli komorbiditelere sahiptir.

Yüksek dereceli kondrosarkomlar (derece iki ve üstü) için en iyi tedavi geniş rezeksiyon veya amputasyondur. Pelvis ve omurga kondrosarkomlarının tedavisi ise, büyük boyutları ve tümörün bitişğinde bulunduğu mesane veya omurilik gibi önemli yapılarla ilişkisi nedeniyle özellikle zor olabilir. Bu hasta grubunda, lezyoniçi veya marjinal rezeksiyon sonrası lokal rekürrens çok yüksektir. Görüntülemeadaki gelişmeler de rezeksiyon sınırlarını veya nihai sonucu iyileştirememiştir. Ekstremitte kurtarma için dikkatle seçilen hastalar ile amputasyon uygulanan hastalar karşılaştırıldığında, lokal tekrarlama oranları ve tedavi sonuçlarında anlamlı bir değişim veya düzelme görülmemektedir (18). Eksizyon yapılan hastalarda lokal nüks görülme oranı %50'ye kadar çıkabilir, özellikle patolojik kırık varlığında lokal rekürrens riski çok yüksektir; ancak radikal amputasyondan sonra lokal hastalıkta daha iyi kontrol sağlanır. Metastatik nüks sık görülür. (9,10,16).

Lokal ve ileri dediferansiye kondrosarkomu olan hastaların metastatik hastalığının kontrolünde kemoterapinin rolü ve yararı tanımlanmamıştır. Bununla birlikte, dediferansiye kondrosarkomun zayıf prognozu göz önüne alındığında, sonucu iyileştirmek için genellikle

cerrahi ile neoadjuvan kemoterapi kombine edilmektedir. Dediferansiye bileşen genellikle kemoterapiye yanıt verdiği bilinen yüksek dereceli iğsi sarkomdur. Bununla birlikte, çoğu çalışmada, rezeksiyon ve patolojik inceleme sırasında bu tümörlerin kemoterapiye cevabının çok zayıf olduğu ve nekroz oranlarının sürekli olarak %90'ın üzerinde olduğu gösterilmiştir.

Yalnızca ameliyatla tedavi edilen ile cerrahi ve kemoterapi kombinasyonu ile tedavi edilen hastalar arasında kötü sağkalım ve genel sağkalımda herhangi bir fark olmadığı kanıtlanmıştır. Dickey ve ark. cerrahi ile tedavi edilen grubun beş yıllık sağkalım oranlarının %11.8, medyan sağkalım süresinin 6.4 ay olduğunu, cerrahi ve kemoterapi kombinasyonu ile tedavi edilen grupta ise beş yıllık sağkalım oranlarının %4, medyan yaşam süresinin 8.4 ay olduğunu saptamıştır. Anatomik lokalizasyon, biyopsi tipi, ekstremité kurtarma, yaş ve cinsiyet bağımsız değişken olarak değerlendirildiğinde anlamlı farklılık saptanmamıştır. Staals ve ark. lezyonların derhal cerrahi olarak çıkarılmasını ve hastalığın metastatik yayılımını önlemek için mümkünse operasyon sonrası kemoterapinin uygulanmasını önermiştir (18).

2.2.3.6. Prognoz

Dediferansiye kondrosarkom, konvansiyonel kondrosarkom ile karşılaştırıldığında farklı bir klinik davranışa sahiptir. Akciğere metastaz sık görülür ve bu durum zayıf prognoza neden olur. Tanıdan metastatik hastalığın başlamasına kadar olan ortalama süre sıfır-dokuz haftadır. Metastazın görüldüğü anatomik bölgeler akciğer (%70-82), iç organ (%20) ve iskelettir (%10). Dediferansiye kondrosarkomda kafatası metastazı bildirilmemiştir. Histolojik olarak, metastazlar sadece yüksek dereceli anaplastik bileşenden oluşur. Metastazların tedavisi için tek tip bir uygulama yoktur ve kısa sürede ölüm meydana gelir. Akciğerlere metastatik yayılım görüldükten sonra tek başına cerrahi veya kemoterapi ile kombine cerrahi ile de tedavi sağlanamaz.

Dediferansiye kondrosarkomlu hastalar için prognostik faktörler belirsizdir. Hastalığın dikkatli biyopsi ile erken lokal bir evrede teşhis edilmesi ve uygun cerrahi tedavi ile sağkalım iyileştirilebilir. Metastatik hastalık, hastanın sağkalımında güçlü bir negatif prediktif faktördür. Pelvisteki tümör yerleşimi de metastaz ve ölüm için bağımsız bir risk faktörü olarak bildirilmiştir. Dediferansiye bileşenin lokal rekürrensi ve histolojisi de metastaz ve ölüm için bağımsız risk faktörleri olarak belirtilmiştir.

Lokal rekürrens oranı, tümör rezeksiyonunun sınırlarına bağlı gibi görünmektedir. Beklendiği gibi, radikal veya geniş rezeksiyon yetersiz rezeksiyona kıyasla daha düşük lokal nüks oranları ile ilişkilidir. Bununla birlikte, lokal tümör kontrolü daha iyi sağkalım oranı ile ilişkilendirilememiştir (18).

2.3. Translasyonel tıp

Laboratuvardan kliniğe kavramına dayanan translasyonel tıbbi araştırmalar, laboratuvar ve klinik araştırma arasındaki engelleri ortadan kaldırmayı amaçlayan bir tıbbi araştırma sınıfıdır ve sıklıkla "bench to bed-side" yani "laboratuvardan kliniğe" olarak adlandırılır. Translasyonel tıp, hastaların klinik uygulamalarına moleküler bakış açısı sağladığından kişiselleştirilmiş tıp veya moleküler tıp ile eşanlamlı olarak kullanılmaktadır (21). Hastalıkların tahmini, önlenmesi, teşhisi ve tedavisini kolaylaştırmayı amaçlayan umut verici laboratuvar bulgularını klinik uygulamalara dönüştürür ve laboratuvar çalışmalarını kullanarak klinik soruları aydınlatır. Yine de, translasyonel tıp tanımı açık ve tutarlı değildir, çünkü translasyonel tıp farklı çalışma gruplarına farklı şeyler ifade etmektedir. Moleküler temelli bilim insanlarına göre, temel ve klinik bilimler arasındaki boşluğu kapatmak, yani temel bilim araştırması yoluyla türetilen bilgileri, laboratuvardan başlayarak hastaların iyileştirilmiş tanı ve tedavisine dönüştürmektir. Sağlık hizmeti veren bilim insanlarına göre ise translasyonel tıp, yeni tedavi seçeneklerinin erişim ve uygulanmasındaki boşluğu kapatmak için bireyler hakkındaki bilgiyi popülasyonlara çevirmek demektir (22). Kanser alanında ise translasyonel kanser araştırması, kanser gelişiminin ve ilerlemesinin altında yatan biyolojik mekanizmalara ve tümörünün moleküler özelliklerine dayanarak uyarlanmış yeni tedavilerin oluşturulması anlamına gelmektedir (23).

Uzun zamandır kanserin heterojen bir hastalık olduğu bilinmektedir; ancak nispeten kısa süre önce, heterojenliğin boyutu anlaşılmaya başlanmıştır. Aynı histolojiye sahip olan tümörler için bile tek bir terapi etkili değildir. Gelişmekte olan çok sayıda kanser ilacına rağmen, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (US Food and Drug Administration, FDA)'nin pazar onayına sunulacak yeni kanser ilaçları çok azdır. Ayrıca, onkolojide, başarılı üçüncü faz klinik çalışmaların oranı, tüm terapötik alanlar arasında en düşük düzeydedir (24). Ancak, son zamanlarda hücresel, klinik öncesi ve klinik araştırmalarda nanotıpın uygulanması, özellikle kanser alanında temelden translasyona kadar uzanan heyecan verici ilerlemelere yol açmıştır.

2.3.1. Nanotıp uygulamaları

Nanoteknoloji ve nanoteknolojinin sağlık ve tıba uygulanması, disiplinlerarası bilim için nispeten yeni bir alandır. Bu alan fizik, kimya, mühendislik, biyoloji ve tıp bilimi gibi bilimsel disiplinlerin geniş bir yelpazesini içerir. Nanotıp terimi 1990'ların sonlarında görülmeye başlansa da ilk kez 2000 yılında araştırma yayınlarında ortaya çıkmıştır. Nanotıp, sağlık hizmetleri üzerinde hızlı ve geniş bir etki yapmıştır (25).

Bu alanın en önemli bileşenlerinden biri olan kanser nanotıbbı fizik, kimya, kanser araştırması ve klinik uygulama gibi farklı bilim dallarını kapsamaktadır. Kanser nanoilaçları, genel olarak mevcut olan kemoterapötik ajanların terapötik etkinliğini nano ölçekli bir aktarım bileşeni ile birleştirerek geliştirmeyi amaçlayan, nanotaşıyıcı, nanoterapötik veya nanoilaç olarak da adlandırılan minyatür dağıtım sistemleri olarak tasarlanmıştır. Onkolojide nanomalzemelerin potansiyel kullanım alanları teşhis, tedavi, tıbbi cihazlar ve kişiselleştirilmiş tıp için terapötik üretimidir. Örneğin; nanomalzemelerin kullanılması, tanısal bir probun hedefe spesifikliğini ve/veya doku penetrasyonunu artırabilir, böylece malignitenin daha erken tespit edilmesini sağlar. Benzer şekilde, nanoteknolojiden teranostik olarak, terapötiklerin hedeflenen iletiminin gerçek zamanlı izlenmesine olanak tanıyan çok fonksiyonlu klinik ürünlerin geliştirilmesinde de yararlanmaktadır.

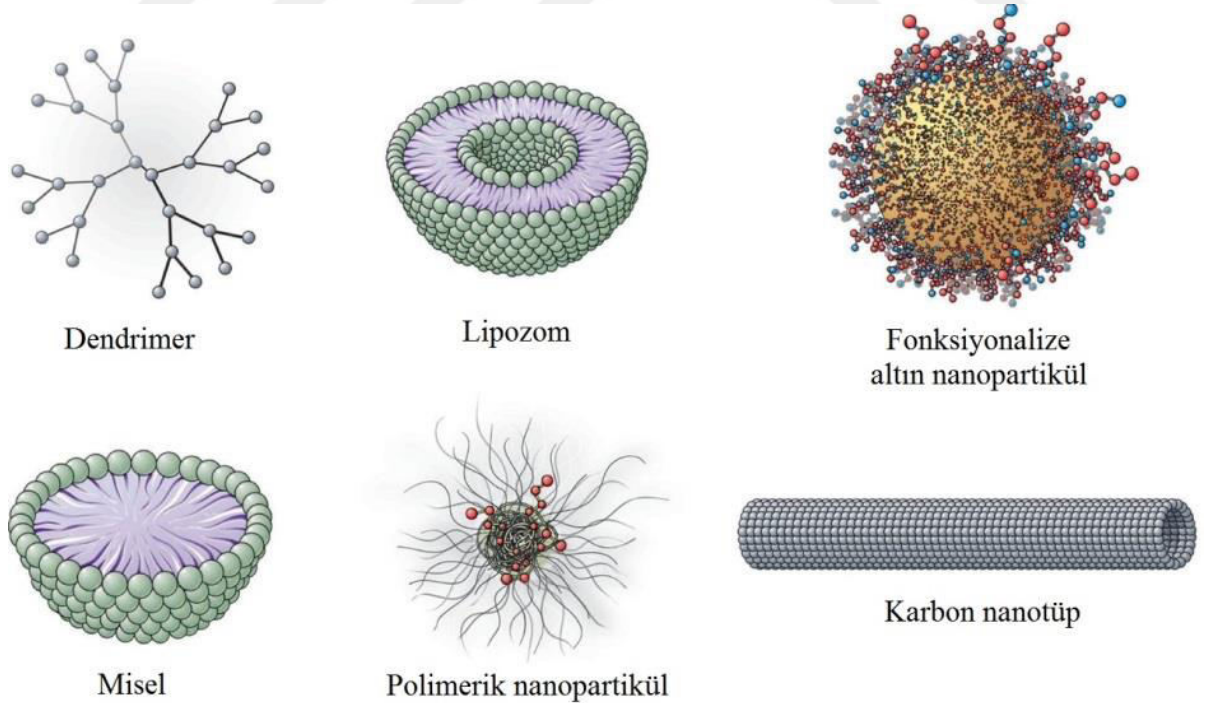
Nanomalzemelerin onkolojide en sık kullanılan uygulamalarından biri, nanoölçekli partikülün özelliklerinden yararlanarak anti-kanser ilaçlarının biyoyararlanım, güvenlik ve özgünlük açısından performansını arttırmaktır. Kemoterapötik ilaçlar fiziksel bağlanma, kovalent olmayan etkileşimler veya nanomateryal yüzeyine kovalent bağlanma yoluyla nanomalzemelere yüklenebilir. Nanomalzemelerin ayarlanabilir boyutu, şekli ve yüzey özellikleri, biyomalzemelerde yüksek kararlılık, çözünürlük ve uyumluluk sağlayarak piyasada bulunan kemoterapötik ajanların etkinliğini arttırabilir. Nanomalzemelerin boyut ve yüzey özelliklerinin doğrudan bir sonucu olarak ilacın doku penetrasyonu artar. Ayrıca nanomalzemelerin yüzeylerinin biyolojik hedefleme molekülleri ile işlevselleştirilmesi nispeten kolaydır. Bu durum, kemoterapötiklerin malign dokuya spesifik olarak verilmesine ve böylece sağlıklı dokuda toksisitenin düşürülmesine olanak sağlar. Bu tür nanotaşıyıcıların kullanımı ile ilaç dozları artırılıp yan etkileri azaltılabilmektedir (26).

Erken tümör evrelerinde cerrahi rezeksiyon çoğu solid malignitenin başlıca terapötik seçeneği olmakla birlikte, yüksek oranda görülen tümör rekürrensi nedeniyle terapötik fayda genellikle düşüktür. Kemoterapi ve son zamanlarda moleküler terapinin, kanser tanısı konan

hastalar için çok daha etkili terapötik yaklaşımlar sunduğu ispatlanmıştır. Bununla birlikte, bu seçeneklerde çoğunlukla aktif ajan ile ilişkili önemli sistemik yan etkiler görülür ve bu durum, direkt hedeflemeyi en zararsız ve etkili tedavi seçeneği haline getirir. Kemoterapi ilaçlarının doğrudan verilmesi, sistemik toksisite riskini en aza indirgeyerek sitostatik ajanların hedef bölgede yüksek konsantrasyonda birikimini sağlar.

Bununla birlikte, kanser çoğunlukla çoklu ilaç direnci ile karakterizedir ve bu nedenle bilim adamları MDR hücrelerini hedef alan yeni yollar geliştirmiştir. MDR hücreleri sıklıkla herhangi bir kan kaynağından uzaktaki hipoksik alanlarda bulunur ve böylece ilaç akışı pompası aktivitesinin doğal bariyerine dirençli hale gelirler. Nanotaşıyıcılar ilacı membrana bağlı P-glikoproteinlerden uzakta, çekirdeğin yakınında serbest bırakarak bu hücrelerde ilacın biyoyararlanımını artırabilir ve aktif bir maddeyi düşük terapötik bir adaydan etkili bir ilaca dönüştürebilir (27).

Kanser tedavisi için tasarlanmış nanomalzemeler miseller, lipozomlar, dendrimerler, inorganik nanopartiküller, karbon nanopartiküller ve nanotüpler, nanoelmaslar, nanoemülsiyonlar, viral nanotaşıyıcılar, polimerik veya peptit nanoparçacıkları ve katı lipid nanopartikülleri şeklinde çeşitlilik gösterir (Şekil 5). Bu yapılar kendiliğinden bir araya gelebilir veya çok bileşenli ve çok fonksiyonlu sistemlerle doğrudan sentezlenebilirler (26).



Şekil 5. Tıpta yaygın olarak kullanılan nanopartiküller.

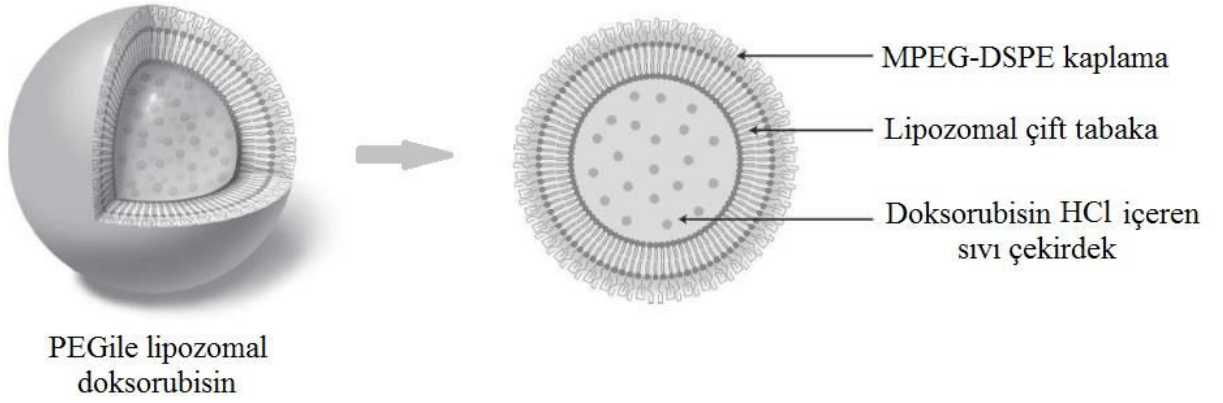
2.3.1.1. Lipozomlar

Nanotıp uygulamaları için geliştirilen çeşitli nanomalzemeler arasında, kanser tedavisi sırasında intravenöz uygulama için onaylanmış nanoterapötiklerin çoğunluğunu lipozomlar ve polimer esaslı nanoformülasyonlar oluşturmaktadır. Lipozomların ilaç taşıma araçları olarak birçok olumlu özelliği vardır. Birincisi, hem hidrofobik hem de hidrofilik molekülleri taşıyabilirler. Lipozomların çekirdek kısımları hidrofilik terapötikleri kapsüllemek için kullanılabilecek şekilde hidrofiliktir. Lipozomun lipid tabakaları arasında hidrofobik moleküllerin iletimi için kullanılabilen bir hidrofobik alan da vardır. İkincisi, lipozomal taşıyım, terapötik yükün biyolojik dağılımını ve farmakokinetiğini değiştirir. Bu tür etkiler, toksisiteyi azaltmanın yanı sıra terapötik etkinliği de artırabilir. Üçüncü olarak, lipozomlar terapötik yüklerini, terapötiklerin kararlılığını artırabilen in vivo ortamdan koruyabilirler. Son olarak, gen terapisi ajanları gibi lizozomal yolağı önlemeye ihtiyaç duyan terapötikler için, lipozomlar lizozomlardan kaçmak ve yüklerini sitosol içerisine aktarmak üzere tasarlanabilir (25).

2.3.1.1.1. Lipozomal doksorubisin

En iyi bilinen lipozomal formülasyonlar arasında, 1995 yılında Kaposi sarkomunun tedavisi için FDA onayını alan ilk nanoilaç olan lipozomal doksorubisin vardır (26). antrasiklin sınıfının bir üyesi olan anti-kanser ilacı doksorubisin, iki katmanlı bir lipid küresinde kapsülendir. Bu vezikül daha sonra yoğun bir polietilen glikol (PEG) tabakası ile kaplanır (Şekil 6). Lipozomların boyutu yaklaşık 100 nm'dir ve bu sayede hem ilacın kalp ve gastrointestinal sistem gibi dar kılcal bağlantılara sahip dokulara girmeleri engellenir hem de lipozomun tümör dokusunda seçici olarak birikimi sağlanır. Normal damarların aksine, tümör damarları dolambaçlı, genişlemiş ve morfolojik olarak anormal endotel hücrelerine sahiptir. Ayrıca, perisitler arasındaki alanların geniş olması nedeniyle sızıntı görülür. Bu fiziksel özellikler veziküllerin tümör dokusu içine daha fazla girişine izin vererek kemoterapötiklerin tümöre daha fazla erişimini sağlar. Lipozomların PEG ile kaplaması, lipozom etrafında hidrofilik bir katman oluşturarak lipozom duvarı ve dış çevre arasında tampon işlevi görür. Bu durum, proteinlerin çift tabakalı lipid katmana bağlanmasını azaltır. Bu proteinler opsoninler gibi hareket ederek yabancı parçacıkları çeker ve mononükleer fagositik hücreleri aktive eder. Bu, lipozomun parçalanmasını ve ilacın serbest bırakılmasını sağlar. Böylece, lipozomun dolaşımdaki ömrü artar. Lipozom intravasküler bölgeden çıktığında, normal

dokularda lenfatik sistem yoluyla temizlenir ve dolaşıma geri gönderilir; tümör dokusunda ise lenfatik sistem yoktur. Bu durum, tümörde daha yüksek, normal dokuda ise daha düşük dozda doksorubisinin serbest bırakılmasını sağlar (27).



Şekil 6. PEGile lipozomal doksorubisinin yapısı.

Bu özellikler sayesinde, ilacın dolaşımdaki yarılanma ömrü artar, tümör dokusunda ilaç birikiminin en üst düzeye çıkarılması sağlanır ve daha da önemlisi, lipozomun olumlu biyolojik dağılım özellikleri sayesinde, doz bağımlı ve kümülatif olarak ağır kardiyotoksisiteye neden olduğu bilinen doksorubisinin, terapötik indeksi iyileştirilir (26).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu çalışma, in vitro deneysel bir çalışma olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu çalışma, Ekim 2015-Aralık 2016 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Çalışma, ticari hücre hatlarının kullanıldığı in vitro bir araştırma olarak gerçekleştirilmiştir. İnsan ya da hayvan materyali kullanılmamıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Bu çalışmanın materyalini CAL-78 (ACC 449) dediferansiye kondrosarkom hücre hattı oluşturmuştur. Hücre hattı Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)'den satın alınmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Uygulanan ilaç dozları, MDR1 ekspresyon değişimi, tümör hücre tipleri bağımsız değişken; ilaç direnci bağımlı değişkenlerdir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Hücre kültürü

Kullanılan malzemeler ve cihazlar:

- RPMI-1640 (Biochrom GmbH, Germany)
- Fötal sıgır serumu (Fetal bovine serum, FBS) (Biochrom GmbH, Germany)
- Penisilin-Streptomisin (10,000U/ml) (BIOCHROM AG, Germany)
- Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate buffered saline, PBS) (Biochrom GmbH, Germany)

- Tripsin-EDTA (Biochrom GmbH, Germany)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Applichem GmbH, Germany)
- Tripan mavisi (Sigma Aldrich, USA)
- Mikropipet seti (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Serolojik pipet (5, 10 ml) (Greiner Bio-One GmbH, Germany)
- Mikropipet uçları (Greiner Bio-One GmbH, Germany)
- Pipetör (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- 25cm² hücre kültür flaskı (Greiner Bio-One GmbH, Germany)
- 75cm² hücre kültür flaskı (Greiner Bio-One GmbH, Germany)
- 15 ml santrifüj tüpü (Greiner Bio-One GmbH, Germany)
- 50 mililitre santrifüj tüpü (Greiner Bio-One GmbH, Germany)
- Karbondioksit inkübatörü (Thermo Scientific, USA)
- Hücre kültürü kabini (ESCO, Singapore)

3.6.1.1. İki boyutlu hücre kültürü

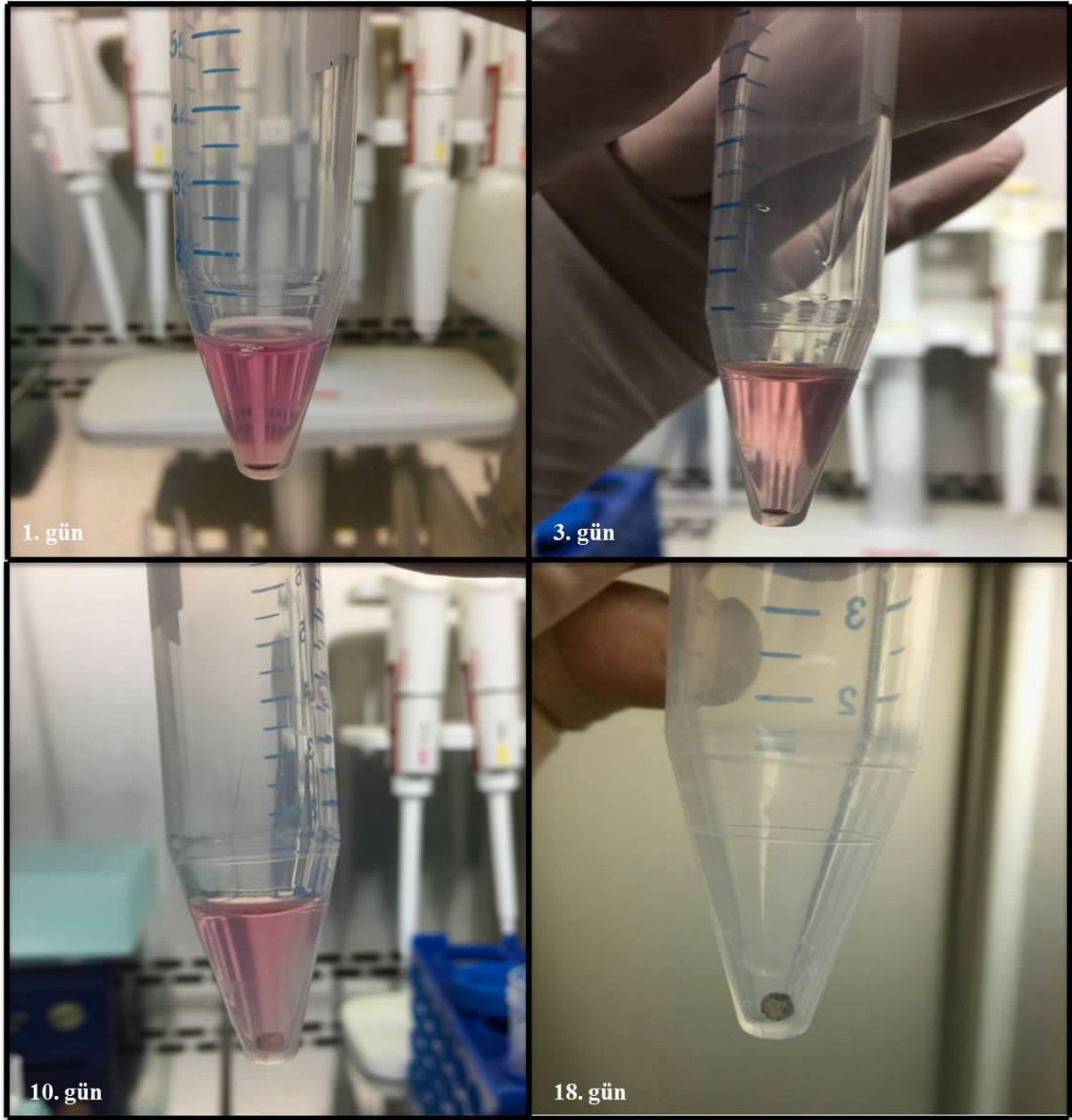
Deneysel uygulama:

Dediferansiye kondrosarkom hücre hattı CAL-78, deneylerde kullanılmak üzere flasklarda çoğaltıldı. Hücrelerin çoğaltılması için %20 FBS ve %1 Penisilin-streptomisin ile desteklenmiş RPMI-1640'dan oluşan kültür ortamı kullanıldı. Hücreler 37°C'de, %5 CO₂ içeren nemli inkübatör ortamında inkübe edildi.

3.6.1.2. Üç boyutlu hücre kültürü

Deneysel uygulama:

Üç boyutlu hücre kültürü oluşturmak için üç boyutlu pellet modeli uygulandı. Hücreler tripsinize edilerek kaldırıldı. 250000 hücre/500µL olacak şekilde komplet kültür ortamıyla süspanse edildi ve 15 ml'lik polipropilen santrifüj tüplerine 500 µL hücre süspansiyonu aktararak 1200rpm'de beş dakika, dik konumda santrifüj edildi. Hücre pelletleri oksijen girişini sağlamak için tüp kapakları tam kapatılmadan, 37°C'de, %5 CO₂ içeren nemli inkübatör ortamında inkübe edildi. 21 gün boyunca her iki-üç günde bir, pelletin dağılmamasına dikkat edilerek kültür ortamı taze ortamla değiştirildi (28, 29, 30) (Şekil 7).



Şekil 7. Üç boyutlu pellet modelinin oluşturulması. Birinci günde santrifüj sonrası pellet görünümünü koruyan hücreler, üçüncü günden itibaren birbirleriyle bağlantı kurarak daha sıkı ve oval görünüm sergilemeye başladı. 10. günde üç boyutlu yapı sağlanırken, 18. günde hücreler sitotoksisite deneyleri için hazır hale geldi.

3.6.2. Üç boyutlu yapının gösterilmesi

Üç boyutlu hücre pelletleri 21 günlük kültür sonrasında, %10 tamponlu formalinde altı-sekiz saat fikse edildi. LEICA ASP300S doku takip cihazında bir gece boyunca işlem

geçirildi. Hücreler parafine gömülerek 4-5µm'lik kesitler alındı ve hemotoksilen eozin ile boyanarak ve ışık mikroskobu altında görüntülendi.

3.6.3. *MDR1 gen ekspresyonunun arttırılması*

Kullanılan malzemeler:

- Rifampin (Rifampisin) (KOÇAK FARMA İlaç ve Kimya Sanayi A.Ş. Türkiye)

Deneysel uygulama:

MDR1 ekspresyonu transkripsiyonel kontrol aracılığıyla, pregnane X reseptör (PXR) gibi nükleer reseptörler tarafından regüle edilmektedir. Bir antibiyotik olan rifampin(rifampisin)'in insan PXR'nin güçlü ve spesifik agonisti olduğu bilinmektedir. PXR'nin rifampin ile aktivasyonunun MDR1 ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır. Çalışmamızda, MDR1 ekspresyon artışını sağlamak amacıyla rifampin kullanıldı. Hücre kültür ortamına son konsantrasyon 75µM olacak şekilde rifampin eklendi (Şekil 8). Hücreler 37°C'de, %5 CO₂ içeren nemli inkübatör ortamında çoğaltıldı (31).



Şekil 8. Rifampin kapsül halinde alınarak, steril suda çözülür ve seri dilüsyon ile, kullanılacak dozlar elde edildi.

3.6.3. *Real time PCR ile MDR1 gen ekspresyonunun ölçümü*

Kullanılan malzemeler ve cihazlar:

- RNeasy mini kit (QIAGEN, Germany)
- NEB ProtoScript® First Strand cDNA Sentez Kiti (NEB, USA)

- Real-time PCR cihazı
- MDR1 primerleri
- β -aktin primerleri
- Light-Cycler Fast Start DNA MasterPlus SYBR Green I kiti (Roche, Germany)
- Light-Cycler 480 II (Roche, Germany)

Deneysel uygulama:

Standart kültür ortamın da büyütülen CAL-78 ve rifampinli kültür ortamında büyütülen CAL-78 (Rifampin) hücrelerinden RNA izole edildi. Elde edilen RNA örneklerinden 6 μ l kalıp kullanılarak NEB ProtoScript® First Strand cDNA Sentez Kiti ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA örnekleri real-time PCR çalışmasında kalıp olarak kullanıldı. Real-time PCR çalışması MDR1 primerleri ve housekeeping gen olarak β -aktin primerleri (Tablo 2) ile Light-Cycler Fast Start DNA MasterPlus SYBR Green I kiti kullanılarak Light-Cycler 480 II cihazında gerçekleştirildi. Üç tekrarlı olarak göreceli kantitasyon analizi yapıldı. Real-time PCR cihazı ile göreceli kantitasyon işlemi, kontrol yani kalibratör olarak tanımlanan hedef gen değerleri 1 olarak kabul edilerek, deney gruplarındaki hedef genlerin mRNA düzeylerinin saptanması temeline dayanan bir testtir. Cihaz, göreceli kantitasyon analizini örneklerin üç tekrarlı gerçek zamanlı PCR çalışmaları sonucunda elde edilen kat ($2^{-\Delta\Delta CT}$) değerlerinin ortalaması ve standart sapmasını hesaplayarak vermektedir.

Tablo 2. MDR1 ve β -aktin primer dizileri

Primer	Dizi	PCR ürün büyüklüğü
MDR1 Forward	5'-AGGTGCAGAGTGGGCAGACG-3'	212 bp
MDR1 Reverse	5'-TTCAGCTATCGTGGTGGCAAAC-3'	
β-aktin Forward	5'-CTTCCTGGGCATGGAGTCCTG-3'	202 bp
β-aktin Reverse	5'-GGAGCAATGATCTTGATCTTC-3'	

Gerçek zamanlı PCR çalışmasında kullanılan ısı profili Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Gerçek Zamanlı PCR Isı Profili

	Döngü sayısı	Süre
Denatürasyon	1 döngü	S:dk:sn
	95 °C	00:10:00
Amplifikasyon	30 döngü	
	95 °C	00:00:10
	60 °C	00:00:10
	72 °C	00:00:15
Erime eğrisi	1 döngü	
	95 °C	00:00:05
	65 °C	00:01:00
	95 °C	continuous

Reaksiyon bileşenlerinden aşağıda verilen miktarlarda kullanılarak reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon bileşenlerinin toplam hacmi 20 μ l'lık olacak şekilde çalışıldı.

- Sybr green PCR Master mix: 4 μ l
- Primer Mix (Forward+Reverse primer, 10 pmol): 1 μ l
- Nükleaz içermeyen su: 11 μ l

- Kalıp cDNA örneği: 4 µl (Bu çalışmada kalıp olarak, elde edilen cDNA'lar ve negatif kontrol olarak da kalıp yerine su kullanıldı)

3.6.4. Doz tayini

Kullanılan malzemeler ve cihazlar:

- E-Plate 96 (ACEA Biosciences, California)
- xCELLigence RTCA Sistemi (ACEA Biosciences, California)
- 96 kuyucukla plate (Becton Dickinson, USA)
- Hücre proliferasyon ajanı WST-1 (Roche, Switzerland)
- ELISA plate okuyucu
- Doksorubisin (Adrimisin[®]) (Deva Holding A.Ş. Türkiye) (Şekil 9)
- Lipozomal doksorubisin (Caelyx[®]) (JANSSEN-CILAG Pty Ltd, Australia) (Şekil 9)
- Sisplatin (KOÇAK FARMA İlaç ve Kimya Sanayi A.Ş. Türkiye) (Şekil 9)

3.6.4.1. WST-1 ile canlılık analizi

Deneysel uygulama:

Hücrelerin proliferasyonlarını takip etmek amacıyla, WST-1 hücre canlılık ajanı kullanılarak canlılık analizi yapıldı. WST-1 formazan tabanlı bir canlılık analizi sağlar. Canlı olan hücrelerin metabolik aktivasyonu sonucu, mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrogenaz enzimi WST-1'de bulunan tetrazolyum halkasını parçalayarak formazan tuzlarını oluştururlar. Oluşan formazan tuzu miktarı ile canlı hücre sayısındaki artış (mitokondriyal dehidrogenaz enziminin aktivitesinde artış) doğrudan ilişkilidir ve reaktifin rengi kırmızıdan sarı-turuncuya döner. Hücreler 10000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plate'e aktarıldı. Hücre kültürlerinin 24. saatinde, literatür taraması sonucu belirlenen doz aralığında doksorubisin, lipozomal doksorubisin ve sisplatin en az beş farklı konsantrasyonda üç tekrarlı olarak hücrelere uygulandı. 72 saat sonra her kuyucuğa 10µL WST-1 eklenerek karanlık ortamda dört saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ELISA plate okuyucu ile absorbans değeri olarak 450nm, referans değeri olarak 630nm dalga boyunlarında ölçüm yapıldı (Şekil 10).



Şekil 9. Çalışmada kullanılan anti-kanser ilaçlar.



Şekil 10. WST-1 ile canlılık analizi.

3.6.4.2. xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi sistemi ile canlılık analizi

Elde edilen sonuçların başka bir yöntemle kanıtlanması için doz tayini deneyi xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile tekrarlandı. Ölçüm için, her kuyucuğun altında elektrot içeren ve empedansa bağlı hücre indeksi ölçümü yapan 96 kuyucuklu E-plate kullanıldı. Hücreler 10000 hücre/kuyucuk olacak şekilde E-plate'e aktarıldı. Hücre kültürlerinin 24. saatinde, literatür taraması sonucu belirlenen dozlarda doksorubisin ve lipozomal doksorubisin en az beş farklı konsantrasyonda; sisplatin dört farklı konsantrasyonda, üç tekrarlı olarak hücrelere uygulandı ve hücre proliferasyonu xCELLigence RTCA SP Cihazı (ACEA Biosciences, Inc.San Diego,USA) ile 72 saat boyunca ölçüldü (Şekil 11).



Şekil 11. xCELLigence RTCA sistemi ile canlılık analizi akış şeması.

3.6.5. İki boyutlu hücre kültüründe WST-1 ile sitotoksosite ölçümü

Hücreler 10000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plate'e aktarıldı. Hücre kültürlerinin 24. saatinde, doz tayini çalışması sonrası belirlenen doz aralığında doksorubisin, lipozomal doksorubisin ve sisplatin dört farklı konsantrasyonda, üç tekrarlı olarak hem standart hücre kültür ortamında yetiştirilen CAL-78 hem de 75µM rifampin içeren kültür ortamında yetiştirilen CAL-78 (Rifampin) hücrelerine uygulandı. 72 saat sonra her kuyucuğa 10µL WST-1 eklenerek karanlık ortamda dört saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ELISA plate okuyucu ile absorbands değeri olarak 450nm, referans değeri olarak 630nm dalga boyunlarında ölçüm yapıldı.

3.6.6. Üç boyutlu hücre kültüründe WST-1 ile sitotoksosite ölçümü

Üç boyutlu hücre pelletlerinde, hem standart hücre kültür ortamı hem de 75µM rifampin içeren kültür ortamında yetiştirilen üç boyutlu pelletlere hücre kültürünün 18. gününde, belirlenen dozlarda doksorubisin ve lipozomal doksorubisin dört farklı konsantrasyonda; sisplatin tek konsantrasyonda, üç tekrarlı olarak uygulandı. 72 saat sonra her kuyucuktaki ortam atılarak 10µL WST-1 içeren 100'er µL kültür ortamı eklendi ve karanlık ortamda dört saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ELISA plate okuyucu ile absorbands değeri olarak 450nm, referans değeri olarak 630nm dalga boyunlarında ölçüm yapıldı.

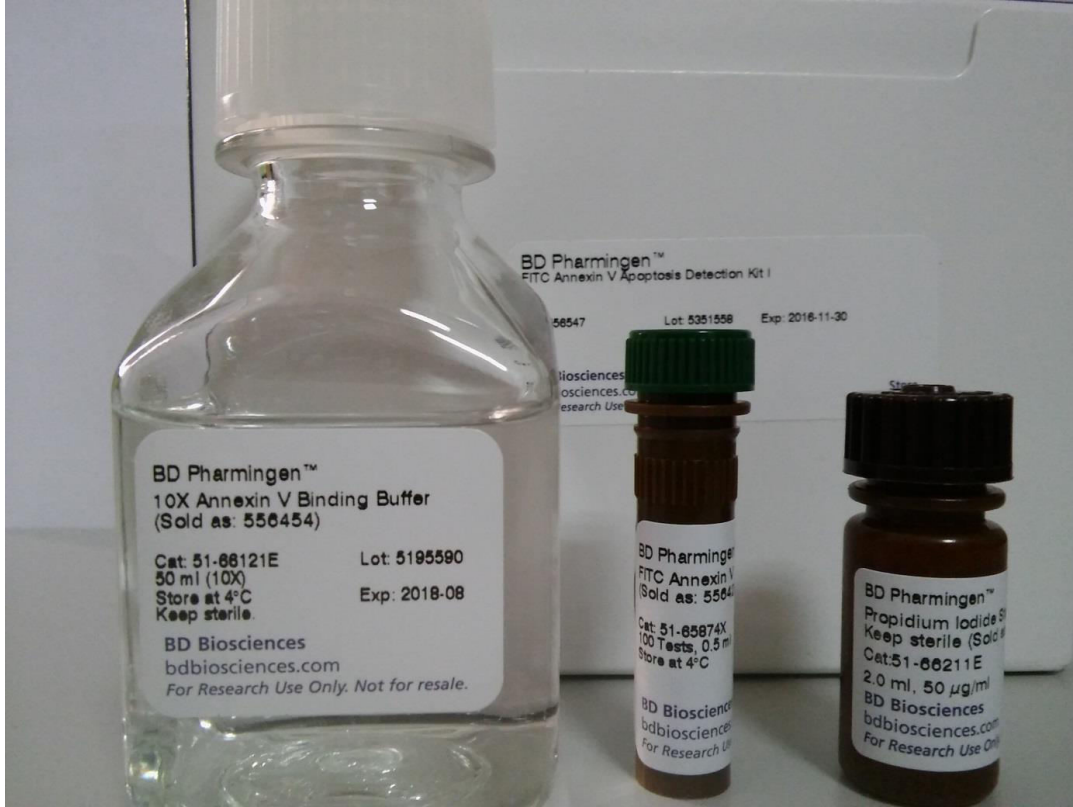
3.6.7. Akım sitometri ile apoptoz analizi

Kullanılan malzemeler ve cihazlar:

- 24 kuyucuklu plate (Greiner Bio-One GmbH, Germany)
- FITCH Annexin V Apoptoz Kiti (Becton Dickinson, USA) (Şekil 12)
- Akım sitometri cihazı

Deneysel uygulama:

Hücreler 24 kuyucuklu plate'e ekildi ve hücre kültürünün 24. saatinde, hücre çoğalmasını %50 oranında inhibe eden dozlarda (inhibitory concentration of 50%, IC50) doksorubisin, lipozomal doksorubisin ve sisplatin eklendi. 72 saat inkübasyondan sonra hücreler tripsinize edilerek kaldırıldı ve soğuk PBS ile 2 kere yıkandı. Kullanılan kitin uygulama talimatlarına göre Annexin V ve Propidium iodide ile boyandı ve akım sitometri cihazı ile apoptoz değerlendirildi.



Şekil 12. FITCH Annexin V Apoptoz Kiti.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

- 1) Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 28.10.2015 tarihinde 10840098-604.01.01-E.3216 sayı ve 493 karar numarasıyla etik kurul onayı alınması ve itibariyle literatür taramaları ve deney planlamalarının yapılması (Ekim 2015)



2) Malzemelerin temin edilmesi (Ocak 2016)



3) Dediferansiye konsdrosarkom hücrelerinin çoğaltılması (Şubat-Mart 2016)



4) Normo- ve hiper- eksprese MDR1 içeren iki ve üç boyutlu hücre kültürü modelinin oluşturulması ve validasyonu (Nisan-Mayıs 2016)



5) Üç boyutlu hücre yapısı elde edildiğinin gösterilmesi (Haziran 2016)



6) Doz tayini/canlılık analizleri ve tekrar çalışmaları (Haziran-Ağustos 2016)



7) Apoptoz ölçümü (Ağustos 2016)



8) Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizi (Temmuz-Ekim 2016)



9) Literatür taraması ve tezin yazımı (Ekim-Aralık 2016)

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Elde edilen sonuçlar SPSS Version 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) istatistik programı kullanılarak analiz edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Üç boyutlu model uygulamaları her ne kadar tümör dokusunu en iyi modelleyen in vitro çalışmalar olsa da organizmanın immün yanıt, metabolizma vb. koşullarından

yoksundur. Bu çalışma yalnızca seçilen parametrelerin salt etkilerini değerlendirmek üzere tasarlanmıştır.

3.10. Etik Kurul Onayı

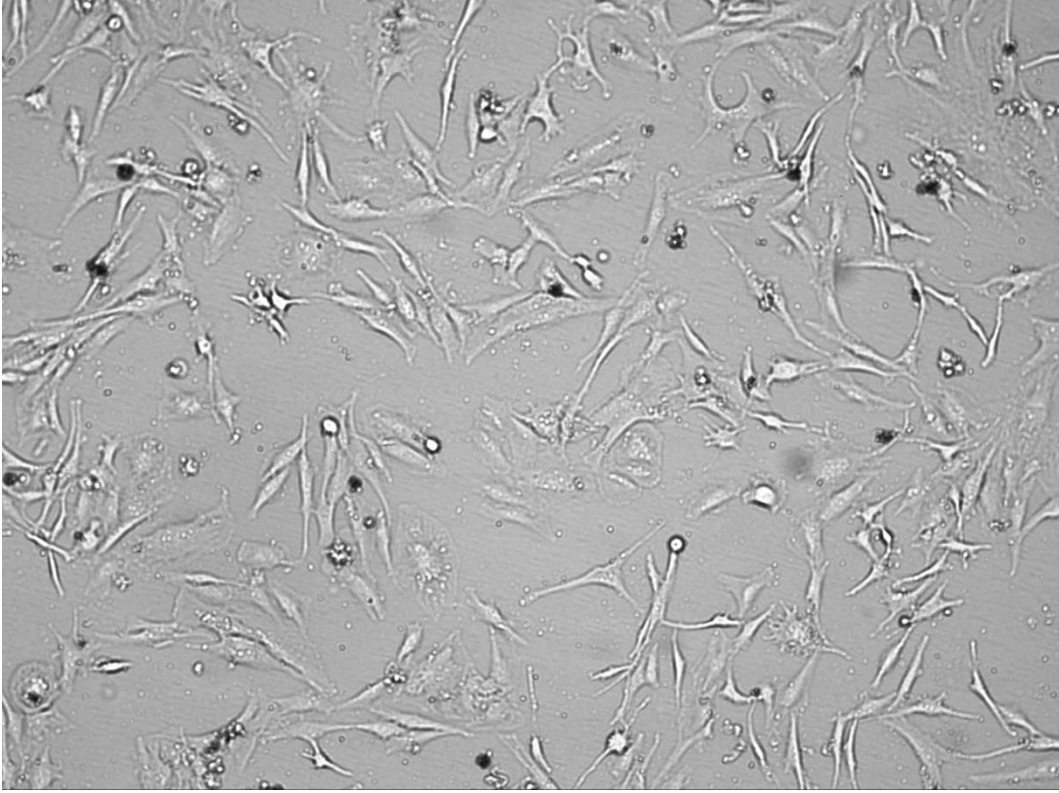
Bu çalışma Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 28.10.2015 tarihinde 10840098-604.01.01-E.3216 sayı ve 493 karar numarasıyla etik kurul onayı almıştır (Ek 1).



4. BULGULAR

4.1. Dediferansiye Kondrosarkom Hücrelerinin Çoğaltılması

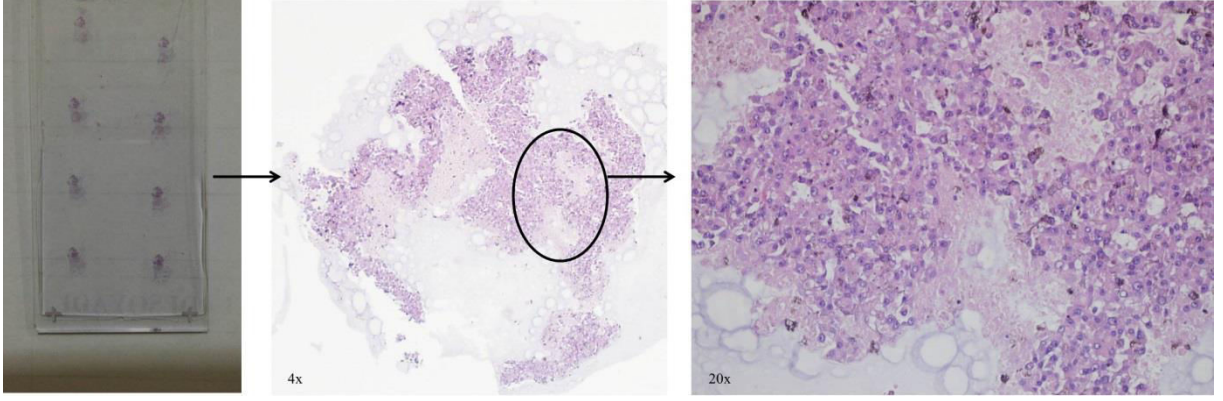
Deneylein yapılması için seçilen CAL-78 hücre hattı DSMZ'den temin edildikten sonra, deneylelerde kullanılmak üzere uygun kültür ortamı içinde çoğaltıldı (Şekil 13).



Şekil 13. CAL-78 hücrelerinin JuLI Br canlı hücre görüntüleme sistemi altında görüntüsü (1x).

4.2. Üç boyutlu yapının gösterilmesi

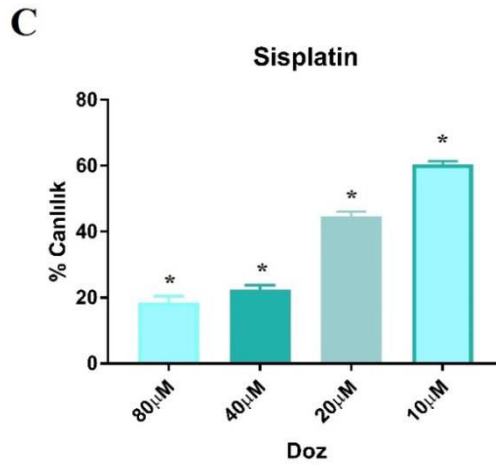
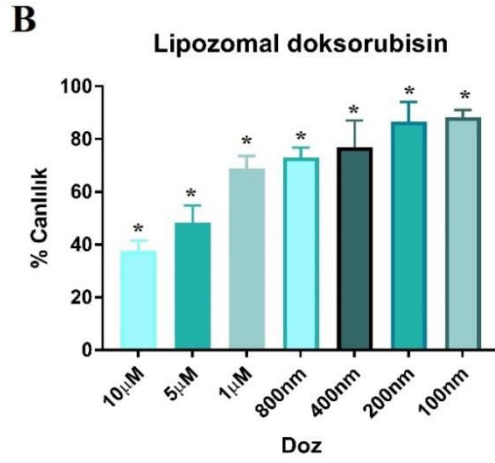
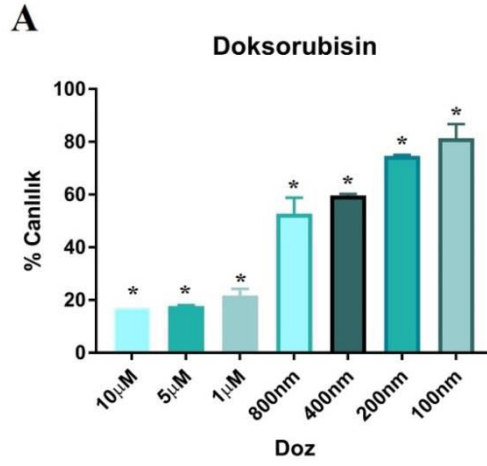
Üç boyutlu hücre pelletleri 21 günlük kültür sonrasında fikse edilerek parafine gömüldü. 5µM'lik kesitler alınarak hemotoksilen eozin ile boyandı ve ışık mikroskobu altında görüntülendi (Şekil 14).



Şekil 14. Üç boyutlu pelletlerden alınan, hematoksilin eozin ile boyanmış kesitlerin mikroskop altında görüntüsü.

4.3. Uygun doz aralığının tayin edilmesi

Farklı dozlarda ilaç uygulamalarından sonra ilaç etkinliğinin karşılaştırılmasında kullanılacak olan doz aralığı (Şekil 15) ve IC₅₀ değerleri belirlendi. Doksorubisin ve lipozomal doksorubisin için 10-0,2µm; siplatin için ise 80-10µM doz aralığının kullanılmasına karar verildi.

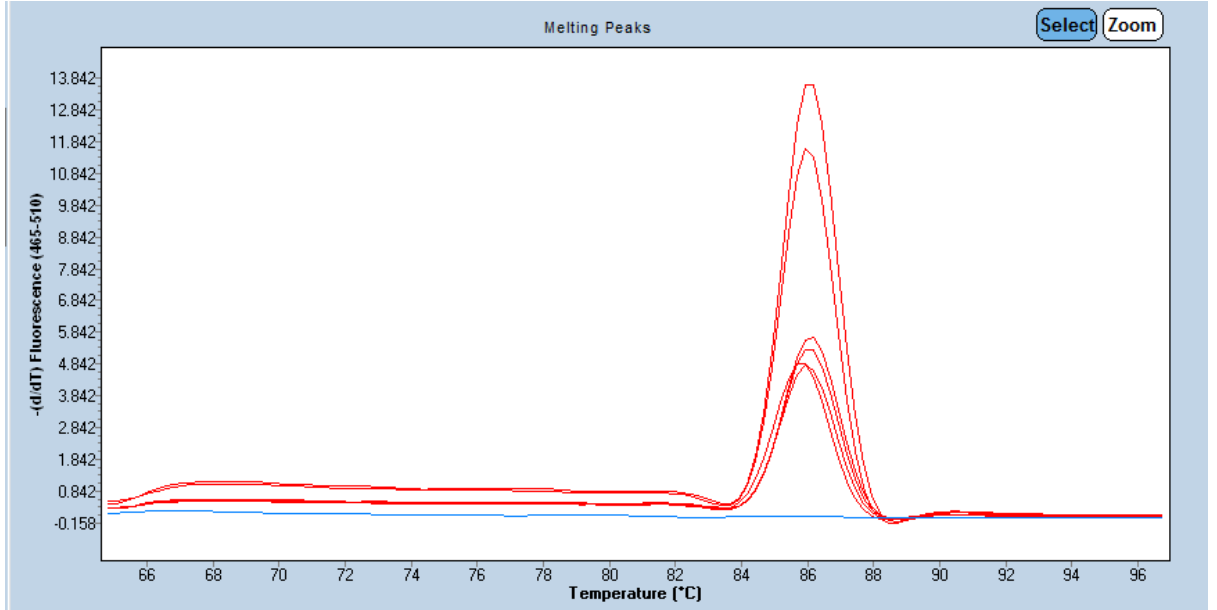


Şekil 15. CAL-78 hücre hattında (A) doksorubisin, (B) lipozomal doksorubisin ve (C) sisplatinin doza bağlı sitotoksisite eğrileri. * $p < 0,05$ vs kontrol. Ölçümler üç tekrarlı olarak yapıldı.

4.4. MDR1 gen ekspresyon artışının gösterilmesi

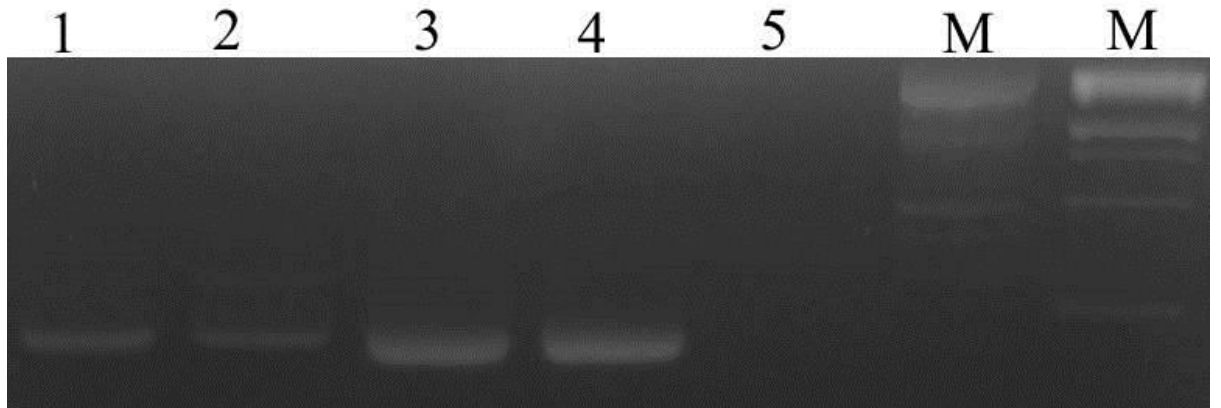
4.4.1. Real-time PCR Özgüllüğü: Erime Eğrisi Analizi ve Agaroz jel Elektroforezi Sonuçları

Uygulanan Real-time PCR'ın özgüllüğünü değerlendirmek için hedef genlere spesifik erime eğrileri incelendi. Her hedef için beklenen sıcaklıkta pik varlığı gözlemlendi (Şekil 16).



Şekil 16. Erime eğrisi analizi ile MDR1 için elde edilen pikler

Ayrıca PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucunda beklenen büyüklüklerde tek bir bant varlığının saptanması PCR'nin özgüllüğünü doğruladı. MDR1 için 212 baz çiftlik, bantlar izlendi (Şekil 17).



Şekil 17. Real-time ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri. M, moleküler marker, 1:MDR1 ürünü; 2:β-aktin ürünü.

4.4.2. Standart Eğrilerin Oluşturulması

“LightCycler” bilgisayar yazılımı ile standart kalıbın her seri dilüsyonu için döngü numarasına karşılık gelen floresan şiddetinin işaretlenmesiyle standart eğriler oluşturuldu. Floresan sinyalin arka plandan çıkıp, log linear faza girdiği döngü numarası “crossing point (Cp)” olarak tanımlandı. Standart eğriyi oluşturmak için her Cp değeri standartın tanımlanmış olan konsantrasyonuna karşılık gelecek şekilde işaretlendi. Sonuç olarak test örneği için ölçülen Cp değeri ile standart eğriye göre örnekteki hedef DNA konsantrasyonu hesaplandı. Hedef genlerin amplifikasyon etkinlikleri bilgisayar yazılımı ile eğrinin eğimine göre belirlendi. Tablo 4’te standart eğrilerin oluşturulmasında kullanılan seri dilüsyonların DNA konsantrasyonları, real-time PCR sonucu belirlenen ortalama Cp değerleri ve hedef genlerin amplifikasyon etkinlikleri sunulmaktadır.

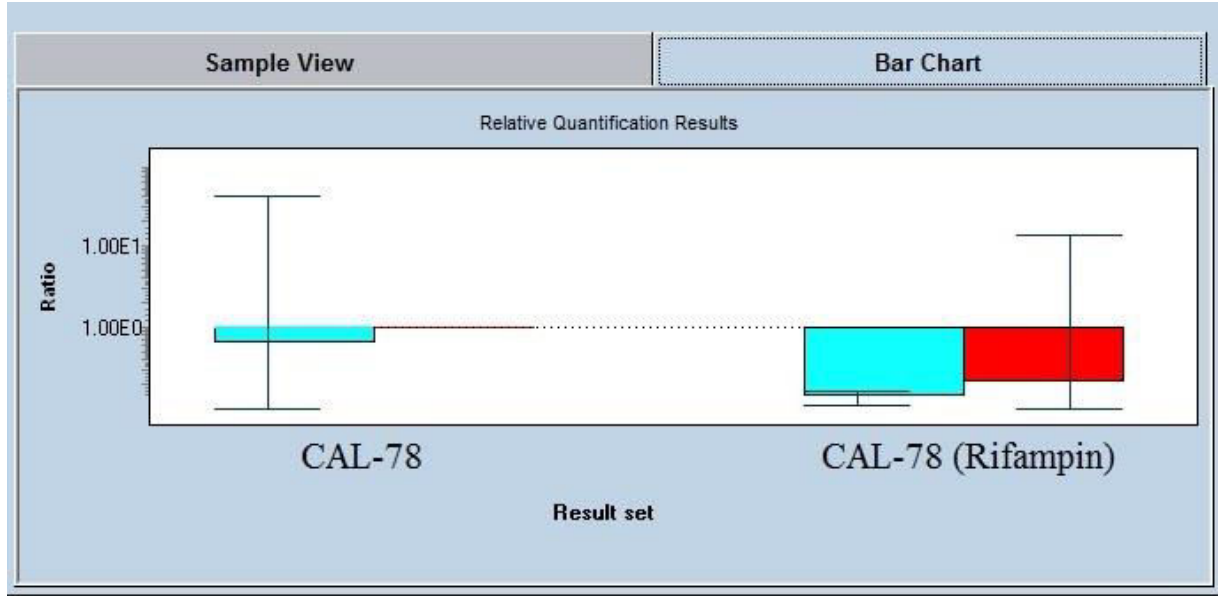
Tablo 4. Standart Eğrilerin Oluşturulması ve Etkinlikleri

Results

Bar Chart	Pairing	Sample Name	Target Name		Tgt Cp Mean	Ref. Cp Mean	Ratios		Corr/Multi Factor	Status
			Targets	References			Tgt/Ref.	Norm		
☒		BACTIN CAL78;MDR1 CAL78			16.52	13.67	0.1386	0.2156	1/1	
☒	G8/G11	BACTIN CAL78 RIFAMPIN;MDR1 CAL78			12.05	11.41	0.6428	1.000	1/1	

4.4.3. MDR1 ekspresyon düzeyleri

MDR1 gen ekspresyon verileri incelendiğinde, CAL-78 hücre hattına göre, CAL-78 (Rifampin) hücre hattında MDR1 ekspresyonunun 3,7 kat arttığı gözlemlendi (Şekil 18).



Şekil 18. CAL-78 (Rifampin) hücre hattının CAL-78 hücre hattına kıyasla MDR1 ekspresyonu.

4.5. MDR-1 ekspresyonu aracılı direncin iki boyutlu kültürde gösterilmesi

10, 5, 1 ve 0,4µM doksorubisin uygulanmasından sonra CAL-78 hücrelerinin hücre canlılığı sırasıyla %17, 18, 21 ve 59; rifampinli ortamda büyütülmüş CAL-78 (Rifampin) hücrelerinin hücre canlılığı ise sırasıyla %21, 25, 29 ve 67 olarak saptandı (Şekil 19A).

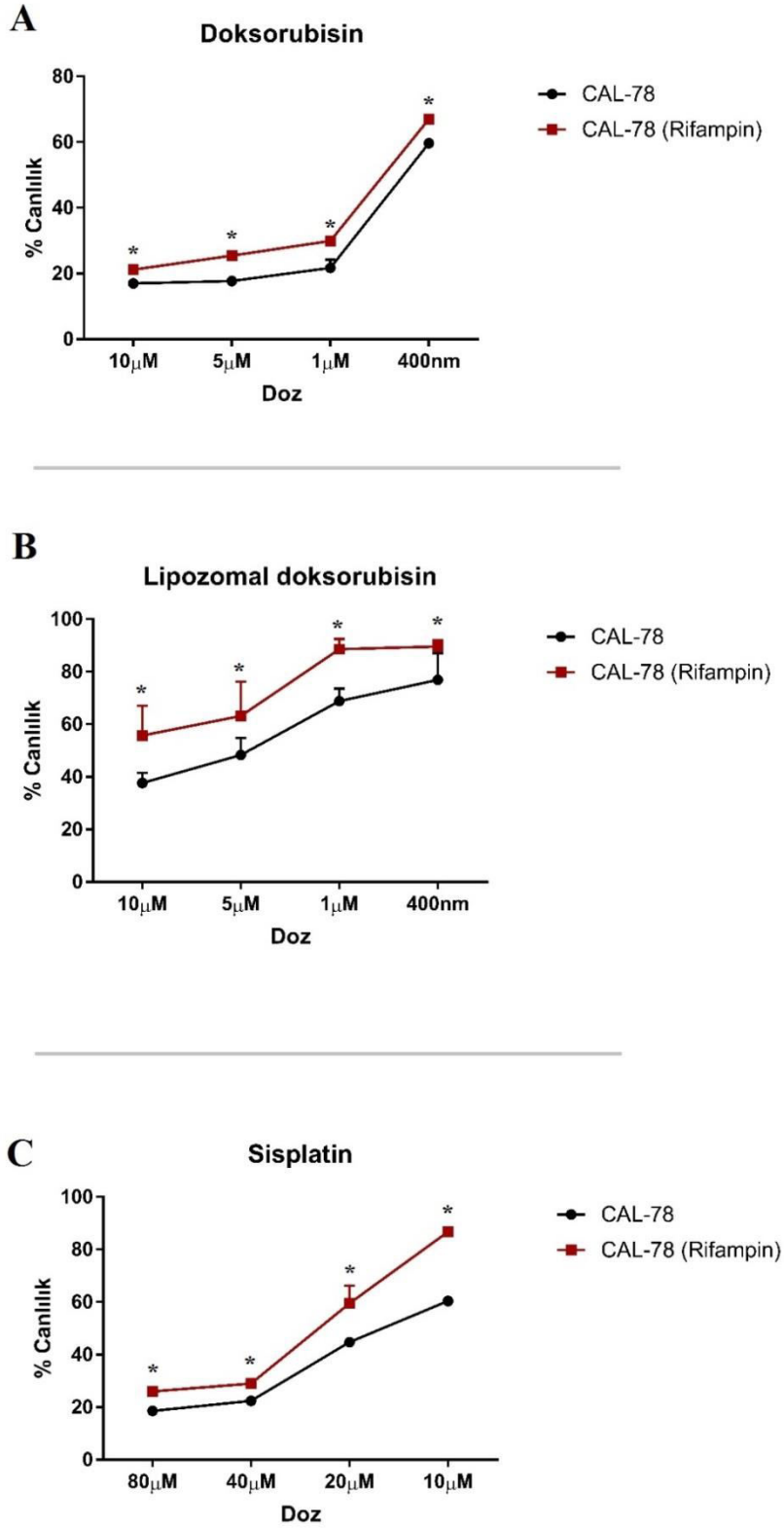
10, 5, 1 ve 0,4µM lipozomal doksorubisin uygulanmasından sonra CAL-78 hücrelerinin hücre canlılığı sırasıyla %37, 48 68 ve 77; CAL-78 (Rifampin) hücrelerinin hücre canlılığı ise sırasıyla %55, 63, 88 ve 90 olarak saptandı (Şekil 19B).

80, 40, 20 ve 10µM sisplatin uygulan CAL-78 hücrelerinin hücre canlılığı sırasıyla %18, 22, 44 ve 60; ; rifampinli ortamda büyütülmüş CAL-78 (Rifampin) hücrelerinin hücre canlılığı ise sırasıyla %25, 30, 59 ve 86 olarak saptandı (Şekil 19C).

Direnç gelişimi sonrası, IC50 değerleri belirlendi (Tablo 5).

Tablo 5. CAL-78 hücre hattında MDR-1 gen ekspresyon artışı aracılı direnç gelişimi sonucu elde edilen CAL-78 (Rifampin) hücre hattında IC50 değerleri.

İlaç	IC50 (µm)	
	CAL-78	CAL-78 (Rifampin)
Doksorubisin	0,5	0,7
Lipozomal doksorubisin	6	11
Sisplatin	20	46



Şekil 19. İki boyutlu kültürde, CAL-78 ve CAL-78 (Rifampin) hücre hattında, (A)doksorubisin, (B)lipozomal doksorubisin ve (C)sisplatin uygulaması sonrası hücre canlılığı. * $p < 0,05$ vs CAL-78. Ölçümler üç tekrarlı olarak yapıldı.

4.6. MDR-1 ekspresyonu aracılı direncin üç boyutlu kültürde gösterilmesi

Üç boyutlu kültürde, 10, 1 ve 0,2µM doksorubisin uygulamasından sonra CAL-78 hücrelerinin hücre canlılığı sırasıyla %61, 73 ve 75; rifampinli ortamda büyütülmüş CAL-78 (Rifampin) hücrelerinin hücre canlılığı ise sırasıyla %78, 80 ve 90 olarak saptandı (Şekil 20A).

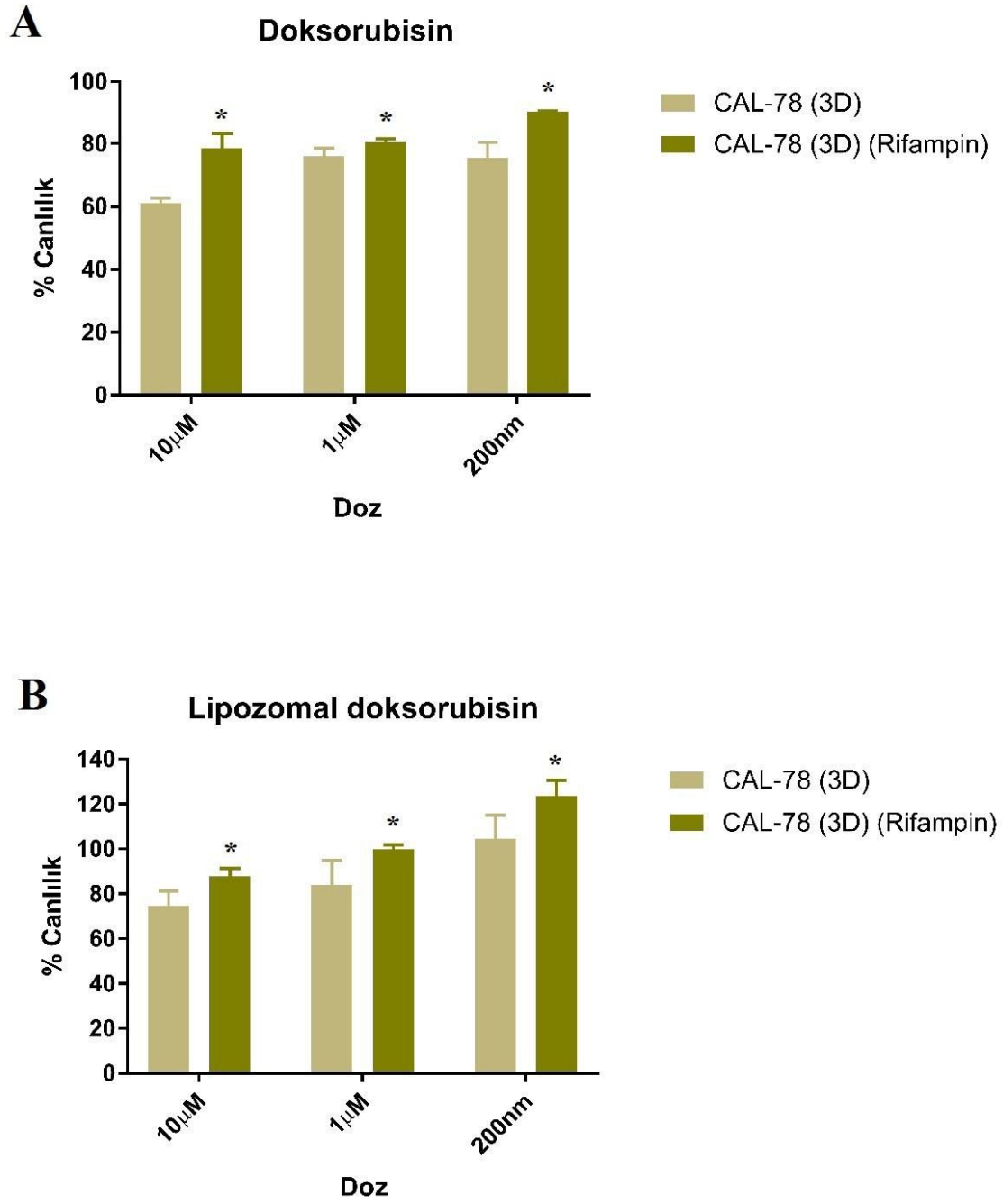
10, 1 ve 0,2µM lipozomal doksorubisin uygulamasından sonra CAL-78 hücrelerinin hücre canlılığı sırasıyla %76, 84 ve 100; CAL-78 (Rifampin) hücrelerinin hücre canlılığı ise sırasıyla %88, 100 ve 123 olarak saptandı (Şekil 20B).

20µM sisplatin uygulamasından sonra CAL-78 hücrelerinin hücre canlılığı %75; CAL-78 (Rifampin) hücrelerinin hücre canlılığı ise %97 olarak saptandı.

Direnç gelişimi sonrası, IC50 değerleri belirlendi (Tablo 6).

Tablo 6. CAL-78 hücre hattında, üç boyutlu kültürde MDR-1 gen ekspresyon artışı aracılı direnç gelişimi sonucu elde edilen CAL-78 (Rifampin) hücre hattında IC50 değerleri.

İlaç	IC50 (µm)	
	CAL-78 (3D)	CAL-78 (3D) (Rifampin)
Doksorubisin	15	31
Lipozomal doksorubisin	20	24



Şekil 20. Üç boyutlu kültürde, CAL-78 ve MDR1 ekspresyonu arttırılmış CAL-78 (Rifampin) hücre hattında (A)doksorubisin ve (B) lipozomal doksorubisin uygulaması sonrası hücre canlılığı. * $p < 0,05$ vs CAL-78(3D). Ölçümler üç tekrarlı olarak yapıldı.

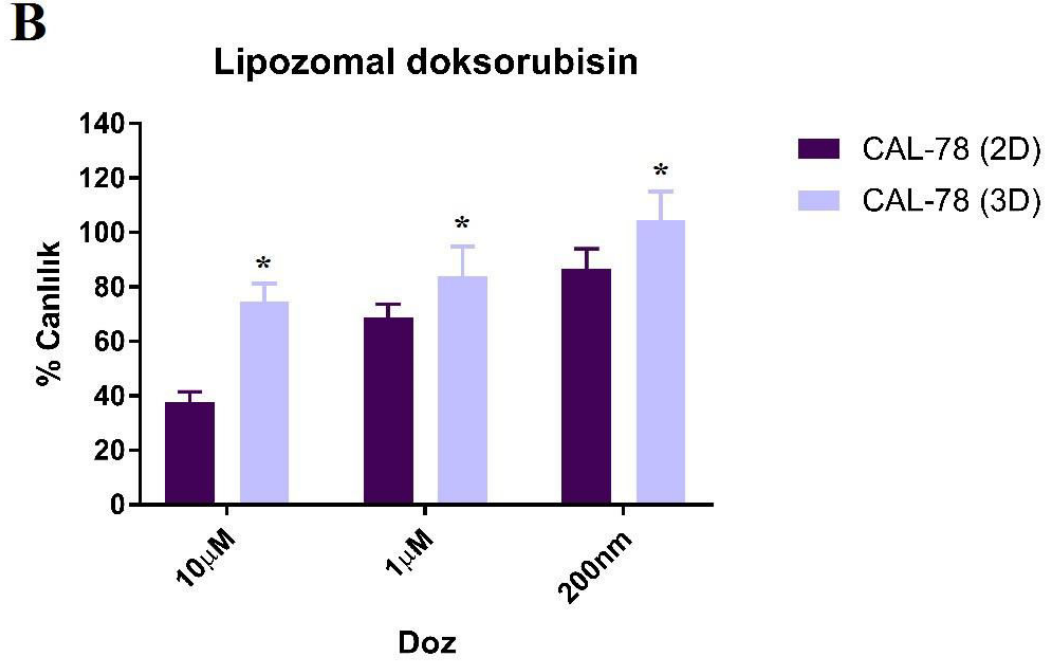
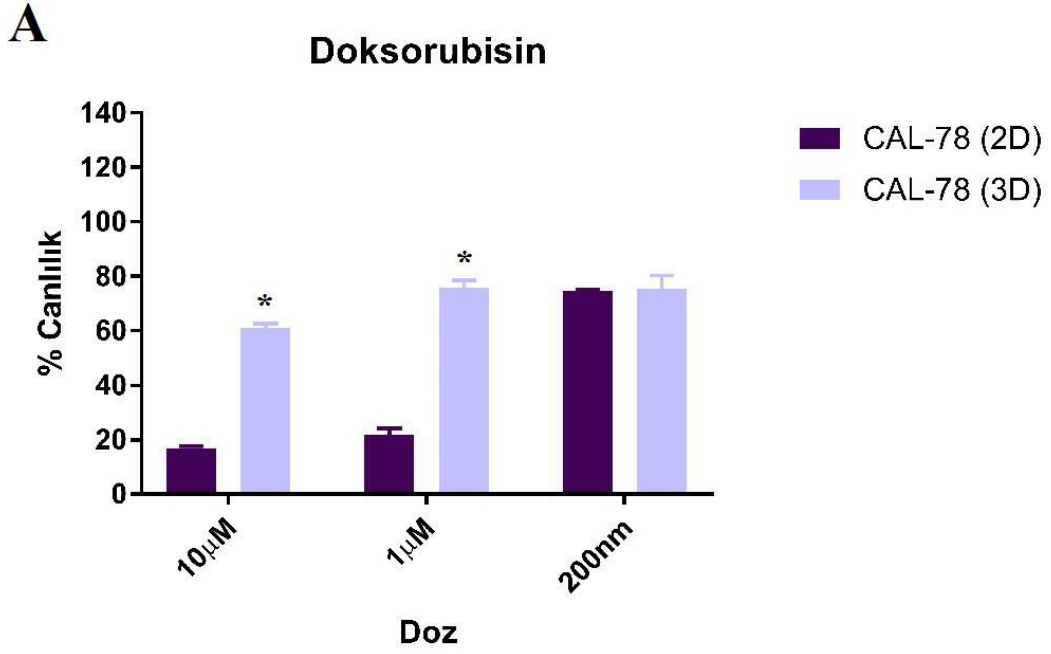
4.7. Üç boyutlu yapının ilaç etkinliği üzerine etkisi

10, 1 ve 0,2µM doksorubisin uygulanmasından sonra iki boyutlu CAL-78 hücrelerinin hücre canlılığı sırasıyla %17, 21, ve 74; üç boyutlu CAL-78 hücrelerinin hücre canlılığı ise sırasıyla %61, 72 ve 78 olarak saptandı (Şekil 21A).

10, 1 ve 0,2µM lipozomal doksorubisin uygulanmasından sonra iki boyutlu CAL-78 hücrelerinin hücre canlılığı sırasıyla %37, 68 ve 86; üç boyutlu CAL-78 hücrelerinin hücre canlılığı ise sırasıyla %76, 84 ve 100 olarak saptandı (Şekil 21B).

20µM sisplatin uygulan iki boyutlu CAL-78 hücrelerinin hücre canlılığı %44; üç boyutlu CAL-78 hücrelerinin hücre canlılığı ise %75 olarak saptandı.



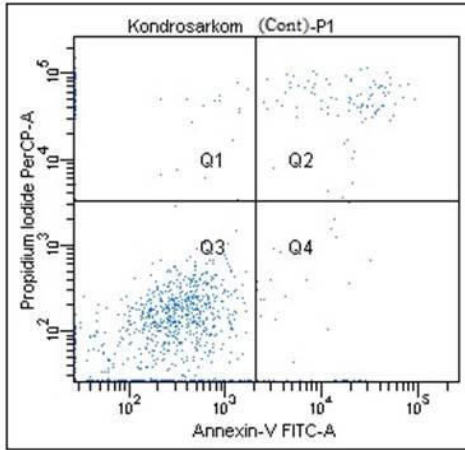


Şekil 21. İki ve üç boyutlu kültürde, CAL-78 hücre hattında üzerinde (A)doksorubisin ve (B) lipozomal doksorubisin uygulaması sonrası hücre canlılığı. *p<0,05 vs CAL-78.

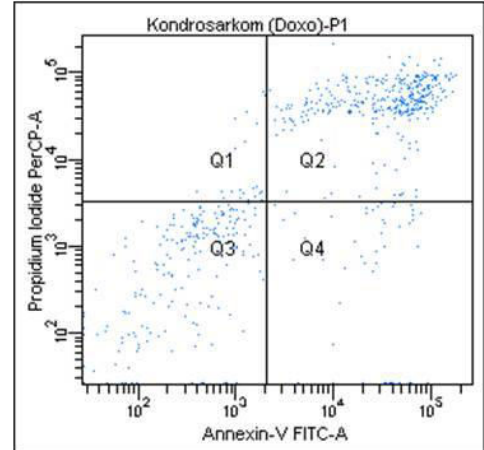
4.8. Apoptoz Analizi

Şekil 22’de, Q1 alanı nekrotik hücreleri, Q2 alanı erken apoptoza giden hücreleri, Q3 alanı canlı hücreleri, Q4 alanı ise apoptotik hücreleri göstermektedir. Kontrol hücrelerinde hücre canlılığı %80,4 olarak saptanırken, hücrelerin %13,5’i apoptozda, %6,1’i ise nekrozdaydı (Şekil 22A). Doksorubisin uygulanan hücrelerde hücre canlılığı %32 olarak saptanırken, hücrelerin %44,5’i apoptozda, %3,5’i ise nekrozdaydı (Şekil 22B). Lipozomal doksorubisin uygulanan hücrelerde hücre canlılığı %58,4 olarak saptanırken, hücrelerin %39,1’i apoptozda, %2,5’i ise nekrozdaydı (Şekil 22C). Sisplatin uygulanan hücrelerde hücre canlılığı %36,8 olarak saptanırken, hücrelerin %45,1’i apoptozda, %5,8’i ise nekrozdaydı (Şekil 22D).

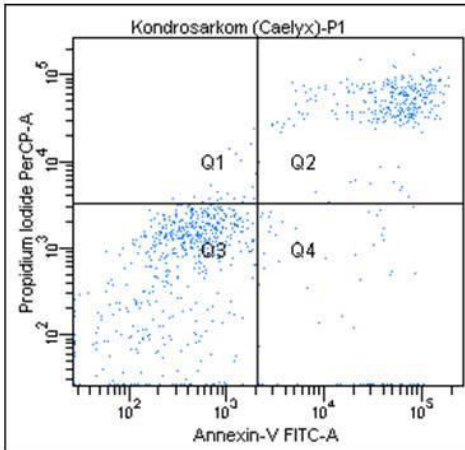


A

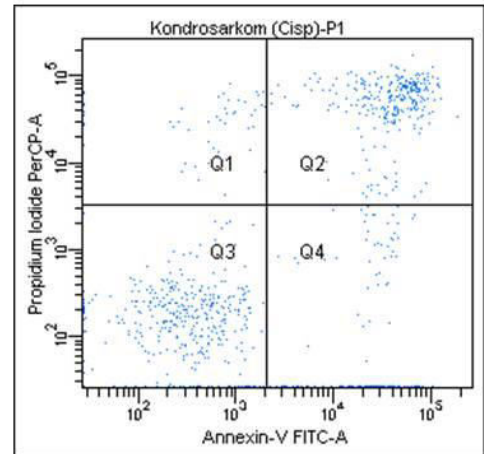
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,040	###	100.0
P1	954	91.7	91.7
Q1	58	6.1	5.6
Q2	93	9.7	8.9
Q3	767	80.4	73.8
Q4	36	3.8	3.5

B

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	720	###	100.0
P1	637	88.5	88.5
Q1	22	3.5	3.1
Q2	361	56.7	50.1
Q3	204	32.0	28.3
Q4	50	7.8	6.9

C

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,000	###	100.0
P1	923	92.3	92.3
Q1	23	2.5	2.3
Q2	292	31.6	29.2
Q3	539	58.4	53.9
Q4	69	7.5	6.9

D

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,000	###	100.0
P1	869	86.9	86.9
Q1	50	5.8	5.0
Q2	294	33.8	29.4
Q3	368	42.3	36.8
Q4	157	18.1	15.7

Şekil 22. CAL-78 hücre hattında (A)kontrol ve IC50 dozlarında (B)doksorubisin, (C)lipozomal doksorubisin ve (D)sisplatin uygulanan hücrelerin apoptoz analizi sonuçları.

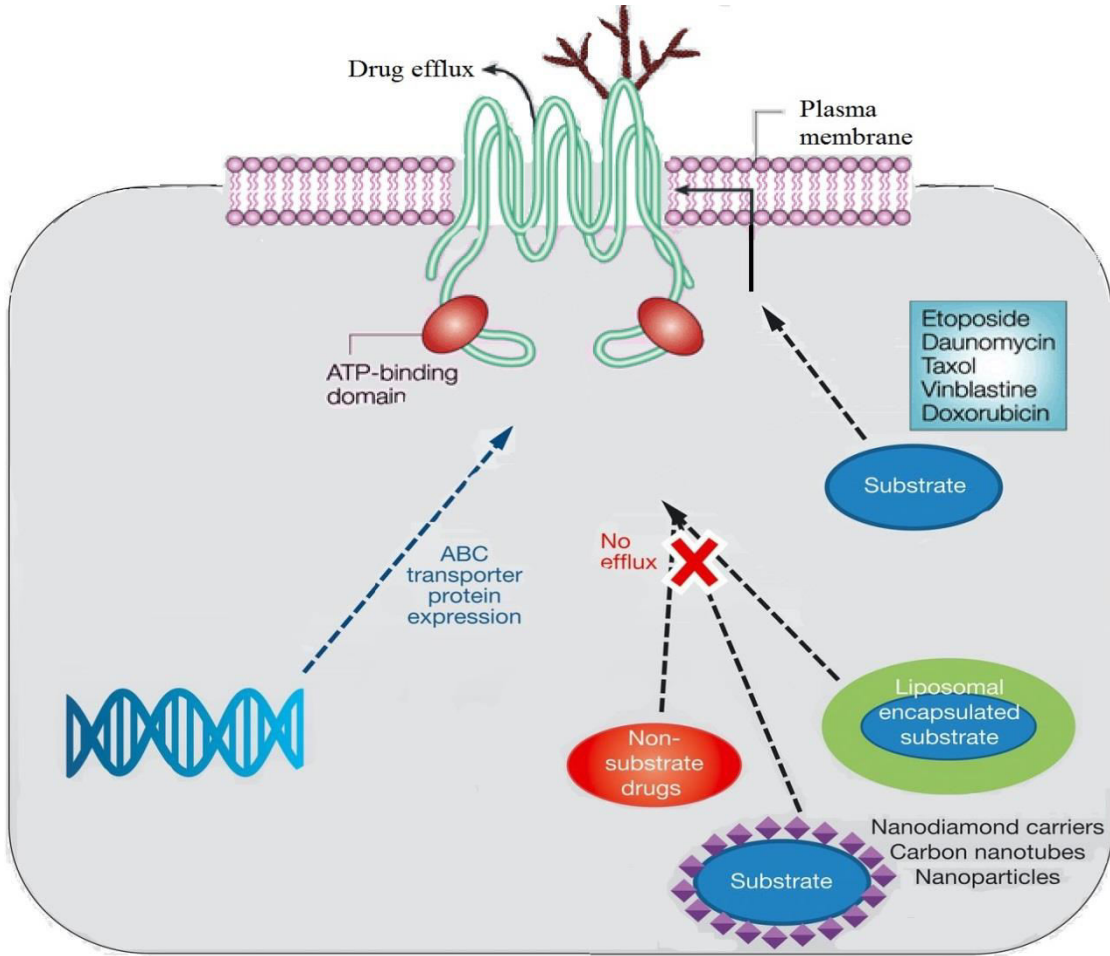
5. TARTIŞMA

Kondrosarkom en sık görülen ikinci malign kemik tümörüdür ve yıllık tahmini 1/200000 insidansı ile nadir görülen bir tümördür (1,2). Dediferansiye kondrosarkom tüm kondrosarkomların %9-10'unu (7) tüm primer kemik tümörlerinin ise %1-2'sini oluşturur (8). Birincil tedavi seçeneği cerrahidir, kemoterapi yalnızca bazı hastalarda yararlı olabilir. Radikal amputasyondan sonra lokal hastalıkta daha iyi kontrol sağlansa da eksizyon yapılan hastalarda lokal nüks görülme oranı %50'ye kadar çıkabilir (9,10). Metastatik nüks sık görülür (7). Medyan sağkalım yaklaşık altı aydır ve beş yıllık sağkalım oranları %10-13'tür. Hastalar nadiren 2 yıldan fazla yaşamaktadır. (9,10). Bindiganavile S vd. yaptığı çalışmada, hastalığa özgü sağkalımın histolojik alt tipler arasında önemli oranda değişiklik gösterdiği ve dediferansiye tipin en kötü sağkalım oranına (25 ± 15.3 , 10 yıllık) sahip olduğu gösterilmiştir. SEER veritabanı çalışmasına göre son 30 yılda kondrosarkom sağkalımında önemli bir gelişme olmamıştır (1) ve kondrosarkom tedavisi önemli bir sorun olmaya devam etmektedir.

NCCN, kondrosarkom için osteosarkom tedavisi ile benzer tedavi önerse de günümüze kadar yapılan çalışmalarda etkili bir kemoterapi ajanı saptanamamıştır. Birçok çalışmada kondrosarkom tedavisinde, özellikle rezekte edilemeyen ve/veya metastatik hastalıkta sistemik bir tedaviye ihtiyaç olduğu vurgulanmaktadır.

Kondrosarkomlar, ekstraselüler matriksin yoğunluğu, hücre bölünmesinin kısmen az olması ve zayıf vaskülarite nedeniyle sistemik tedavi ve radyoterapi direncine yatkındırlar (3, 4). Ayrıca, MDR1 pompası aktivitesinin de kondrosarkomda kemoterapi direncinde rolü olabileceği düşünülmektedir (5). MDR1 geni bir membran transporter proteini olan P-glikoproteinini kodlamaktadır. Bu glikoprotein, hidrofobik kemoterapötik ajanları aktif olarak hücre dışına ileten bir enerji-bağımlı hücre membran proteinidir (Şekil 23). Bazı çalışmalarda, MDR1 gen ekspresyonunun bazı tümör hücrelerinde mitomisin, vinkristin ve doksorubisin gibi ajanlara zayıf yanıtı sorumlu olduğu gösterilmiştir. Wyman JJ ve arkadaşlarının iki kondrosarkom hücre hattı ile yaptığı çalışmada, MDR1 ekspresyonu açısından pozitif olan hücre hattında hücre içi doksorubisin miktarının negatif olana göre anlamlı miktarda az olduğu ve ilaç direncinin anlamlı miktarda fazla olduğu gösterilmiştir. Terek RM vd.'nin, 41 hastada MDR1 ekspresyonunun test edildiği ve sağkalım analizlerinin yapıldığı retrospektif çalışmada ise kemoterapiye direncin MDR1 ekspresyonuyla ilgili olabileceği ortaya konmuştur (20).

Literatürde, doksorubisinin lipozomal enkapsülasyon ile hücre içine iletildiği durumlarda P-glikoprotein'in substratı olmadığı gösterilmiştir (32). Bu bağlamda, çalışmamızda MDR1 aracılı gelişen ilaç direncinin nanopartikül taşıyıcılar ile aşılp aşılamayacağı araştırılmıştır. Hidrofilik yapısı nedeniyle nanopartikül bağlı ilaç olarak, kondrosarkom tedavi rejiminde de sıklıkla kullanılan doksorubisin'in lipozomal formu seçilmiştir. Lipozomal formun hidrofobik moleküllerin hücre dışına atımına neden olan MDR pompası engelini aşılmasını sağlayacağı düşünülmüştür.



Şekil 23. Hidrofobik ilaçların hücre dışına MDR pompası aracılığıyla atılması (Xia CQ, 2012'den uyarlanmıştır (32)).

MDR1 ekspresyonu aracılı direncin sağlanması için, kondrosarkom hücreleri MDR1 ekspresyonunun regülatörlerinden biri olan PXR'nin güçlü ve spesifik agonisti olduğu bilinen rifampin ile muamele edilmiş ve ekspresyon artışı real-time PCR ile gösterilmiştir. Ayrıca, oluşturulan ilaç direnci sitotoksisite testi ile gösterilmiştir. Uygulanan dozlarda, rifampin ile

muamele edilen grupta standart kültür ortamında yetiştirilen hücrelere göre canlılık oranının ve IC50 değerlerinin anlamlı oranda arttığı saptanmış ve direnç gelişimi doğrulanmıştır. Şimdiye kadar, kondrosarkomda lipozomal doksorubisin etkinliğini göstermeye yönelik yapılmış laboratuvar veya klinik çalışma bulunmamaktadır. Lipozomal doksorubisinin diğer kanser türlerindeki etkinliğine yönelik faz çalışmaları bulunmaktadır. Garcia AA ve ark.'ın yaptığı faz II çalışmasında, lipozomal doksorubisinin yumuşak doku sarkomunda etkinliğinin daha düşük olduğu saptanmıştır (33). MDR1 aracılı direncin önemli bir sorun olduğu metastatik meme kanseri olan hasta grubuyla yapılan Ranson MR ve ark.'ın çok merkezli faz II (34) ve O'Brien MER ve ark.'ın faz III çalışmasında (35) lipozomal doksorubisin, etkinliğinin yakın olması; ancak düşük toksisitesi nedeniyle doksorubisine alternatif olarak önerilmesine yol açmıştır. İlgili çalışmada, yanıt oranları doksorubisine kıyasla daha düşük bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da, literatürle uyumlu bir şekilde, doksorubisinin hem standart kültür ortamında hem rifampin ile MDR1 ekspresyonu arttırılmış hücrelerde lipozomal doksorubisine göre hücre ölümünde daha etkili olduğu görülmüştür. Bu durum, lipozomal taşıyıcıların hücresel ve ortam şartlarından etkilenen salınım mekanizmalarının farklılaşmasına bağlanabilir (36). Bu açıdan, literatürde de tartışılan farklı taşıyıcıların aynı modelde sınanması önerilmektedir.

Çalışmamızın bir diğer sorusu metodolojiktir. Hücre davranışlarını değerlendirmekte sıklıkla kullandığımız iki boyutlu hücre kültürlerinin literatürde en fazla eleştirildiği nokta in vivo çalışmalarıyla zaman zaman çelişen sonuçlarıdır. Bu bağlamda, iki boyutlu hücre kültürlerinin in vivo doğal yapısını ve mikroçevresini iyi temsil etmediği, bu açıdan hücre davranışını değerlendiren çalışmaların üç boyutlu ya da organoid türde in vitro modellerle yapılması gerektiği önemle vurgulanmaktadır. Üç boyutlu hücre kültürünün in vivo doku yapısını ve hücresel yanıtları daha iyi yansıttığı bilinmektedir. Ayrıca, kanser tedavileri bireye özgü hedeflenmiş tedaviye doğru ilerledikçe, üç boyutlu kültürün iki boyutlu kültürde saptanamayan yeni hedeflerin belirlenmesinde de faydalı olacağı düşünülmektedir (37). Birçok çalışmada, üç boyutlu kültürde yetişen hücrelerin iki boyutlu yetişen hücrelere göre anti-kanser ilaçlarına daha dirençli olduğu gösterilmiştir. Karlsson ve ark.'ın HCT-116 kolorektal kanser hücre hattı ile yaptığı çalışmada, standart tedavide kullanılan dört farklı anti-kanser ilacı denenmiş ve tüm ilaçların iki boyutlu kültürde yüksek derecede aktivite gösterirken, üç boyutlu kültürde aktivitelerini kademeli olarak kaybettikleri saptanmıştır (38). Bu yüzden, çalışmamıza doku yapısını daha iyi yansıttığı bilinen üç boyutlu hücre kültürü de

dahil edilmiştir. Bu amaçla üç boyutlu pellet modeli kullanılmış ve üç boyutlu yapının elde edildiği parafin kesit alınarak gösterilmiştir. Uygulanan dozlarda, üç boyutlu kültürde iki boyutluya göre ilaç direncinin daha fazla olduğu ve IC50 değerlerinin anlamlı oranda arttığı saptanmıştır. Ayrıca, MDR1 aracılı gelişen dirence karşı ilaç etkinliğinin bu hücrelerde çalışılması için hücreler iki gruba ayrılmıştır. Bir grup standart kültür ortamında büyütülürken, diğer gruba rifampin uygulanmıştır. Uygulanan dozlarda, rifampin ile muamele edilen grupta standart kültür ortamında yetiştirilen hücrelere göre ilaç direncinin daha fazla olduğu ve IC50 değerlerinin anlamlı oranda arttığı saptanmış, direnç gelişimi üç boyutlu kültürde de doğrulanmıştır. Doksorubisinin hem standart kültür ortamında yetiştirilen hem de rifampin ile muamele edilen hücrelerde lipozomal doksorubisine göre daha etkili olduğu görülmüştür. Ancak; iki boyutlu kültürde lipozomal doksorubisinde daha yüksek direnç görülürken, üç boyutlu kültürde doksorubisinde daha yüksek direnç saptanmıştır.

Şimdiye kadar dediferansiye kondrosarkom üzerine yapılmış çalışmaların çoğunluğunu vaka sunumları oluşturmaktadır. Tedavi üzerine yapılan çalışmalar ise klinik çalışmalar olup uygulanan tedavi ve sağkalıma etkileri üzerine retrospektif veriler içermektedir. Bu çalışmalar sonucunda da hala etkin bir tedavi saptanamamıştır. Dediferansiye kondrosarkom hücre hattı üzerine tek bir in vitro ilaç (Diacerin) çalışması yapılmıştır (39). Bu çalışmada yüksek dozda büyümeyi azaltıcı etki elde edilse de, apoptotik etki sağlanamamıştır. Çalışmamızda, hem doksorubisin hem de lipozomal doksorubisinin kontrol ile kıyaslandığında belirgin apoptotik etkisi gösterilmiştir.

Kondrosarkom hücre hattında direncin aşılmasına yönelik nanopartikülle yapılmış çok az klinik çalışma olmakla birlikte yalnızca üç in vitro çalışma bulunmaktadır (40, 41, 42); ancak lipozomal taşıyıcı kullanılan çalışma bulunmamaktadır. Dediferansiye kondrosarkomda ise nanopartikül kullanımına yönelik in vitro çalışma bulunmamaktadır. Literatürde ilk kez bu çalışma ile dediferansiye kondrosarkomda iki ve üç boyutlu kültür modelinde lipozomal doksorubisin denenerek etkinliği ve kullanım avantajı olup olmadığı araştırılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, tedavi direnci yüksek olan kondrosarkom hücrelerinden en agresif ve sağkalım oranı düşük olan dediferansiye kondrosarkomda, ilaç direncinin nedenlerinden biri olan MDR1 ekspresyonunun artışına bağlı olarak ortaya çıkan direncin, ilacı efflux proteininin substratı olmaktan kurtardığı bilinen lipozomal taşıyıcılarla hücreye iletildiğinde aşılp aşılamayacağı araştırılmıştır.

Ayrıca, in vivo doku yapısını daha doğru temsil eden üç boyutlu in vitro modelde, bu hücresel davranışın değişiklik gösterip göstermeyeceği değerlendirilmiştir.

Araştırmamız sonucunda, dediferansiye kondrosarkomda MDR1 ekspresyonu artırılarak doksorubisine karşı ilaç direnci sağlanmıştır. Çalışmamız, literatürde bunu gösteren ilk çalışmadır.

Ayrıca, dediferansiye kondrosarkomda üç boyutlu pellet modeli başarılı olarak uygulanarak üç boyutlu yapı elde edilmiştir. İki boyutlu hücre kültürüne göre, üç boyutlu kültürde hücrelerin ilaç uygulamasına daha dirençli olduğu görülmüştür. Bu durum, iki boyutlu kültürün in vivo yapıyı yansıtmadığını kanıtlar niteliktedir. Sonuçlarımız literatürle uyumlu bulunmuştur.

Dediferansiye kondrosarkomda lipozomal doksorubisin kullanımı, doksorubisine oranla daha az olmakla birlikte, hücre çoğalmasının inhibe etmiştir. Aynı zamanda, IC50 dozundan düşük dozlarda bile apoptotik etki gösterilmiştir. Ancak, efflux proteini ekspresyonu artırılarak sağlanan direncin aşılmasında etkin bulunmamıştır. Burada, oluşan ilaç direncinin efflux protein ekspresyonundan başka nedenleri de olabileceği gibi; lipozomal taşıyıcıların ortam şartlarına bağlı olarak değişen salınım mekanizmaları da etkin olabilir.

Bu açıdan, standardize edilen araştırma modelimizde doksorubisinin farklı nanotaşıyıcılar ile enkapsüle edilerek çalışılması planlanmıştır. Ayrıca, nanopartikül dizaynında dirence neden olan diğer faktörlerin de paralel olarak değerlendirildiği kapsamlı bir çalışmanın yapılması önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Bindiganavile S, Han I, Yun JY, Kim HS. Long-term outcome of chondrosarcoma: a single institutional experience. *Cancer Res Treat*. 2015;47(4): 897-903.
2. Kim MJ, Cho KJ, Ayala AG, Ro JY. Chondrosarcoma: with updates on molecular genetics. *Sarcoma*. 2011;405-437.
3. Gelderblom H, Hogendoorn PC, Dijkstra SD, van Rijswijk CS ve ark. The clinical approach towards chondrosarcoma. *Oncologist*. 2008;13(3): 320-9.
4. Dai X, Ma W, He X, Jha RK. Review of therapeutic strategies for osteosarcoma, chondrosarcoma, and Ewing's sarcoma. *Med Sci Monit*. 2011;17(8): 177-90.
5. van Oosterwijk JG, Herpers B, Meijer D, Briaire-de Bruijn IH ve ark. Restoration of chemosensitivity for doxorubicin and cisplatin in chondrosarcoma in vitro: BCL-2 family members cause chemoresistance. *Ann Oncol*. 2012;23(6): 1617-26.
6. Chen-Ming Su, Yi-Chin Fong, Chih-Hsin Tang. An overview of current and future treatment options for chondrosarcoma *Expert Opinion on Orphan Drugs*. 2014;2(3).
7. Italiano A, Mir O, Cioffi A, Palmerini E ve ark. Advanced chondrosarcomas: role of chemotherapy and survival. *Ann Oncol*. 2013;24(11): 2916-22.
8. Bruns J, Fiedler W, Werner M, Delling G. Dedifferentiated chondrosarcoma—a fatal disease. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005;131(6): 333-9.
9. Mitchell AD, Ayoub K, Mangham DC, Grimer R ve ark. Experience in the treatment of dedifferentiated chondrosarcoma. *J Bone Joint Surg Br*. 2000;82(1): 55-61.
10. Yokota K, Sakamoto A, Matsumoto Y, Matsuda S ve ark. Clinical outcome for patients with dedifferentiated chondrosarcoma: a report of 9 cases at a single institute. *J Orthop Surg Res*. 2012;10: 7-38.
11. Kindblom LG. Bone tumors: epidemiology, classification, pathology. In: Davies M, Sundaram M, James S, editors. *Imaging of bone tumors and tumor-like lesions*. 4th ed. Berlin: Springer; 2009. p. 1–15
12. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA, editors. *SEER cancer statistics review, 1975-2013*. Bethesda, National Cancer Institute; 2016. URL: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013

13. Franchi A. Epidemiology and classification of bone tumors. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*. 2012;9(2): 92-95.
14. Fletcher C.D.M, Unni K.K, Mertens F. editors: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. Lyon: IARC Press; 2002.
15. Shmookler B, Bickels J, Jelinek J, Sugarbaker P, Malawer M (editors). Bone and soft-tissue sarcomas: epidemiology, radiology, pathology and fundamentals of surgical treatment. *Musculoskeletal Cancer Surgery*. The Netherlands: Springer; 2001. p. 3-35.
16. The ESMO/European Sarcoma Network Working Group. Bone sarcomas: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2014;25(Supplement 3): 113–23.
17. Mavrogenis AF, Gambarotti M, Angelini A, Palmerini E ve ark. Chondrosarcomas revisited. *ORTHOPEDICS*. 2012;35(3): e379-90.
18. Mavrogenis AF, Ruggieri P, Mercuri M, Papagelopoulos PJ. Dedifferentiated chondrosarcomas revisited. *J Surg Orthop Adv*. 2011;20(2): 106-11.
19. Wyman JJ, Hornstein AM, Meitner PA, Mak S ve ark. Multidrug resistance-1 and p-glycoprotein in human chondrosarcoma cell lines: expression correlates with decreased intracellular doxorubicin and in vitro chemoresistance. *J Orthop Res*. 1999;17(6): 935-40.
20. Terek RM, Schwartz GK, Devaney K, Glantz L ve ark. Chemotherapy and P-glycoprotein expression in chondrosarcoma. *J Orthop Res*. 1998;16(5): 585-90.
21. Naidu MUR. Promise of translational medicine: An evidence-based therapeutics. *Indian J Pharmacol*. 2011;43(2): 103–104.
22. Yao Q, Lyu PH, Ma FC, Yao L et al. Global informetric perspective studies on translational medical research. *BMC Med Inform Decis Mak*. 2013;26(13) :77-89.
23. Wild CP, Bucher JR, de Jong BW, Dillner J, et al. Translational cancer research: balancing prevention and treatment to combat cancer globally. *J Natl Cancer Inst*. 2014;107(1):353-357.
24. Berry DA, Herbst RS, Rubin EH. Reports from the 2010 Clinical and Translational Cancer Research Think Tank meeting: design strategies for personalized therapy trials. *Clin Cancer Res*. 2012;18(3): 638-44.
25. Min Y, Caster JM, Eblan MJ, Wang AZ. Clinical translation of nanomedicine. *Chem Rev*. 2015;115(19): 11147-90.

26. Bregoli L, Movia D, Gavigan-Imedio JD, Lysaght J, et al. Nanomedicine applied to translational oncology: A future perspective on cancer treatment. *Nanomedicine*. 2016;12(1): 81-103.
27. Tomuleasa C, Braicu C, Irimie A, Craciun L, et al. Nanopharmacology in translational hematology and oncology. *Int J Nanomedicine*. 2014;9: 3465-79.
28. Monderer D, Luseau A, Bellec A, David E ve ark. New chondrosarcoma cell lines and mouse models to study the link between chondrogenesis and chemoresistance. *Lab Invest*. 2013;93(10): 1100-14.
29. Centola M, Tonnarelli B, Schären S, Glaser N ve ark. Priming 3D cultures of human mesenchymal stromal cells toward cartilage formation via developmental pathways. *Stem Cells Dev*. 2013;22(21): 2849-58.
30. Bradley T, Guilak E, Guilak F. Three-dimensional culture systems to induce chondrogenesis of adipose-derived stem cells. *Methods Mol Biol*. 2011; 02: 201–17.
31. Haslam IS, Jones K, Coleman T, Simmons NL. Rifampin and digoxin induction of MDR1 expression and function in human intestinal (T84) epithelial cells. *British Journal of Pharmacology*. 2008;154: 246–55.
32. Xia CQ, Smith PG. Drug efflux transporters and multidrug resistance in acute leukemia: therapeutic impact and novel approaches to mediation. *Mol Pharmacol*. 2012;82(6): 1008-21.
33. Garcia AA, Kempf RA, Rogers M, Muggia FM. A phase II study of Doxil (liposomal doxorubicin): lack of activity in poor prognosis soft tissue sarcomas. *Annals of Oncology*. 1998;9: 1131-3.
34. Ranson MR, Carmichael J, O'Byrne K, Stewart S ve ark. Treatment of advanced breast cancer with sterically stabilized liposomal doxorubicin: results of a multicenter phase II trial. *J Clin Oncol*. 1997;15: 3185-91.
35. O'Brien MER, Wigler N, Inbar M, Rosso R ve ark. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX™/Doxil®) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*. 2004;15: 440-9.
36. Shibata H, Izutsu K, Yomota C, Okuda H ve ark. Investigation of factors affecting in vitro doxorubicin release from PEGylated liposomal doxorubicin for the development of in vitro release testing conditions. *Drug Dev Ind Pharm*. 2015;41(8): 1376-86.

37. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol.* 2014;12(4): 207-18.
38. Karlsson H, Frykna's M, Larsson R, Nygren P. Loss of cancer drug activity in colon cancer HCT-116 cells during spheroid formation in a new 3D spheroid cell culture system. *Exper Cell Res.* 2012;318: 1577–85.
39. Lohberger B, Leithner A, Stundl N, Kaltenegger H ve ark. Diacerein retards cell growth of chondrosarcoma cells at the G2/M cell cycle checkpoint via cyclin B1/CDK1 and CDK2 downregulation. *BMC Cancer.* 2015;10(15): 891-902.
40. Liu R, Wolinsky JB, Catalano PJ, Chirieac LR ve ark. Paclitaxel-eluting polymer film reduces locoregional recurrence and improves survival in a recurrent sarcoma model: a novel investigational therapy. *Ann Surg Oncol.* 2012;9(1): 199-206.
41. Sha B, Gao W, Han Y, Wang S ve ark. Potential application of titanium dioxide nanoparticles in the prevention of osteosarcoma and chondrosarcoma recurrence. *J Nanosci Nanotechnol.* 2013;13(2): 1208-11.
42. Miot-Noirault E, Vidal A, Morlieras J, Bonazza P ve ark. Small rigid platforms functionalization with quaternary ammonium: targeting extracellular matrix of chondrosarcoma. *Nanomedicine.* 2014;10(8): 1887-95.

8. EKLER

8.1. Etik Kurul Onayı





MEDİPOL
UNV
İSTANBUL MEDİPOL
ÜNİVERSİTESİ

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-604.01.01-E.3216

Konu : Etik Kurulu Kararı

28/10/2015

Sayın Prof. Dr. İlhan ÖZTOP

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Translasyonel Bireye Özgü Bir Tedavi Modeli Olarak Dediferansiye Kondrosarkomlarda İn Vitro İlaç Direncinin Nanopartikül Bağlı Hedeflenmiş Moleküllerle Aşılması” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

EK:
-Karar Formu (2 sayfa)

İmza Belgesi 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 28.10.2015 tarihinde e-imzalanmıştır.
Doğrulama Kodu: <http://chys.medipol.edu.tr/e-imza/confirmationCodeDocumentViewer.aspx?Code=0F31DB53X8>

Kavacık Mahallesi Ekinciler Caddesi No: 19 Beykoz / İSTANBUL
Tel: (216) 681 5100 Faks: (212) 531 7555

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR
FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Translasyonel Bireye Özgü Bir Tedavi Modeli Olarak Dediferansiye Kondrosarkomlarda İn Vitro İlaç Direncinin Nanopartikül Bağlı Hedeflenmiş Moleküllerle Aşılması			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. İlhan ÖZTOP			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Onkoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İzmir			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	05.10.2015		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	05.10.2015		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
Karar Bilgileri	Karar No: 493		Tarih: 28/10/2015	
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Tangül MÜDOK	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Emir YÜZBAŞIOĞLU	Protetik Diş Tedavisi	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Yrd. Doç. Dr. İlknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Muhammed Fatih EVCİMİK	Kulak-Burun Boğaz	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	

* Toplantıda Bulunma

8.2. Özgeçmiş

TC Kimlik No / Pasaport No:	22306336836
Doğum Yılı:	1990
Yazışma Adresi :	Metin Oktay mah. 108/36 sk. No:40 D:1 Hıfzıssıhha-Karabağlar /İzmir
Telefon :	0555 600 86 41
Faks :	
e-posta :	ececkroglu@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Temel Onkoloji		2017
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji		2013

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Temel Onkoloji Anabilim Dalı	Proje elemanı	2014-2017
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Temel Onkoloji Anabilim Dalı	Bursiyer	Kasım 2015-Eylül 2016

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Hücre kültürü, üç boyutlu hücre kültürü, ilaç direnci, Sanger sekans, Pyrosekans

YAYINLARI

Diğer dergilerde yayımlanan makaleler

İnciraltı Kampüsünde Biyoistatistik ve Biyoinformatik Program Kullanım Sıklığı ve Farkındalığı. DEÜ TIP FAKÜLTESİ DERGİSİ, CİLT 28, SAYI 2, AĞUSTOS 2014, 45 – 50

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Prospective, Observatonal Nationwide Study on Pharmacogenomics/Genetics of Childhood Cancers in a Cohort of Turkish Paediatric Oncology Group (TURKPEDGX). 48th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) (19-22 Ekim 2016), Dublin, İrlanda, Poster Sunumu

IGR-39 MELANOMA HÜCRE HATTI ÜZERİNDE İZMİR KEKİĞİ (ORIGANUM ONITES) EKSTRESİNİN ANTİKANSER ÖZELİKLERİ. X. ÖÇM Sempozyumu (221 Eylül 2016), İzmir, Türkiye, Poster Sunumu

TURKEY CHILDHOOD CANCERS PHARMACOGENOMICS / GENETICS (TURKPEDPGX) STUDY TPOG COHORT. XIX. National Pediatric Cancer Congress (Mayıs 2016) İzmir, Türkiye, Sözlü Bildiri

Pro-inflammatory Effects of Carvacrol on Staphylococcus aureus. 6th Southeast European Conference on Chemotherapy and Infection. (13-15 Kasım 2015), Thessaloniki, Greece, Poster Sunumu

Role of RAS/RAF/MAP Kinase Pathway in Personalized Cancer Management of Metastatic Colorectal Cancer. 2nd International Medical Congress for Student and Young Doctors (6-7 Kasım 2015), Bakü, Azerbeycan, Sözlü Bildiri

In vitro Systems in Cancer Research. 2nd International Medical Congress for Student and Young Doctors (6-7 Kasım 2015), Bakü, Azerbeycan, Sözlü Bildiri

Baş Boyun Kanseri Hücre Hattında Fitokimyasalların Anti Kanser Özelliklerinin Araştırılması. IX. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu (Eylül 2015), İzmir, Türkiye, Poster Sunumu
Hekimlerin Biyoinformatik ve Tıbbi Bilişim Alanındaki Farkındalıkları. IX. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu (Eylül 2015), İzmir, Türkiye, Poster Sunumu
Kanser Araştırmalarında Sık Kullanılan Biyoinformatik Veri Tabanları. IX. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu (Eylül 2015), İzmir, Türkiye, Poster Sunumu
Kolorektal Kanser Hücre Hattında İlaç Adayı Olarak Morus nigra Ekstraktı Ve Etken Maddelerinin Rolü. IX. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu (Eylül 2015), İzmir, Türkiye Poster Sunumu
Türk Toplumunda Gastro-İntestinal Stromal Tümörlerde PDGFRA Mutasyon Dağılımı. 10. Onkolojik Araştırmalar Çalıştayı (6-9 Kasım 2014) Antalya, Türkiye

8.3. Tez destek mektubu



05.01.2017

İLGİLİ MAKAMA

Aşağıda bilgileri verilmiş olan proje Tailor of Science Biyoteknoloji İnovasyon A.Ş. araştırma laboratuvarlarında TSCI.Project.002 proje numarası ile yürütülmüş ve desteklenmiştir.

Proje Adı: Translasyonel bireye özgü bir tedavi modeli olarak dediferansiye kondrosarkomlarda in vitro ilaç direncinin nanopartikül bağlı hedeflenmiş moleküllerle aşılması (Ece Çakıroğlu, Yüksek lisans tez projesi)

Proje Çalışanları:

Tez Öğrencisi: Ece Çakıroğlu

Tez Danışmanı: Prof.Dr.İlhan Öztop

Araştırmacılar: Doç.Dr.Yasemin Baskın (İkinci danışman), Doç.Dr.Kerim Yapıcı, Doç.Dr.Türkan Yiğitbaşı, Arş.Gör.Gizem Çalıbaşı Koçal, , Tuğba Uysal, Mahdi Akbarpour

Proje Başlangıç- Bitiş Tarihleri: 28.10.2015- 20.12.2016

Doç.Dr.Yasemin BASKIN

Tailor of Science Biyoteknoloji İnovasyon A.Ş.

Dokuz Eylül Üniversitesi İnciraltı Yerleşkesi Mithatpaşa Cad. No: 56-20 Depark Sağlık Zeytin Binası Ofis : B05-D Balçova / İZMİR
Tel : (+90) 232 259 10 59 Fax : (+90) 232 259 10 59 Web : www.tsbiotechnology.com e-mail : info@tsbiotechnology.com
İş Bankası 9 Eylül Üniv.İZMİR Ş.Kodu : 3481 TL IBAN NO : TR26 0006 4000 0013 4810 1876 36
İş Bankası 9 Eylül Üniv.İZMİR Ş.Kodu : 3481 Dolar IBAN NO : TR54 0006 4000 0023 4810 1145 71
İş Bankası 9 Eylül Üniv.İZMİR Ş.Kodu : 3481 Euro IBAN NO : TR64 0006 4000 0023 4810 1145 85
Balçova V.D. : 8160 5723 85 Ticaret Sicil No: 182044 Mersis No: 2142334179658106