

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

OVCAR-3 OVARIAN ADENOKARSİNOMA HÜCRE
HATTINDA SİSPLATİN, PAKLİTAKSEL İLE ALFA LİPOİK
ASİT ANTIOKSİDAN BİLEŞİĞİN TEKLİ VEYA
KOMBİNASYONLAR ŞEKLİNDE UYGULANMASININ ANTI-
KANSER ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. HATİCE ŞİYZEN ÇOBAN

DANIŞMAN
PROF. DR. GÜLÇİN METE

DENİZLİ – 2022

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

OVCAR-3 OVARIAN ADENOKARSİNOMA HÜCRE
HATTINDA SİSPLATİN, PAKLİTAKSEL İLE ALFA LİPOİK
ASİT ANTIOKSİDAN BİLEŞİĞİN TEKLİ VEYA
KOMBİNASYONLAR ŞEKLİNDE UYGULANMASININ ANTI-
KANSER ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. HATİCE ŞİYZEN ÇOBAN

DANIŞMAN
PROF. DR. GÜLÇİN METE

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 21.01.2021 tarih ve
2021TIPF002 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ – 2022

TEŞEKKÜR

Pamukkale Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalındaki uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile eğitimime katkı sağlayan, tezimin hazırlanması süresinde değerli katkıları ve emekleriyle yardımını esirgemeyen, beni yönlendiren kıymetli hocam, tez danışmanım Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Gülçin METE'ye,

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan değerli hocalarım Prof. Dr. Hülya Çetin, Prof. Dr. Saim Özdamar, Doç. Dr. Nazan Keskin, Doç. Dr. Nazlı ÇİL'e, Dr. Öğr. Üyesi M. Serkant ÜNAL'a,

Asistanlığımın başlangıcından bugüne kadar beraber çalışmış olduğum tüm asistan arkadaşlarım ve anabilim dalı çalışanlarımıza,

Tez deneylerinde yanımda olan Araş. Gör. Dr. Mücahit SEÇME ve Araş. Gör. Dr. Elif ÖNDER'e,

Katkılarından dolayı Araş. Gör. Dr. Fatih ALTINTAŞ ve Araş. Gör. Dr. Gizem KABASAKAL'a

Hayatımın her döneminde koşulsuz yanımda olan, güven kaynaklarım ve en büyük mutluluk sebeplerim, hayat ışıklarım sevgili annem Ayşe ÇOBAN ve babam Mustafa Kenan ÇOBAN'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
TABLOLAR DİZİNİ	XV
ÖZET	XVI
SUMMARY	XIX
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
OVER ANATOMİSİ	3
OVER EMBRİYOLOJİSİ	4
OVER HİSTOLOJİSİ	6
OVER KANSERİ	9
1. Epidemiyoloji	9
2. Over Kanseri Sınıflandırması	11
<i>Seröz Karsinomlar</i>	12
<i>Endometrioid</i>	14
<i>Berrak Hücreli</i>	14
<i>Müsinöz</i>	14
<i>Diğer Karsinomlar</i>	15
3. Patogenez	15
4. Risk Faktörleri	20
5. Klinik Belirtiler, Tarama ve Tanı	21
6. Evreleme	23
7. Over Kanserinde Prognoz	24
8. Over Kanserinde Tedavi	25
SİSPLATİN	27
PAKLİTAKSEL	28

ALFA LİPOİK ASİT	29
MATERYAL VE METOD	34
ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİMYASALLAR VE SARF	
MALZEMELER	34
ÇALIŞMALARDA KULLANILAN CİHAZLAR	34
ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİTLER	35
OVCAR-3 HÜCRE HATTININ TEMİNİ VE HÜCRE KÜLTÜRÜ	35
XTT TESTİ (HÜCRE CANLILIĞI TESTİ).....	37
TRİZOL REAGENT İLE TOTAL RNA İZOLASYONU.....	38
CDNA SENTEZİ.....	39
GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (REAL-	
TİME PCR, RT-PCR).....	40
ELİSA DENEYİ	43
Human Phospho-AKT ELISA Kit:.....	43
Human Phospho-Mammalian target of rapamycin ELISA Kit:.....	45
Human phospho forkhead box O1 ELISA Kit:	46
Human Mitogen activated protein kinase ELISA Kit:	47
İNVAZYON KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ (MATRİGEL	
İNVAZYON TESTİ).....	48
KOLONİ OLUŞUM DENEYİ	49
YARA İYİLEŞME (WOUND HEALİNG) DENEYİ.....	50
TAS (TOTAL ANTİOKİDANT STATUS) VE TOS (TOTAL OKİDANT STATUS)	
DENEYİ.....	50
ANNEXIN V İLE APOPTOZ TESPİTİ.....	52
TUNEL TESTİ İLE APOPTOZ TAYİNİ	53
VERİLERİN İSTATİSTİKSEL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ	
BULGULAR.....	56
XTT TESTİ (HÜCRE CANLILIĞI TESTİ) SONUÇLARI.....	56
TRİZOL REAGENT İLE TOTAL RNA İZOLASYONU SONUÇLARI	
.....	58
GERÇEK-ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-	
PCR) SONUÇLARI	58

ELISA DENEYİ SONUÇLARI	60
KOLONİ OLUŞUM DENEYİ	62
WOUND HEALİNG DENEYİ SONUÇLARI.....	63
MATRİGEL İNVAZYON TESTİ SONUÇLARI.....	64
OKSİDATİF STRES DÜZEYİNİN TOTAL OKSİDAN (TOS) VE TOTAL ANTİOKSİDAN (TAS) SEVİYE ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ.....	65
ANNEXIN V İLE APOPTOZ TESPİTİ.....	67
TUNEL TESTİ İLE APOPTOZ TAYİNİ	68
TARTIŞMA.....	70
SONUÇ	80
KAYNAKLAR	81

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C: Santigrat Derece

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

µM: Mikromolar

2D: 2 Boyutlu

AIF: Apoptozis indükleyici faktör

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome

AKT: Serin/Treonin Protein Kinaz, protein kinaz B

ALA: Alfa Lipoik Asit

AMP: Adenosin Monofosfat

AMPK: 5'AMP ile Aktive Olan Protein Kinaz

Annexin-V-FITC / PI: Annexin-V-Floresanin İzotiyosiyanat / Propidyum İyodür

ARID1A: AT Bakımından Zengin, Etkileşim Alanı İçeren 1A

ATP: Adenosin Trifosfat

BSA: Bovine Serum Albumin

BI: Biological Industries

Bax: Bcl-2-associated X protein

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large

BT: Bilgisayarlı Tomografi

CA 125: serum kanser antijeni 125

CA 19-9: serum kanser antijeni 19-9

Ca⁺²: Kalsiyum iyonu

CCNE1: Cyclin E1

cDNA: Komplementer (Tamamlayıcı) Deoksiribo Nükleik Asit

CDK: Cyclin-dependent kinase

CEA: Serum karsinoembriyonik antijen

CK7: cytokeratin 7

CK20: cytokeratin 20

CTNNB1: Catenin Beta-1
cm: Santimetre
CO₂: Karbondioksit
Cq: quantification cycles
dk: Dakika
DAB: 3,3'-Diaminobenzidine
DEPTOR: DEP Domain Containing MTOR Interacting Protein
DMSO: Dimetil Sülfoksit
DNA: Deoksiribo Nükleik Asit
4E-BP1: 4E binding protein 1
dUTP: 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate
EGFR: epidermal büyüme faktörü reseptörü
eIF4E: ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMT: Epitelden mezenkime geçiş
EOK: Epitelyal Over Kanseri
ER: Östrojen Reseptörü
ERBB2: Erb-B2 Reseptörü Tirozin Kinaz 2
ERK: extracellular signal-regulated kinase
FBS: Fötal Bovin Serum
FDA: ABD Gıda ve İlaç Dairesi
FIGO: Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu
FSH: Folikül Stimüle Edici Hormon
GAPDH: Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrojenaz
Grb2: Growth Factor Receptor Bound Protein 2
GSH: indirgenmiş glutatyon
GSH-Px: glutatyon peroksidaz
GSK3 β : Glikojen Sentaz Kinaz 3-Beta
GSSG:okside glutatyon
HER-2 / Neu: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 /c-erbB-2
HIPEC: Isıtılmış intraperitoneal kemoterapi
HNPCC: hereditary nonpolyposis colorectal cancer, Lynch sendromu

HPV: İnsan papilloma virüsü
HRP enzyme: horseradish peroxidase enzyme
IC₅₀ (LD₅₀) : the half maximal inhibitory concentration-Letal Doz 50
kDa: kilo Dalton
KGDG: α - keto gluterat dehidrogenaz
KRAS: Kirsten Rat Sarcoma Virus
KT: Kemoterapi
L: Litre
LH: Luteinize Edici Hormon
Lig.: Ligamentum
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
Mcl-1: Myeloid cell leukemia-1
MDR: multidrug resistance mutation
ml: Mililitre
mLST8: mammalian lethal with SEC13 protein 8
mM: Milimolar
MMP: Matriks metalloproteinaz
MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme
mRNA: Mesajcı Ribo Nükleik Asit
MLH-1: MutL Homolog1
MOSEC: Mouse ovarian surface epithelial cells
MSH-2: MutS Homolog2
mTOR: Mammalian Target of Rapamycin
mTORC1/2: Mammalian Target of Rapamycin Complex 1/2
NF1: Neurofibromatosis type 1
NF- κ B: nuclear factor kappa B
ng: Nanogram
nm: Nanometre
nM: Nanomolar
Oct-4: Octamer-binding transcription factor 4
OD: Absorbans Değerleri
OSI: oksidatif stres indeksi

PAX8: Paired Box Gene 8
p53, TP53: Tümör Protein 53
p-AKT: phosphorylated Akt
p-FOXO1: phosphorylated forkhead box O1
p-mTOR: phosphorylated mammalian target of rapamycin
PARPi: Poli ADP-riboz polimeraz inhibitörü
PS: fosfatidil serin
PBS: Phosphate buffered saline
PDG: Piruvat dehidrojenaz
PDK1: fosfoinositide bağımlı protein kinaz-1
PI: Fosfatidilinositol
PIP2: fosfatidilinositol bifosfat (4,5)
PIP3: fosfatidilinositol trifosfat (3,4,5)
PI3K: Phosphatidylinositol-3-kinase
PIK3CA: Fosfatidilinositol-4,5-Bisfosfat 3-Kinaz Katalitik Alt Birim Alfa
PLC γ 1: fosfolipaz C Gamma 1
pM: Pikomolar
pmol: Pikomol
PPP2R1A: Protein Phosphatase 2, Regulatory Subunit A
PR: Progesteron Reseptörü
PTEN: phosphatase and tensin homolog
PTP1B: protein tyrosine phosphatase 1B
Raptor: regulatory associated protein of mTOR
Rb 1: Retinoblastoma 1
RICTOR: RPTOR independent companion of MTOR
RNA: Ribo Nükleik Asit
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
RPM: Dakikadaki Devir Sayısı
RPMI: Roskuyucuklu Park Memorail Institute
RT: Revers Transkriptaz Enzimi
RT-PCR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SHP2: Src homology-2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2

SIN 1: Mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1

sn: Saniye

sp: Sapma

std: Standart

STIC: Seröz tubal intraepitelyal karsinom

TAS: Total Antioxidant Status

TOS: Total Oxidant Status

TCA: Trikarboksilik asit döngüsü

TdT: terminal deoxynucleotidyl transferase

TGF- β : Dönüştürücü büyüme faktörü β

TNF: Tümör Nekroz Faktör

TKR: Tirozin kinaz reseptör

TRPA1: transient receptor potential-TRP ankyrin 1

TSC 1/2: tuberous sclerosis complex 1/2

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

U: Universal Unite

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ZEB 1: Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1

ZP3: Zona pellucida sperm-binding protein 3

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

WT 1: Wilms' tumor 1

WTp53: wild type p53

XTT:2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl) 2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa no

Şekil 1. A) Over dokusunun genel görünümü, B) Kortekste primordiyal, primer foliküller (oklar). Hematoksilen&eoizin X40, X200	6
Şekil 2. Over kanserinde morfolojik heterojenlik ve ilişkili mutasyonlar (29)	11
Şekil 3. PI3K/AKT/Mtor yolağı	19
Şekil 4. ALA kimyasal yapısı	30
Şekil 5. ALA'nın tümör oluşumunda yer alan sinyal yolları ve apoptoz üzerindeki etkileri (16).....	32
Şekil 6. ALA'nın tümör oluşumunda yer alan sinyal yolları üzerindeki etkileri (Yeşil oklar ve çerçeve aktivasyonu; kırmızı oklar ve çerçeveler inhibisyonu gösterir).....	33
Şekil 7. Çalışmamızda kullandığımız OVCAR-3 hücrelerinin 4X inverted mikroskopik görüntüsü	35
Şekil 8. ALA'nın çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi	56
Şekil 9. Sisplatinin çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi	57
Şekil 10. Paklitakselin çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi	57
Şekil 11. Kombine dozun zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi.....	58
Şekil 12. A) P-AKT ve B) P-MTOR C) P-FOXO D) MAPK ELISA sonuçları sütun grafiği	62
Şekil 13. OVCAR-3 hücrelerinde kontrol ve ALA doz gruplarında koloni sayıları .	63
Şekil 14. OVCAR-3 hücrelerinde kontrol ve ALA doz gruplarında koloni görüntüsü	63
Şekil 15. Wound healing deneyi 0-16-24-48. saat sonuçları (4X).....	64
Şekil 16. Kontrol, ALA, Sisplatin+Paklitaksel ve ALA+Sisplatin+Paklitaksel gruplarında invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)	65
Şekil 17. OVCAR-3 hücrelerinde kontrol grubuna göre kontrol ve doz gruplarında TAS, TOS, OSİ değerleri	67

Şekil 18. TUNEL ile A)'da ALA+Sisplatin+Paklitaksel B)'de Sisplatin+Paklitaksel C) ALA D) Kontrol doz uygulamalarının immünoreaktivite gösteren OVCAR-3 hücrelerinin ışık mikroskop görüntüleri, A, B, C, D: 200X, immünoperoksidaz&hematoksilen..... 69

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa no
Tablo 1. Over kanseri ile ilişkili risk faktörleri	21
Tablo 2. FIGO over kanseri evrelemesi	23
Tablo 3. Over kanserinde kötü prognostik faktörler	25
Tablo 4. RT-PCR’da analiz edilen genlerin primer listesi	41
Tablo 5. RT-PCR reaksiyon karışımı	43
Tablo 6. Ana stok standart çözeltinin seyreltilmesi.....	44
Tablo 7. Ana stok standart çözeltinin seyreltilmesi.....	45
Tablo 8. Ana stok standart çözeltinin seyreltilmesi.....	46
Tablo 9. Ana stok standart çözeltinin seyreltilmesi.....	47
Tablo 10. Aşağıdaki sırayla kit içeriği rezervuarda pipetlenir:	51
Tablo 11. Aşağıdaki sırayla kit içeriği rezervuarda pipetlenir:	51
Tablo 12. Kit bileşenleri	53
Tablo 13. RT-PCR sonucuna göre ALA ve kombinasyon gruplarındaki değişiklik gösteren genler.	59
Tablo 14. ELISA kontrol ve doz grupları sonuçları	62
Tablo 15. OVCAR-3 hücrelerinde kontrol ve doz gruplarının TAS, TOS ve OSİ değerleri.....	66
Tablo 16. OVCAR-3 hücrelerinde Annexin V ile apoptoz tespiti deneyinde kontrol, H ₂ O ₂ , ALA, Sisplatin+Paklitaksel ve ALA+Sisplatin+Paklitaksel doz uygulamalarının sonuçları.....	68

ÖZET

OVCAR-3 OVARIAN ADENOKARSİNOMA HÜCRE HATTINDA SİSPLATİN, PAKLİTAKSEL İLE ALFA LİPOİK ASİT ANTIOKSİDAN BİLEŞİĞİN TEKLİ VEYA KOMBİNASYONLAR ŞEKLİNDE UYGULANMASININ ANTI-KANSER ETKİLERİ

Dr. Hatice Şiyzen ÇOBAN

Over kanseri dünya çapında jinekolojik kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir.

Over kanseri için mevcut standartlaştırılmış tedavi, optimal sitoredüktif cerrahiyle birlikte paklitaksel ve platin bazlı kemoterapidir (KT). Sisplatin, paklitaksel gibi over kanserinde en sık kullanılan kemoterapi ajanlarına karşı gelişen direnç ve yan etkiler bu tedavi protokollerinde karşımıza çıkan zorluklardır. Bu sorunları azaltmak için toksik olmayan ve bu ilaçlara alternatif / benzer yollarda çalışan, böylece over kanserinde ek tedavi seçenekleri sunan yeni ilaçların araştırılması önemlidir. Bu yeni ajanlardan biri de doğal bir antioksidan olan alfa lipoik asit (ALA) tir. Çeşitli kanser türlerinde tedaviye ek olarak verilen ALA reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleme ve endojen antioksidanları yenileme yeteneği sayesinde hücreSEL büyümede önemli bir rol oynar.

Bu projede OVCAR-3 insan ovarian adenokarsinoma hücre hattında sisplatin, paklitaksel kemoterapötik ajanları ile ALA antioksidan bileşiminin tekli veya kombinasyonlar şeklinde uygulamanın etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda OVCAR-3 insan ovarian adenokarsinom hücre hattı kullanıldı. Hücre canlılığına olan etkilerini, IC₅₀ (the half maximal inhibitory concentration) dozlarını XTT [2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl) 2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide] testi ile değerlendirdik. XTT testi ile IC₅₀ dozları bulundu ve gruplar oluşturuldu. Dozlara göre grup isimleri şu şekildedir; kontrol, ALA IC₅₀, Sisplatin IC₅₀+Paklitaksel IC₅₀, ALA IC₅₀+Sisplatin IC₅₀+Paklitaksel IC₅₀. Apoptoz, hücre döngüsü, PI3K (Fosfatidilinositol-3-kinaz)-AKT (Serin/Treonin kinaz, protein kinaz B) yolağı ve tümör hücresi adezyonlarıyla ilişkili genlerin ekspresyonları Gerçek

Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time-PCR, RT-PCR) ile değerlendirildi. p-AKT (phosphorylated Akt), p-mTOR (phosphorylated mammalian target of rapamycin), p-FOXO1 (phosphorylated forkhead box O1) ve MAPK (Mitogen-activated protein kinase) protein seviyeleri ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yöntemiyle incelendi. Yara iyileşme deneyi (wound healing deneyi), matrigel invazyon testi ve koloni oluşum deneyleri yapıldı. Total oksidan ve total antioksidan düzeyleri TAS (Total Antioxidant Status) ve TOS (Total Oxidant Status) deneyleriyle değerlendirip bu sonuçlara bağlı olarak; TOS'un TAS'a bölünmesiyle oksidatif stres indeksi (OSI) değerleri hesaplandı. Apoptoz Annexin V ve TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP [2'-deoxyuridine 5'-triphosphate] nick end labeling) yöntemleri ile incelendi. Böylece ALA'nın sisplatin ve paklitaksel ile olası terapötik etkinliklerini in vitro koşullarda ortaya koymayı amaçladık.

ALA, sisplatin, paklitaksel IC₅₀ değerleri XTT testi ile 48. saatte sırasıyla 83.1 µM (mikromolar), 10.6 µM, 19 nM (nanomolar) olarak tespit edildi. RT-PCR sonuçlarına göre maddelerin ve kombinasyon uygulamalarının apoptoz, hücre döngüsü, PI3K-AKT yolağı ve tümör hücresi adezyonlarıyla ilişkili genlerin ekspresyonları üzerine etkileri olduğu saptandı. ALA'nın hem tek başına hem de ALA+sisplatin+paklitaksel ile üçlü doz grubunda PI3K-AKT yolağını baskıladığı tespit edildi.

ELISA yönteminden elde edilen sonuçlara göre p-AKT, p-mTOR protein seviyelerinde en belirgin azalma sisplatin+paklitaksel grubunda, p-FOXO1 ve MAPK protein seviyelerinde ise ALA+sisplatin+paklitaksel üçlü doz grubunda azalma belirlendi. Koloni formasyon testi, Matrigel invazyon testi ve yara iyileşme (Wound healing) deneylerinde en etkili kombinasyonun sisplatin+paklitaksel olduğu saptandı. TAS, TOS deneylerinden elde ettiğimiz OSI değerlendirmesinde ALA+sisplatin+paklitaksel üçlü doz uygulanan grupta artış gözlemlendi. Annexin V ile apoptoz tespiti deneyinde ALA, sisplatin ve paklitaksel ile kombinasyonlarında apoptozu kontrol grubuna oranla belirgin şekilde artırdı; fakat en yüksek artış yine sisplatin+paklitaksel doz grubunda gözlemlendi. TUNEL ile apoptoz değerlendirmesinde ise apoptotik hücreler en fazla sisplatin+paklitaksel uygulanan grupta bulundu.

Çalışmamızın sonuçlarına göre ALA proliferasyon, hücre döngüsü, PI3K -AKT yolağı, tümör hücresi adezyonu, invazyon, migrasyon, apoptoz ve oksidatif stres ile

ilgili sinyal yollarının çoğunda birçok basamağı etkiledi, fakat OVCAR-3 hücrelerinde beklediğimiz gibi sisplatin-paklitaksel ikilisinin etkinliğini artırmadı. ALA'nın anti-kanser etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi için hem in vivo hem de in vitro araştırmalara gereksinim vardır.

Anahtar kelimeler: OVCAR-3, alfa lipoik asit, sisplatin, paklitaksel, over kanseri

SUMMARY

Anti-cancer effects of the administration of cisplatin, paclitaxel and alpha lipoic acid antioxidant compound singly or in combination in OVCAR-3 ovarian adenocarcinoma cell line

Dr. Hatice Şiyzen ÇOBAN

Ovarian cancer is the leading cause of gynecological cancer deaths worldwide. The current standardized treatment for ovarian cancer is paclitaxel and platinum-based chemotherapy (KT) with optimal cytoreductive surgery. Resistance and side effects to the most commonly used chemotherapy agents in ovarian cancer, such as cisplatin and paclitaxel, are the difficulties encountered in these treatment protocols. In order to reduce these problems, it is important to search for new drugs that are non-toxic and work in alternative/similar ways to these drugs, thus offering additional treatment options in ovarian cancer. One of these new agents is alpha lipoic acid (ALA), a natural antioxidant. ALA, which is given as an adjunct to treatment in various types of cancer, plays an important role in cellular growth with its ability to scavenge reactive oxygen species (ROS) and regenerate endogenous antioxidants.

In this project, it was aimed to investigate the effects of the application of cisplatin, paclitaxel chemotherapeutic agents and ALA antioxidant compound alone or in combination in the OVCAR-3 human ovarian adenocarcinoma cell line.

OVCAR-3 human ovarian adenocarcinoma cell line was used in our study. We evaluated the effects on cell viability, IC₅₀ (the half maximal inhibitory concentration) doses with XTT [2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfohenyl) 2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide] assay. IC₅₀ doses were found by XTT test and groups were formed. The group names according to the doses are as follows; control, ALA IC₅₀, Cisplatin IC₅₀+Paclitaxel IC₅₀, ALA IC₅₀+ Cisplatin IC₅₀+Paclitaxel IC₅₀. Expressions of genes associated with apoptosis, cell cycle, PI3K (Phosphatidylinositol-3-kinase)-AKT (Serine/Threonine kinase, protein kinase B) pathway and tumor cell adhesions were evaluated by Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR, RT-PCR). p-AKT (phosphorylated Akt), p-mTOR (phosphorylated mammalian target of rapamycin), p-FOXO1 (phosphorylated forkhead box O1) and MAPK (Mitogen-activated protein kinase) protein levels were analyzed by ELISA (Enzyme-Linked

Immunosorbent Assay) method. Wound healing experiment (wound healing experiment), matrigel invasion test and colony formation experiments were performed. Total oxidant and total antioxidant levels were evaluated with TAS (Total Antioxidant Status) and TOS (Total Oxidant Status) tests, and oxidative stress index (OSI) values were calculated based on TAS and TOS results and by dividing TOS by TAS. Apoptosis was investigated by Annexin V and TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) methods. Thus, we aimed to reveal the possible therapeutic efficacy of ALA with cisplatin and paclitaxel in vitro.

The IC₅₀ values of ALA, cisplatin, and paclitaxel were determined as 83.1 μ M (micromolar), 10.6 μ M, and 19 nM (nanomolar) at 48th hour by XTT test, respectively. According to the RT-PCR results, it was determined that the substances and combination applications had effects on the expression of genes related to apoptosis, cell cycle, PI3K-AKT pathway and tumor cell adhesions. It was determined that ALA suppressed the PI3K-AKT pathway both alone and in the triple dose group with ALA+cisplatin+paclitaxel.

According to the results obtained from the ELISA method, the most significant decrease in p-AKT, p-mTOR protein levels was found in the cisplatin+paclitaxel group, while p-FOXO1 and MAPK protein levels were determined in the triple dose group of ALA+cisplatin+paclitaxel. In the colony formation test, Matrigel invasion test and Wound healing tests, it was determined that the most effective combination was cisplatin+paclitaxel. In the OSI evaluation we obtained in TAS and TOS experiments, an increase was observed in the group that received triple dose of ALA+cisplatin+paclitaxel. In the apoptosis detection experiment with Annexin V, combinations of ALA with cisplatin and paclitaxel significantly increased apoptosis compared to the control group; however, the highest increase was observed in the cisplatin+paclitaxel dose group. In the evaluation of apoptosis with TUNEL, apoptotic cells were found the most in the cisplatin+paclitaxel group.

According to the results of our study, ALA affected many steps in many of the signaling pathways related to proliferation, cell cycle, PI3K-AKT pathway, tumor cell adhesion, invasion, migration, apoptosis and oxidative stress, but did not increase the efficiency of the cisplatin-paclitaxel couple in OVCAR-3 cells as we expected. Both

in vivo and in vitro studies are needed to better understand the anti-cancer action mechanisms of ALA.

Keywords: Key words: OVCAR-3, alpha lipoic acid, cisplatin, paclitaxel, ovarian cancer

GİRİŞ

Over kanseri dünya çapında en yaygın görülen üçüncü jinekolojik malignitedir ancak; bu kanserler arasında asemptomatik seyretmesi, geç tanı koyulması ve nüks etmesi sebebiyle en yüksek ölüm oranına sahiptir (1-3). Tanı alındığında genellikle omentum tutulumu ile yaygın malign asit ve intraperitoneal metastazla birlikte (2, 4). Mevcut verilere göre over kanseri geleneksel KT'lere de direnç geliştirebilmektedir ve bu da nükse katkıda bulunur (2, 5).

Primer over tümörlerinin yaklaşık %90'ı epitelyal kökenlidir ve morfolojik olarak heterojen yapıya sahiptir (6). Temel olarak, farklı prognozla seyreden beş epitelyal over kanseri (EOK) alt tipi bulunur: yüksek dereceli seröz (%80), düşük dereceli seröz (%7), berrak hücreli (%5), endometrioid (%5) ve müsinöz (%3) (6). EOK ile ilişkili mutasyonlar ve moleküler değişiklikler bu histolojik alt tiplere göre farklılık gösterir (6). Histolojik alt tipler ile sınıflandırma prognostik öneme sahiptir (7).

Genetik olarak bakıldığında meme kanserine yakınlık genleri olan BRCA1 ve BRCA2, kalıtsal EOK'nin %65-75'inde yer alan genler olarak tanımlanmıştır (8). BRCA1 ve BRCA2'deki bu mutasyonlar büyük oranda yüksek dereceli seröz EOK alt tipi ile ilişkilidir (8). Otozomal dominant kalıtılan Lynch sendromu da kalıtsal EOK'nin %10-15'ini oluşturur ve tipik olarak endometrioid veya şeffah hücreli alt tiplerle ilişkilidir (8-11). Diğer ilişkili genetik sendromlar, Peutz-Jegher ve Gorlin sendromu gibi nadir görülen hastalıklardır (8, 12).

EOK için risk faktörleri arasında yaşam boyu ovulasyon sayısını artıran durumlar (erken menarş yaşı, nulliparite, menopozda geç yaş), aile öyküsü, sigara kullanımı, iyi huylu jinekolojik durumlar (endometriozis, polikistik over sendromu ve pelvik inflamatuvar hastalık) ve perineal talk pudrası kullanımı bulunmaktadır (8, 13).

Over kanseri için spesifik etiyoloji hala bilinmemektedir ve bu kanserler ileri aşamalarda ortaya çıkma eğiliminde olduğundan gelişimin altında yatan erken moleküler olaylar bilinmemektedir.

Mevcut standartlaştırılmış tedavi, optimal sitoredüktif cerrahiyle birlikte paklitaksel ve platin bazlı KT'dir (14).

Ancak KT'ye dirençli hastalıkların gelişmesiyle birlikte bu tedavi rejimlerinin duyarlılığı azalmıştır (15). Bu nedenle, over kanseri için uzun vadeli sağkalım oranı

azalmış ve birlikte nüks oranı artmıştır (15). Bu sorunları azaltmak için toksik olmayan ve bu ilaçlara alternatif / benzer yollarda çalışan, böylece over kanserinde ek tedavi seçenekleri sunan yeni ilaçların araştırılması önemlidir. Bu yeni ajanlardan biri de doğal bir antioksidan olan alfa lipoik asit (ALA) tir.

ALA insanlar, bitkiler ve hayvanlar tarafından küçük miktarlarda sentezlenen doğal antioksidan lipofilik bir bileşiktir (16). TCA'da yer alan mitokondriyal enzimler (örneğin; pirüvat dehidrogenaz, süksinat dehidrogenaz) için temel bir kofaktördür (16, 17). Dihidrolipoik asit olarak bilinen indirgenmiş ALA formu, ROS ile etkileşime giren baskın formudur (16, 18).

ALA'nın bazı non-tümoral patolojilerde yararlı etkileri tanımlanmıştır (16, 19). Diabetes mellitus, hipertansiyon, Alzheimer, Down sendromu, bilişsel işlev bozukluğu gibi birçok hastalık durumunun ve başta meme kanseri olmak üzere bazı kanser türlerinin tedavisinde kullanılmıştır (20, 21). ALA'nın antioksidan etkisi, ROS'u temizleme ve endojen antioksidanları yenileme yeteneği sayesinde hücrel büyümede önemli bir rol oynar (20). ALA'nın kanserli hücreler tarafından biriken yüksek oksidatif stresi azaltmak için de apoptoza ve hücre proliferasyonunun inhibisyonuna yol açtığı öne sürülmektedir (20).

Bu projede ALA'nın over kanserinde en sık kullanılan KT ajanlarından olan sisplatin ve paklitaksel ile kombinasyonunun etkilerini incelemeyi hedefledik. Over kanserinin bu ilaçlara kemosenitivitesini arttırarak, mevcut etkinliğinden ödün vermeden daha düşük dozlarda uygulanabilirliğini göstermeyi amaçladık.

Çalışmamızda over kanserinin en sık görülen tipi epitelyal alt tipinden bir hücre hattı olan; OVCAR-3 insan ovarian adenokarsinoma hücre hattını kullandık. Sisplatin, paklitaksel KT ajanları ile ALA antioksidan bileşiminin tekli veya kombinasyonlar şeklinde uygulanmasının anti-kanser etkileri iki boyutlu (2D) monolayer hücre kültürleri yapılarak:

XTT testi (Hücre Canlılığı Testi), Real-Time PCR, ELISA, matrigel invazyon, koloni oluşturma, yara iyileşme-migrasyon deneyi (Wound healing-scratch assay), TOS, TAS ve OSI seviye ölçümleri, Annexin V ve TUNEL deneyleri ile değerlendirildi.

GENEL BİLGİLER

OVER ANATOMİSİ

Overler, uterusun iki yanında, pelvik kavitenin yan yüzlerinde yerleşmiş badem şeklindeki intraperitoneal organlardır. Ligamentum (lig.) latum'un mesovarium'u ile asılmış halde pelvis yan duvarlarına yakın yerleşmişlerdir. Overler embriyolojik hayatta batın içerisinde yukarıda, böbrek hizasında bulunurken gelişim sürecinde aşağıya doğru yer değiştirerek minör pelvis lateral duvarında bulunan fossa ovarika adı verilen anatomik yerine göç ederler. Overlerin ortalama boyutu; uzunluğu 3 santimetre (cm), genişliği 1,5 cm ve kalınlığı 1 cm'dir. Fossa ovarika'nın ön tarafında komşuluğunda; medial umbilikal ligament arka tarafında komşuluğunda ise ureter ve internal iliak arter bulunur (22).

Puberte öncesinde, overlerin yüzeyi tek katlı küboidal hücrelerden oluşan düzgün bir tabaka ile örtülmüştür; bu tabaka overlere mat, grimsi bir görünüm kazandırır. Puberte sonrası ovarian folliküllerin yırtılması ve ovulasyon sonucunda overlerin yüzeyi gittikçe daha girintili çıkıntılı hale gelir. Bu nedenle ovulasyonu inhibe eden oral kontraseptifleri kullanan kadınlarda overlerin üzerinde skar doku oluşumu daha azdır (23).

Overlerin dengede durmasını sağlayan 3 adet bağ vardır. Bunlar; lig. ovarii proprium, lig. suspensorium ovarii ve mesovarium'dur. Overlerin distal ucu lig. suspensorium ovarii ile pelvis yan duvarına bağlanmıştır. Bu ligamentin içinden overlerin damarları, lenfatikleri ve sinirleri geçer. Ve bu ligament, lig. latum'un mesovarium kısmının lateral bölümünü oluşturur. Overler ayrıca mesovarium içinde uzanan lig. ovarii proprium ile uterusu tutunur. Bu ligament de fetustaki gubernaculum ovarii'nin en üst parçasının kalıntısıdır. Overler cavitas peritonealis içinde asılı durduğundan ve yüzeyi periton ile kaplı olmadığından ovulasyon ile atılan oosit periton boşluğuna düşer. Ancak tuba uterinanın fimbriaları tarafından genellikle yakalandığından intraperitoneal yaşamı kısa sürer ve ampullaya doğru taşınır, burada fertilize olabilir (23).

Overleri besleyen ana arter aorta abdominalis'ten ayrılan arteria ovarica'dır. 2.lumbal vertebra düzeyinde abdominal aortadan çıkarak posterior abdominal duvar boyunca ilerleyerek pelvise girerler. Pelvik girim düzeyinde linea terminalis hizasında

eksternal iliak arteri ve veni çaprazlar ve lig. suspensorium ovarii içerisine girer. Mezovaryum aracılığı ile ovaryuma dallar gönderdikten sonra lig. latum içinde medial olarak ilerleyerek tuba uterinayı da besler (23).

Overlerin venöz kanını drene eden venler lig. latum içerisinde over ve tuba uterina'ların yakınında plexus pampiniformis'i meydana getirirler. Ovaryan arter ile seyrederek pelvis minörü terk eder. Vena ovarica dextra, vena cava inferior'a açılır; vena ovarica sinistra ise vena renalis sinistra'ya dökülür (23).

Overlerin lenfatik damarları vasküler yapılar ile ilerler ve paraaortik lenf nodlarına açılırlar (23).

Overlerin sinirsel innervasyonu plexus ovaricus'tan gelen dallar aracılığı ile gerçekleşir. Overlerden gelen afferent lifler T₁₀ ve T₁₁ spinal sinirden geçerek medulla spinalis'e girer (23).

OVER EMBRİYOLOJİSİ

Embriyonun cinsiyeti, genetik açıdan daha fertilizasyon sırasında belirlenmiş olmasına rağmen gonadlar gelişimin 7. haftasına kadar erkeğe veya dişiye ait morfolojik özellikleri göstermezler; dolayısıyla her iki cinste de birbirine benzerler (24). Gonadlar (testisler ve overler) posterior abdominal duvarı döşeyen mezotel (mezodermal epitel), altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu), primordiyal germ hücreleri olmak üzere üç kaynaktan köken alırlar (25).

Gonadal gelişim ilk olarak 5. haftada mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma olarak meydana gelir (25).

Gonadlar ortaya bir çift uzunlamasına genital veya gonadal sırt şeklinde epitel proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla meydana gelirler. Gelişimin 6. Haftasına kadar genital sırtlar içerisinde germ hücreleri bulunmaz (25).

Primordiyal germ hücreleri epiblasttan köken alır ve primitif çizgi boyunca göç ederek 3. haftada yolk kesesinin allontoise yakın duvarındaki endoderm hücrelerinin arasına yerleşirler. Ameboid hareketlerle ilerleyerek 4. haftada sonbarsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerler ve 5.hafta başında primitif gonadlara ulaşırlar. 6.haftada da gonadal sırtlara yerleşmeye başlarlar. Eğer bu şekilde gonadal sırtlara ulaşamazlarsa gonadlar gelişemez. Gonadların over veya testise farklılaşmaları üzerinde primordiyal germ hücrelerinin indükleyici etkileri vardır (25).

Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşmaları ile gonadal sırttaki epitel hücreleri prolifer olurlar ve alttaki mezenşime gömülürler ve primitif cinsiyet kordonları denilen düzensiz kordonları oluştururlar. Bu evrede hem erkek hem de dişi embriyolarda bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır; erkek veya dişi gonadlar olarak ayırt edilebilmeleri mümkün değildir. Bu sebeple bu aşamada farklanmamış gonad denir. Eğer seks kromozom kompleksi XX ise farklanmamış gonadın korteksi overe diferansiye olur ve medullası geriler (25).

XX cinsiyet kromozomlarına sahip dişi embriyoda, primitif cinsiyet kordonları, primitif germ hücresi grupları içeren düzensiz hücre kümelerine ayrılır. Bu hücre kümeleri daha çok overin meduller bölgesinde yerleşmişlerdir; bir süre sonra kaybolarak yerlerini vasküler bir stromaya (ovarian medulla) bırakırlar (24).

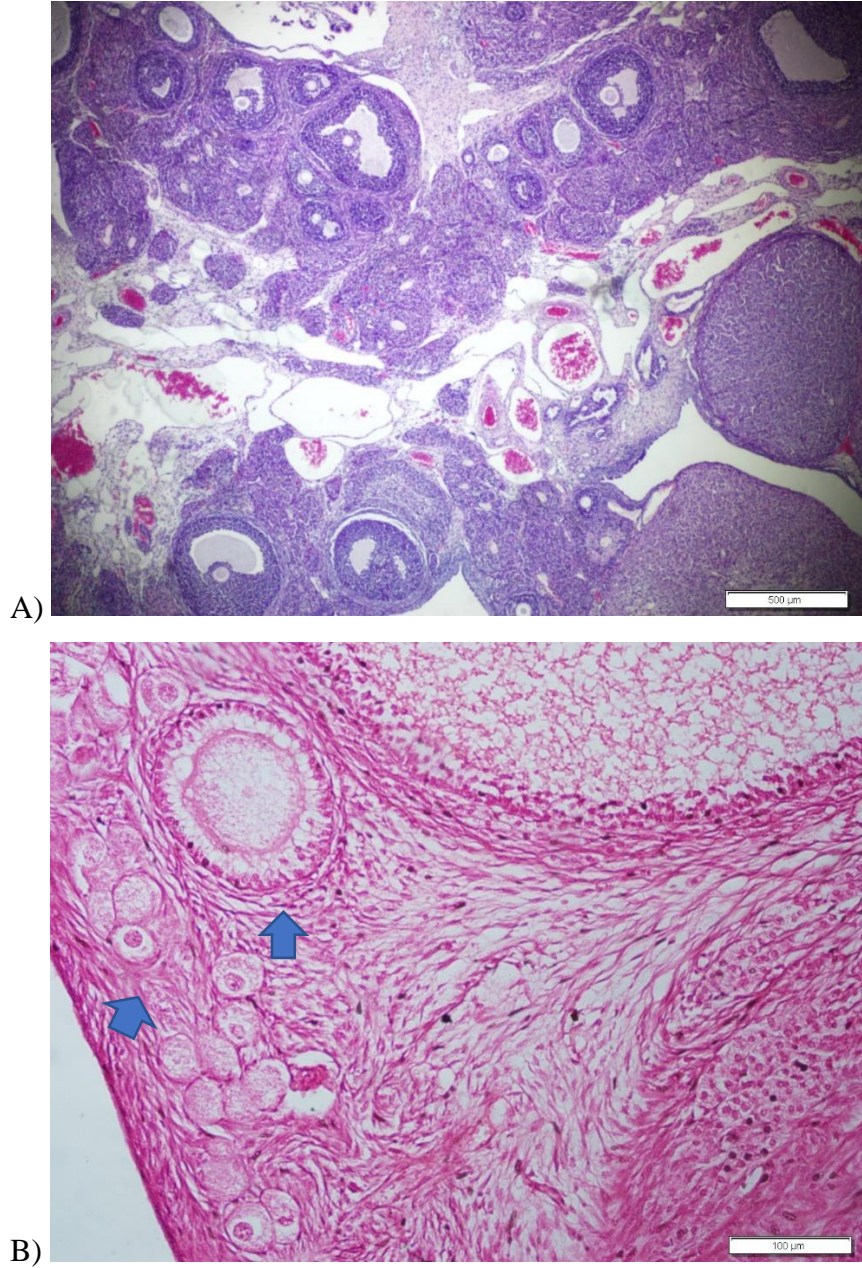
Dişi gonadın yüzey epiteli prolifer olmaya devam eder ve bu epitelden 7. haftada kortikal kordonlar adı verilen ikinci nesil kordonlar gelişir. Üçüncü ayda bu kümelerdeki hücreler prolifer olmaya devam eder ve folliküler hücreler denilen bir epitel hücresi tabakası her oogoniumun etrafını sarar. Böylece oogoniumlar ve etrafındaki folliküler hücreler primordial follikülü meydana getirirler (24).

Oogoniumların mitotik aktivitesi gelecekteki over rezervinin ne kadar olacağını belirler çünkü yaklaşık 28. haftada sona eren mitoz dönemi ve eş zamanlı başlayan atreziyle germ hücre sayısı düşmeye başlar (26). Postnatal dönemde de overlerde oogonium meydana gelmez (25). Fetal hayatta 6 milyona kadar ulaşan oogoniumlar yenidoğanda 1 milyon, pubertede 300-400 bin kadar kalır.

Gebeliğin 3. ayından başlayarak oogoniumlar birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girmeye başlar ancak yaklaşık 16. haftada bölünme diploten evresinde durur ve puberteye kadar da mayoz bölünmenin diğer evrelerine ilerlemez. Embriyonik yaşamın 7. ayına doğru oogoniumların çoğu hacimce büyür ve primer oosite dönüşür. Tek katlı yassı pregranuloza epitel hücreleri ile çevrelenmiş yapı primordial follikül olarak adlandırılır ve içerdiği oosit 46 kromozomludur. Puberteyle overde ovulatuvar sikluslar başlar ve kortekste yüzey epitelinin hemen altında yerleşen primer oositlerin bir ya da birkaçı ovulasyon için seçilir ve mayoz bölünmenin diğer aşamaları gerçekleşir. Bu mayoz bölünme oositlerde ancak döllenme gerçekleştikten sonra tamamlanır (26).

OVER HİSTOLOJİSİ

Ovaryum dışta foliküllerin yer aldığı korteks, içte çok miktarda kan damarı, lenf damarı ve sinir lifi içeren gevşek bir bağ dokusu olan medulladan oluşur. Medulla folikül içermez. Kortekste puberte öncesi sadece primordiyal foliküller görülür, puberte sonrası primer, sekonder ve tersiyer foliküller izlenir. Seksüel olgunluk döneminde burada foliküllerin dışında foliküllerin değişimi ile oluşan korpus luteum, korpus albicans ve atretik foliküller de bulunur (Şekil 1) (27).



Şekil 1. A) Over dokusunun genel görünümü, B) Kortekste primordiyal, primer foliküller (oklar). Hematoksilen&eoazin X40, X200

Ovaryum yüzeyi germinal epitel adını verdiğimiz tek katlı kübik, yer yer tek katlı yassı epitel ile kaplıdır. Yüzey epiteline germinal epitel denilmesinin sebebi embriyonik gelişim sürecinde germ hücrelerinin kökenini oluşturduğunu düşünülmesiydi. Günümüzde ise primordiyal germ hücrelerinin kökeninin ekstragonadal yani vitellus kesesi duvarından kaynaklı olduğu belirtilmektedir. Ancak son yıllarda yapılan birçok araştırmada deney hayvanları ve insanların germinal epitelinden oosit geliştirmenin başarılması bu tartışmayı tekrardan gündeme getirmiştir (27).

Germinal epitelin altında, tunika albuginea olarak isimlendirilen ovaryuma beyazımsı rengini veren sıkı bir bağ dokusu tabakası bulunur. Tunika albugineanın altında oositleri içeren ovaryum foliküllerinin bulunduğu korteks kısmı yer alır. Foliküller bu kortikal bölgenin bağ dokusu stroması içinde gömülüdür. En iç kısımda da gevşek bağ dokusundan zengin bir damar yatağı içeren medullası yer alır (26, 27).

Folikülogenez primordiyal folikülden ovulasyona gidecek olan tersiyer folikül oluşumuna kadar gerçekleşen olayları içeren gelişim dönemidir. Histolojik olarak değerlendirdiğimizde genel olarak kabaca üç tip folikül tanımlanmıştır; primordiyal folikül, gelişmekte olan folikül ve olgun folikül. Gelişmekte olan foliküller, primer ve sekonder foliküllerdir. Bu dönemde folikül çapı artar, hücresel özellikler değişir (26). Primordiyal foliküllerde yer alan primer oosit, 1.mayoz bölünmeye başlamış profaz evresindedir (27). Tersiyer folikülde ovulasyona 6-12 saat kala 1.mayozu tamamlayarak 2.mayozu girer. Bu dönemde artık sekonder oosit adını alır. Sekonder oositin bölünmesi de ovulasyona 2-3 saat kala metafazda duraklar. Bu nedenle ovulasyonda atılan oosit sekonder oositir. Eğer fertilizasyon gerçekleşmezse oositler mayoz bölünmeyi tamamlayamaz (27).

Primordiyal foliküllerin yassı hücreleri önce kübik sonra prizmatik hücrelere dönüştüğünde artık primer folikül adını alır. Folikül gelişirken oosit ve folikül hücreleri glikoproteinler ve glikozaminoglikanlar salgılar; bu alan oosit ve folikül hücreleri arasında sınır oluşturur. Periyodik asit schiff (PAS) ile pozitif boyanan bu bölge zona pellusida olarak adlandırılır. Bu tabaka ayrıca spermiyum reseptörleri içerir. Spermiyumlar glikoprotein yapısında olan bu reseptörlerden zona pellucida sperm-binding protein 3 (ZP-3) reseptörlerine tutunurlar (27).

Folikül hücreleri çoğalmaya devam eder ve çok katlı folikül epitelini ya da granüloza tabakasını oluştururken buradaki hücreler gap junctionlar aracılığıyla iletişim kurarlar. Bu aşamada folikül çok katlı (multilaminar) birincil folikül ya da preantral folikül olarak isimlendirilir (26).

Folikül hücrelerinin uzantıları ve oosit mikrovillusları zona pellusida içine uzanır ve birbirleriyle gap junctionlar aracılığıyla iletişim kurarlar. Foliküller büyüdükçe kortikal bölgenin daha alt bölgelerine göç ederler ve folikül hücreleri arasında folikül sıvısı oluşmaya başlar. Bu sıvı içeren boşluklar birleşerek daha büyük bir boşluk (antrum) oluştururlar. Ve böylece bu foliküllere ikincil ya da antral folikül denir (26).

Antrumu oluşturan granüloza hücreleri folikül duvarında belirli bir alanda yoğunlaşır. Küçük bir tepelik oluşturan bu hücreler antrumun iç kısmına uzantı yapar ve bu yapıya kumulus ooforus adı verilir. Bu yapı oositi de içerir. Oosit çevresinde yoğunlaşan bir grup granüloza hücresi korona radiata'yı oluşturur. Oosit ovaryumdan atılırken bu granüloza hücreleri de eşlik eder (26).

Oosit ve granüloza hücrelerinde bu değişiklikler meydana gelirken folikülün bitişiğindeki stromada bulunan fibroblastlar teka tabakasını oluştururlar. Bu tabaka teka interna ve eksterna olarak farklılaşır. Folikül uyarıcı hormonun etkisiyle granüloza hücreleri androstenediondan östrojen sentezleyen aromataz enzimi salgılar. Bu östrojen de folikül etrafındaki stromaya döner ve kan damarları aracılığıyla kana geçer, vücuda yayılır (26).

Her menstrüasyonda genellikle foliküllerden biri daha fazla büyür ve baskın hale gelir. Baskın olan bu folikül büyümenin son aşamasına ulaşarak ovulasyonu gerçekleştirebilir. Diğerleri yıkıma uğrar. Olgun folikül ya da diğer adıyla graaf folikül ovulasyon öncesi foliküldür ve oldukça büyüktür, yaklaşık 2.5 cm çapındadır. Bu folikül ovaryum yüzeyinden dışarıya doğru şişkinlik yapar. Sıvı toplanmasıyla beraber folikül boşluğunun boyutlarında artış olur, granüloza hücre tabakası folikül büyümesiyle orantılı bir şekilde çoğalmadığından daha ince bir hal alır (26).

Büyüyen folikülün ürettiği dolaşımdaki yüksek östrejene yanıt olarak ön hipofizden luteinizan hormondaki (LH) ani bir artış ile ovulasyon için uyarı gerçekleşmiş olur. Ovulasyondan hemen önce 1.mayoz bölünme tamamlanır. Birinci

kutup cismi ve sekonder oosit oluşur. İkinci kutup cisminin atılmasıyla da oosit 2.mayozu başlar ve metafaz aşamasında durur (26).

Folikül duvarının yırtılmasıyla oosit, birinci kutup cismi, zona pelusida, korona radiatayla bir miktar folikül sıvısı ovaryumdan tuba uterinaya atılır. Burada oosit döllenebilir, ancak ovulasyondan sonra ilk 24 saat içinde dölllenme gerçekleşmezse oosit bozulur ve ortadan kaldırılır (26).

OVER KANSERİ

1. Epidemiyoloji

Over kanseri, tüm jinekolojik maligniteler arasında en yüksek ölüm oranına sahiptir (28). Her yıl dünya çapında 220.000 kadın EOK geliştirmektedir (29). Epidemiyolojik olarak risk faktörleri arasında aile öyküsü, nulliparite, erken menarş, geç menopoz ve artan yaş yer almaktadır (30). Over kanserlerinin yaklaşık %90'ı sporadiktir ve %10'u kalıtsal ailesel sendromlu hastalarda görülür (28, 30). Over kanserinin çeşitli nedenleri vardır fakat en önemli risk faktörü, hastalığın aile öyküsüdür (28). Yüksek risk altında olanlar; BRCA1 ve BRCA2 tümör baskılayıcı genlere sahip bireyler ve kalıtsal non-poliposiz kolorektal kanserli (hereditary nonpolyposis colorectal cancer-HNPCC; Lynch sendromu) kişilerdir (28). Her 500 kadından birinde görülen kalıtsal meme ve over kanseri sendromu, BRCA1 ve BRCA2 genlerine sahip kadınlarda otozomal dominant geçişli bir mutasyondur (28, 31). Ortalama yaşam boyu over kanseri riski, BRCA1'de yaklaşık %30 ve BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında %27'dir; ancak yüksek penetrasyonlu ailelerde over kanseri riskinin %44-60'a kadar yüksek olduğu bildirilmiştir (28, 29). Otozomal dominant geçişli HNPCC'ye sahip kadınların yaşam boyu over kanseri geliştirme riskinin %10-12 arasında olduğu tahmin edilmektedir (20, 31, 33). Bu sendromda karşımıza çıkan en yaygın genler, Deoksiribonükleik asit (DNA) uyumsuzluklarını onarım genlerinden MSH2 veya MLH1'dir (30). Over kanseri için daha az önemli risk faktörleri arasında infertilite, nulliparite, geç menopoz ve erken menarş sayılabilir (28, 32). Geç menarş, erken menopoz ve hormonal kontraseptif kullanımı gibi bir kadının daha az ovulasyona maruz kalmasına neden olan bu faktörler de koruyucudur (28).

Over kanseri her yaşta ortaya çıkabilmesine rağmen 50 yaş üstü daha sık görülmektedir (31). Hastalar sıklıkla spesifik olmayan pelvik veya abdominal semptomlarla başvururlar (31). İlk tanı testleri arasında transvajinal ultrasonografi ve CA 125 (serum kanser antijeni 125) ölçümü yer alır; ancak bu testler over kanseri için spesifik değildir (31). Konvansiyonel tedavi, cerrahi ve ardından KT'yi içerir (31). Prognoz tipik olarak kanser evresi ve derecesi ile belirlenir, ancak gelecekteki tedavinin tümör genetik bileşimine bağlı olabileceği düşünülmektedir (31).

EOK en yaygın türüdür ve vakaların yüzde 70'i evre III veya IV'te teşhis edildiğinden kötü prognosis ile ilişkilidir (31). Ailesinde over kanseri öyküsü veya ilişkili olduğu bilinen bir genetik sendromu olan kadınlara genetik danışmanlık önerilmelidir (31).

Over kanseri, kadınlarda görülen kanserlerin sadece yüzde 3'ünü oluşturmalarına rağmen akciğer, meme, kolorektal ve pankreas kanserlerinden sonra kadınlarda kansere bağlı ölümlerin en sık nedenlerindedir (31). Over kanserinin yaşa göre insidansı 100.000 kadında 12.5'tir. Son yirmi yılda over kanseri insidansında yüzde 1'den daha az bir düşüş olmasına rağmen ölüm oranı büyük ölçüde değişmemiştir (31).

Tekrarlanan ovulasyon rüptürü ve onarımı teorik olarak malign gen mutasyonları için fırsatlar yaratır (31). Her biri ovulasyonu azaltan; oral kontraseptifler, geç menarş, erken menopoz, multiparite ve emzirme gibi faktörlerin görünür koruyucu etkilerini açıklayabilir (31).

Obezite, sigara, yüksek nişastalı veya yüksek yağlı diyet, hareketsiz yaşam tarzı gibi değiştirilebilir faktörler over kanseri riskinin artmasıyla ilişkilidir; ancak nedenleri arasında tanımlanmamıştır (31). Artan günlük lif alımı, karoten, C vitamini, E vitamini, doymamış yağ asitlerinin kullanımı ve artan fiziksel aktivite, over kanseri riskinin azalmasıyla orta derecede ilişkili bulunmuştur (31, 34).

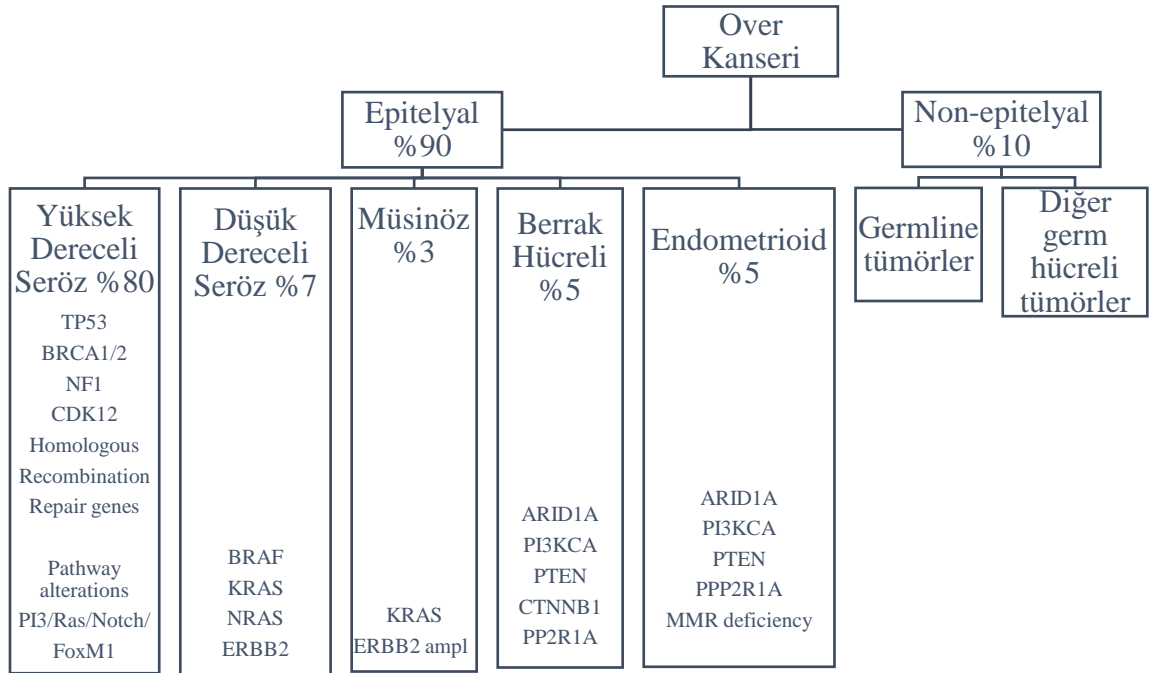
Over kanserleri genellikle platin bileşikleri ve taksanlara dayalı birinci basamak KT'ye iyi yanıt verse de hastaların çoğunda nüks ve kemo-direnç gelişir (35,36). Uzun yıllara dayanan çalışmalara rağmen, erken teşhise imkan sağlayan ve taramaya uygun diğer tanı yöntemlerinin yanı sıra güvenilir tanı belirteçleri hala eksiktir (35, 37). Bu nedenle, mevcut çalışmalar tanısal, prognostik ve prediktif potansiyele sahip yeni biyobelirteçler bulmanın yanı sıra yeni terapötik hedeflerin araştırılmasına yöneliktir (35).

2. Over Kanseri Sınıflandırması

Over kanseri hem histolojik hem de moleküler düzeyde heterojen bir hastalıktır (3). Vakaların çoğu epitelyal kökenlidir (~%90). EOK birçok histolojik alt tip ile karakterizedir (3). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) EOK'nin histolojik tiplerini aşağıdaki gibi sınıflar (7):

- seröz
- endometrioid
- berrak hücreli
- müsinöz
- Brenner (geçiş hücresi)
- mikst epitelyal tümörler
- farklılaşmamış
- sınıflandırılmamış

EOK ile ilişkili mutasyonlar ve moleküler değişiklikler histolojik alt tipe bağlı olarak farklılık gösterir (6) (Şekil 2).



Şekil 2. Over kanserinde morfolojik heterojenlik ve ilişkili mutasyonlar (29)

Bu alt tiplerin her biri araştırmalarda da gösterildiği gibi klinik öneme sahiptir. Ayrıca evrensel olarak kabul edilmiş tek bir derecelendirme sistemi yoktur. Farklı

histolojik alt tipler için farklı derecelendirme sistemlerinin kullanılması gerektiği giderek daha fazla kabul görmektedir (7).

EOK'nin histopatolojisi heterojendir ve her alt tipi tedavilerde hedef olarak ele alınacak moleküler olarak farklı genetik mutasyonlara sahiptir (29).

Yaklaşık 10 yıl önce, klinikopatolojik özelliklere dayanarak over kanserlerini tip I ve II tümörlere ayıran bir sınıflandırma önerildi (29, 38). Tip I tümörler BRAF, KRAS ve PTEN'de mutasyonlar taşıyan düşük dereceli seröz, endometrioid, müsinöz ve berrak hücreli gibi alt tipleri içermekteydi (3, 29). Tip II tümörler sıklıkla p53, BRCA1 ve BRCA2'de mutasyonlar taşıyan yüksek dereceli seröz ve karsinosarkomu içeriyordu (29). Bu çalışmalar, düşük dereceli seröz karsinomun, yüksek dereceli seröz karsinom için öncü bir lezyon olma olasılığının düşük olduğunu göstermiştir; daha ziyade, ikisinin de, genel olarak, belirgin şekilde farklı prognostik etkileri olan, farklı genomik varyasyon kalıpları ile karakterize ayrı hastalıklar olduğuna inanılmaktadır (3). Bu sınıflandırmada, düşük dereceli seröz karsinom, tip I karsinom olarak sınıflandırılır ve genellikle daha sakin bir klinik seyir ve nispeten stabil bir genomik profile sahip olarak karakterize edilir (3). Yüksek dereceli seröz karsinom ise tip II karsinom olarak sınıflandırılır ve daha agresif bir klinik seyir ile ilişkilidir (3). Bu sınıflandırmada çoğu tip I tümörün endometriozis veya borderline seröz tümörlerden kaynaklandığına inanılırken, tip II tümörlerin genellikle esas olarak fallop tüpünden kaynaklandığına inanılmaktadır (3).

Bütün bu sınıflandırmaların beraberinde gelecekte tümör sınıflandırması için genomik profil oluşturmanın, histopatolojik analizlere göre farklılaşmamış veya karmaşık histolojik yapıya sahip over tümörlerini sınıflandırmada daha doğru bir temel sağlayacağı düşünülmektedir (3). Ayrıca, ileri moleküler profillemeye teknolojilerinin, yüksek dereceli seröz over kanserlerinin köken aldığı yerleşim yerlerinin doğrulanması için temel teşkil edeceği de öngörülmektedir (3). Hastalığın altta yatan patogenezi yansıtan EOK'nin moleküler bir sınıflandırmasını geliştirmenin ana hedeflerinden biri de bireyselleştirilmiş tedavi seçimini kolaylaştırmaktır (3).

Seröz Karsinomlar

Seröz karsinomlar, EOK'nin %85-90'ını oluşturur; yüksek dereceli ve düşük dereceli seröz olmak üzere ikiye ayrılırlar (7, 39). Histolojik olarak, bazı benzer fenotipik özellikler gösterirler ancak farklı moleküler yollardan gelişirler (39).

Yüksek dereceli, seröz karsinomların yaklaşık %80'ini oluştururken düşük dereceli seröz seyrek, %10 civarında görülür (39). Yüksek dereceli olanlar genellikle daha ileri yaşta karşımıza çıkarken düşük dereceliler daha genç bir medyan yaşta teşhis edilirler (39).

Hafif-orta derecede sitolojik atipi ve düşük mitotik aktivite sergileyen tümörler düşük dereceli olarak sınıflandırılırken, ciddi sitolojik atipi ve yüksek mitotik aktivitesi olanlar yüksek dereceli seröz tümörler olarak kabul edilmektedir (7, 39). Ayrıca her tipte farklı mutasyonlar mevcuttur ve köken aldığı hücre de farklı olabilir.

EOK'nin çoğu p53 gen mutasyonları ile karakterize, yüksek dereceli seröz kansere sahiptir (29, 39). Yüksek dereceli seröz over tümörlerinin yaklaşık %5-8'i NF1, BRCA1, BRCA2, RB1 ve CDK12 somatik mutasyonlarıyla ilişkilidir (8). BRCA1 ve BRCA2'deki mutasyonlarla ilgili tüm over kanserleri neredeyse yüksek dereceli seröz kanserdir (29).

Yüksek dereceli seröz over tümörleri ayrıca sık DNA kazanımları ve kayıpları ile karakterize edilir; bu da kanseri kromozomal olarak kararsız hale getirir (8). Edinilmiş kemorezistans potansiyeli CCNE1 amplifikasyonu ile ilişkilidir (8).

Bu tümörlerin over yüzey epitelinden geliştiği düşünülse de ailesel risk için profilaktik salpingo-ooferektominin uygulanması sonrası rezeke edilen dokuda tubal karsinom veya prekürsör seröz tubal intraepitelyal karsinom prevalansının yüksek olduğu görülmüştür (29, 40, 41). Bu da tubal fimbriaların yüksek dereceli seröz kanserin çıkış yeri olabileceği düşüncesini doğurmuştur (29, 40, 41).

Klinik olarak, seröz kanserlerin ~ %10'unu oluşturan düşük dereceli seröz tümörler yüksek derecelilere kıyasla daha genç yaşta ortaya çıkma eğilimindedir ve daha uzun sağkalımlara sahiptir (7, 42). 10 yıllık sağkalım oranı %50 olan yavaş büyüyen tümörlerdir (39). Moleküler düzeyde, genomik olarak daha stabildir ve vakaların yaklaşık yarısında PI3KCA, BRAF ve KRAS'taki somatik mutasyonlar yaygındır (29, 39). İmmünohistokimyasal profilleri yüksek dereceliye benzerdir (örneğin, CK7, WT1 ve östrojen reseptörü [ER] için pozitif) ancak yüksek derecelilerin aksine asla anormal p53 ekspresyonu göstermezler (39).

Yüksek dereceli seröz tümörlerin büyüme paterni heterojendir, büyük papiller içerir, glandüler bir yapı ve sık sık nekrozlu mikropapiller olur (8). İmmünohistokimya boyaması, p53 için pozitif, p16 yaygın olarak eksprese edilir ve Ki67 yükselir; ek

belirteçler ER, progesteron reseptörü (PR), WT-1, PAX8 ve CK7'yi içerir (8, 39). Sitokeratin 20 (CK 20) negatiftir (39).

Endometrioid

Endometrioid over kanserlerinin çoğu erken evre (evre 1) ve düşük derecelidir, iyi bir prognoz ile ilişkilidir (7, 39). Endometrioid over kanserlerinin prevalansı, muhtemelen daha iyi patolojik tanı nedeniyle son yıllarda azalmıştır ve şu anda over kanserlerinin ~ %5'ini oluşturmaktadırlar (7). Histolojik olarak endometrial epiteli andıran bezlerden oluşurlar (39). Endometriozis ve özellikle endometriotik kistler, bu alt tip için varsayılan öncü lezyonlar olarak kabul edilmiştir (7). CTNNB1, PI3KCA, PPP2R1A, PTEN ve ARID1A'nın bazı somatik mutasyonlarını taşır (7, 39). İmmünohistokimya profili, CK7, PAX8 ve hormon reseptörleri için pozitiflik ve WT1 ve CK20 için negatiflik gösterir; p53, yüksek dereceli tipte aşırı ifade edilebilir (39).

Ayrıca bu alt tip en sık Lynch sendromlu hastalarda görülür (39).

Berrak Hücreli

Over kanserlerinin %5'ini oluştururlar. Evre 1 berrak hücreli kanserlerin prognozu nispeten iyidir (7). Bununla birlikte, ileri evre berrak hücreli kanserler, over kanserinde kullanılan standart kemoterapötik ajanlara dirençli olma eğiliminde olduklarından seröz alt tipe göre daha kötü bir prognoza sahiptir (7, 39). Berrak hücreli kanserler de endometriozis ile güçlü bir şekilde ilişkilidir ve önemli bir kısmı ARID1A mutasyonlarını taşır (7, 39). Seröz karsinomların aksine genellikle WT1, p53 ve ER'yi eksprese etmez (39). Diğer EOK'lerin aksine, napsin A'yı spesifik olarak ifade ederler (39). PI3KCA'da mutasyonlar da bildirilmiştir (39).

Genellikle tromboembolik komplikasyonlar ve hiperkalsemi ile ilişkilidirler ve seröz karsinomdan daha yüksek lenf nodu metastazı sıklığı ile birliktedirler (39).

Müsinöz

Bu nadir görülen ve daha erken aşamada teşhis edilebilen alt tip neredeyse %100 KRAS mutasyonuna ve yaklaşık %20 oranında HER2 amplifikasyonuna sahiptir (29, 39). Hastalar genellikle ameliyattan sonra iyi bir prognoz ile seyrederek (39). Tekrarlayan veya metastatik olanlar kötü bir prognoza sahiptir (39). Tek taraflı, büyük, multikistik, mukusla dolu ve sıklıkla solid alanlar içeren tümörlerdir (39). İmmünohistokimyasal olarak CK7 ve CK20 pozitifliği gösterir, ancak genellikle

hormon reseptörleri (PR ve ER) ve WT1 için negatiftir (39). PAX8 vakaların yarısından azında pozitifdir (39).

Diğer Karsinomlar

Seromüsinöz karsinom, 2014 yılında WHO sınıflandırmasına eklenen yeni bir kategoridir (39). Bu tümörler nadir görülür ve geniş bir yaş aralığında ortaya çıkar (39). Erken bir aşamada teşhis edilirler dolayısıyla iyi bir prognoza sahipler, ancak ileri evrede başvuran hastaların kötü prognoza sahip oldukları da gösterilmiştir (39). İmmünohistokimyada CK7, hormon reseptörleri, CA125, CA19.9 ve PAX8 genellikle pozitifdir (39). Bazı vakalar WT1 için pozitifdir; CK20 ve CDX2 genellikle negatiftir (39). Seromüsinöz karsinomlar ve endometrioid neoplazmalar sıklıkla aynı overde bulunur ve her iki lezyon da endometriozis ile ilişkili gibi görünmektedir (39). Ek olarak, tümör baskılayıcı gen ARID1A'nın her iki lezyonda da karşımıza çıkması yakından ilişkili olabileceklerini düşündürmektedir (39).

3. Patogenez

Over kanserinin patogenezinin aydınlatılmasındaki en büyük problemlerden biri, çok farklı klinikopatolojik özelliklere ve davranışlara sahip farklı tümör tiplerinden oluşan heterojen bir hastalık olmasıdır (43). Over kanserinin en yaygın histolojik alt tipi olan yüksek dereceli seröz over kanserinin, başlangıçta over yüzey epitelinden geliştiği düşünülüyordu (44). 'Sürekli ovulasyon' hipoteziyle her ovulasyon döngüsünde yüzey epitelinin tekrarlayan yaralanması ve bu tekrarlayan yaralanmanın artan inflamasyona ve hormon seviyelerinde değişikliklere neden olarak artan oksidatif stres ile DNA hasarına yol açtığı düşünülüyordu (44). Over yüzey epitelinin bu aralıksız ovulasyon ve yırtılma-onarım mekanizmasıyla metaplastik değişiklikleri daha Müllerian tipi bir epitele doğru yönlendirdiği tahmin ediliyordu (44). Bu Müllerian tipi epitel DNA hasarı barındırıyorsa, neoplastik dönüşüm için ana hedefi temsil etmekteydi (44).

Bu model özellikle Tip I tümörler ile ilişkili bir dizi önemli özelliği açıklayabilmesine rağmen Tip II tümörlerin anlaşılmasına yönelik bir yol sunamamaktadır (44).

Over karsinogenezinin bu geleneksel görüşü, çeşitli farklı tümörlerin hepsinin over yüzey epitelinden (mezotelyum) türediği şeklindedir. Ardından gelen metaplastik

değişikliklerin bu tümör hücrelerini fallop tüpü, endometrium, gastrointestinal sistem, endoserviks ve idrar kesesinin epiteline (sırasıyla bu alt tiplerde; seröz, endometrioid, berrak hücreli, müsinöz ve geçiş hücresi [Brenner]) morfolojik olarak benzeyen farklı hücre tiplerine dönüşmesine yol açtığı olarak özetlenebilir (43). Ancak normal over dokusunda bu tümörlere benzeyen hiçbir bileşen yoktur (43). Ayrıca, serviks, endometrium ve fallop tüpleri müllerian kanallardan gelişirken overler müllerian kanallardan ayrı ürogenital sırt üzerindeki mezodermal epitelden gelişir (43). Bu nedenle, alternatif bir teori, müllerian fenotipli (seröz, endometrioid ve berrak hücreli) tümörlerin mezotelyumdan değil müllerian tipi dokudan kaynaklandığını öne sürer (43). Bu müllerian tipi doku topluca "ikincil müllerian sistem" olarak adlandırılan paratubal ve paraovaryan yerleşimli kistler olarak tanımlanmıştır (43). Bu teoriye göre over tümörleri bu kistlerden gelişir (43). Tümör büyüdükçe, over dokusunu sıkıştırır ve sonunda overde ortaya çıkmış gibi görünen adneksiyal bir tümörle sonuçlanarak over dokusunu yok eder (43). Bu sekonder müllerian sistem teorisinin sınırlamaları, seröz, endometrioid ve berrak hücreli karsinomlara benzeyen öncü lezyonların paratubal ve paraovaryan kistlerde nadiren bildirilmiş olmasıdır (43).

Genel olarak baktığımızda over yüzey epitelinden (mezotelyum) köken alma teorisinin bazı sınırlamaları vardır (43). Histolojik olarak, overlerin üzerinde yer alan mezotelyum tabakası seröz, endometrioid, müsinöz, berrak hücreli veya transizyonel (Brenner) karsinomlara benzerlik göstermez (43). Yukarıda belirtildiği gibi, bu bariz çelişkiyi açıklamak için, overin üzerini örten mezotelyumun alttaki stromaya girerek "kortikal inklüzyon kistlerini" oluşturduğu öne sürülmüştür (43). Lokal faktörlerin ve muhtemelen steroid hormonların etkisi altındaki bu kistler, mezotelyumun müllerian tipi epitele dönüşmesiyle sonuçlanan bir metaplastik değişime uğrarlar (43). Yeni edinilmiş müllerian fenotipleri ile bu inklüzyon kistleri daha sonra farklı hücre tiplerine (seröz, endometrioid ve berrak hücreli karsinomlar) karşılık gelen karsinomlarla sonuçlanan malign transformasyona uğrayabilir (43). Ovaryan kortekste müllerian tipi epitel ile dōşeli kortikal inklüzyon kistleri sıklıkla gözlenmesine rağmen, bu kistlerden karsinoma geçiş olarak yorumlanabilecek iyi belgelenmiş örnekler bildirilmemiştir (43).

En ikna edici kanıtlar, birincil over kanserlerinin, yani seröz, endometrioid ve berrak hücreli karsinomlar gibi büyük çoğunluğunun, doğrudan overlerden değil,

fallop tüpü ve endometriumd n türetildiğini göstermektedir (43, 44). Yüksek dereceli seröz karsinomun gen ekspresyon profilinin over yüzey epitelinden ziyade fallop tüpü ile daha yakından ilişkili olduğunu gösteren gen profili çalışması ile desteklenmektedir (43). Ek olarak, yüksek dereceli seröz karsinomlar, bir müllerian belirteç olan PAX8'i eksprese eder, ancak bir mezotelyal belirteç olan kalretinini eksprese etmezler (43).

Bu bulgulara dayanarak, genotoksik DNA hasarı ile başlayan, ardından p53 mutasyonu ve ilerleyici hücre döngüsü kontrolü kaybı ile devam eden ve karsinom geliŐimi ile sonuçlanan patogenetik süreç öngörülmüŐtür (43). p53 mutasyonu, fallop tüpü salgı hücrelerinin transformasyonunda bilinen ilk moleküler olaydır ve erken tümör  nc lerinde tanımlanabilmektedir (44).

Özetle, mevcut teorilerin hiçbiri over karsinogenezinin tüm yönlerini yeterince bađdaŐtırmamaktadır. Hepsinin over karsinomlarının gelişimini açıklamak için sunacakları bir Őey vardır ama her Őeyi yeterince kapsayıcı görülmemektedir.

Bu nedenle, en ikna edici veriler, fallop tüpünün fimbriyalı kısmından seröz tümörlerin, endometriozisin sonucu olarak fallop tüpünden geçen endometrial dokudan endometrioid ve berrak hücreli tümörlerin, fimbriyanın periton ile temas ettiği tubal-mezotelyal bileŐkede yer alan geçiş tipi epitelten müsinöz ve Brenner tümörlerinin geliŐtiđidir (43, 44).

Over kanserinin kökenine iliŐkin son araŐtırmalar, fallop tüpünde morfolojik ve moleküler olarak yüksek dereceli over seröz karsinomuna benzeyen ve “seröz intraepitelyal tubal karsinom (STIC)” olarak adlandırılan bir  nc  lezyona dikkat çekmiŐtir (43). Bu da son görüŐleri destekler Şekilde overden de novo geliŐmek yerine, tip II tümörlerin çoğunluğunun, fallop tüpünün fimbriya ucundaki bir STIC'den overe yayılıyor olmasıdır (43).

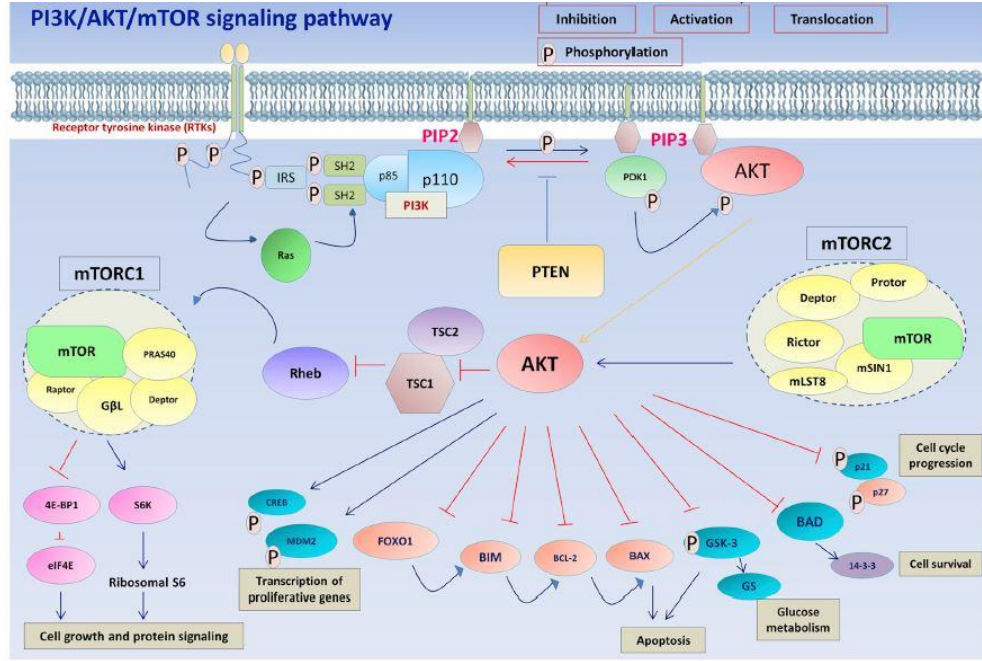
Over karsinomu geliŐimi için bir başka olası mekanizma, normal tubal epitelyumun fimbriadan ayrılmasıdır; bu epitel, ovulasyonun meydana geldiği yırtılma bölgesine implante olur ve daha sonra malign transformasyona uğrayabilen bir inklüzyon kistinin oluşumuna neden olur (43).

Tüm bu mekanizmalar arasında tip I ve tip II over tümörlerinin farklı moleküler yollar boyunca bağımsız olarak geliŐtiđine ve her iki tipin de over dışında geliŐip onu sekonder olarak etkilediğine dair çalışmalar artmaktadır (43).

Genomik çalışmalar, yüksek dereceli seröz over tümörlerinin yaklaşık %50'sinin, DNA onarımının homolog rekombinasyon yolunda yer alan genlerdeki, özellikle BRCA1 ve BRCA2'deki mutasyonlarla karakterize olduğunu göstermektedir (29, 44).

Son zamanlarda, CCNE1'in amplifikasyonunun, yüksek dereceli seröz over tümörjenezinde tüm vakaların yaklaşık %20'sini oluşturan bir başka önemli faktör olduğu bulundu (44). CCNE1, Siklin E1'i kodlar ve yüksek dereceli seröz over tümörü vakalarının yaklaşık %20'sinde amplifiye edilir (44). Siklin E1 protein seviyeleri hücre döngüsü sırasında değişir ve CDK2'yi bağlayarak ve aktive ederek G1-S faz geçişinde önemli bir rol oynar (44). Anormal Siklin E1 ekspresyonunun programlanmamış DNA replikasyonunu, sentrozom amplifikasyonunu ve kromozomal kararsızlığı tetiklediği bilinmektedir (44). Önemli olarak, CCNE1 amplifikasyonu, birincil veya refrakter kemorezistant over kanseri ve kötü sağkalım ile ilişkilidir (44). İlginç bir şekilde, CCNE1'in amplifikasyonu ve artan Siklin E1 proteini öncü lezyonlarında tespit edilebilmektedir, bu da CCNE1 düzensizliğinin bu tümörün gelişiminde erken bir olay olduğunu göstermektedir (44). CCNE1 ile amplifiye edilmiş tümörler için terapötik yaklaşımlar gelişmektedir (44). Bu hücrelerin neoplastik dönüşümünü neyin tetiklediği belirsizliğini korusa da bazı tümörler BRCA fonksiyonu kaybı veya CCNE1 amplifikasyonu sergilemektedir (44).

PI3K/AKT/mTOR (mammalian target of rapamycin) sinyal yolağı hücre sağkalımı, büyümesi ve çoğalması, anjiyogenez, transkripsiyon, translasyon ve metabolizmanın düzenlenmesinde hayati bir rol oynar (45) (Şekil 3). Bu sinyal yolunun ana bileşenlerindeki düzensizlikler kanser patogenezinde yaygın olarak karşımıza çıkar (45). PI3K/AKT/mTOR yolunun over kanserinde de sıklıkla değişen sinyal yolu olduğu gösterilmiştir, bu da bu yolu terapötik hedefler için en önemli sinyal yollarından biri haline getirmektedir (45, 46).



Şekil 3. PI3K/AKT/Mtor yolu

RAPTOR (regulatory associated protein of mTOR)'un devre dışı bırakılmasının, RICTOR'un devre dışı bırakılması üzerinde daha yüksek engelleyici etkiler göstermesi nedeniyle mTORC1 mTORC2'ye göre over kanserinin ilerlemesinde daha kritik bir rol oynamaktadır (45).

Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler), Zn'ye bağımlı proteolitik peptidazlar (endoproteinaz) ailesine aittir (45). MMP'ler esas olarak hücre dışı matriks düzenlenmesinde rol oynar (45). Ayrıca hücre göçü, anjiyogenez ve apoptozda hayati öneme sahiptir (45). PI3K'lerin MMP-2'nin işlevini ve hücre hareketliliğini artırdığı gösterilmiştir (45).

Normal hücrelerde, bir enerji sensörü olan adenozinmonofosfat (AMP) ile aktive olan protein kinaz (AMPK), hücre metabolizmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (45). AMPK, yağ asidi oksidasyonunu ve glikoz alımını aktive ederek hücre enerjisinin tükenmesi üzerine AMP/Adenozintrifosfat (ATP) oranını koruyarak hücre enerjisiyi eski haline getirebilir (45). Ayrıca, AMPK'nin, hücreler yeterli enerji kaynağına sahip olmadığında fosforilasyon yoluyla mTORC1'in işlevini engellediği bildirilmiştir (45). Malign hücrelerde bu hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına izin veren azalmış AMPK sinyali tespit edilmiştir (45).

PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının over kanserindeki onkojenik rolü karmaşıktır (45). PI3K yolu, over kanserinin ~%70'inde sıklıkla uyarılır ve aktive edilmiş PI3K sinyalinin over tümörjenezinde, agresif fenotiplerin ortaya çıkmasında, kemo-radyoterapi direncinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (45, 46). Bu yolak ayrıca kötü prognoz ile ilişkilidir ve bu da onu tedavi için önemli bir hedef haline getirir (46). Kanser Genom Atlası verileri de AKT veya MTOR'un yüksek ekspresyonlarının, yüksek dereceli seröz over karsinomunda kötü prognoz ile ilişkili olduğunu göstermektedir (46).

Buna rağmen şimdiye kadar PI3K yolu inhibitörleri ile sadece sınırlı klinik aktivite gözlemlenmiştir (46).

Bu nedenle, PI3K yolunun altında yatan mekanizmaların ve diğer yollarla etkileşimlerinin daha iyi anlaşılması, optimal kombinasyon tedavisi adaylarını belirlemek için daha önemli hale gelmektedir (46).

4. Risk Faktörleri

Ailesinde over kanseri öyküsü olan kadınların daha yüksek risk altında olduğu iyi bilinmektedir (47). Birinci derece akrabası olan kadınlar için risk, akrabası olmayan kadınlara göre yaklaşık üç kat ve akrabasına 50 yaşın altında teşhis konmuş olanlar için daha da yüksektir (47). Kalıtsal kanserlerin büyük bir kısmı BRCA genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanır; ancak bu mutasyonlar, ailesinde meme veya over kanseri öyküsü olmayan over kanseri kadınlarda da yaygındır (47). BRCA1 mutasyon taşıyıcılarının 70 yaşına kadar over kanseri geliştirme riski tahmini olarak %40-50, BRCA2 için %10-20'dir (47). BRCA mutasyonları ile ilişkili kanserlerin çoğu yüksek dereceli seröz tümörlerdir (47).

Epidemiyolojik çalışmalar, hamilelik veya oral kontrasepsiyon kullanımı gibi anovulasyona yol açan durumların veya tüp ligasyonu sayesinde menstrüel ürünlerin over üzerine azaltılmış geri akışı mekanizmalarının over kanseri riskini azalttığını göstermiştir (29). Endometriozis ve polikistik overler de over kanseri ile ilişkilendirilmiştir (29).

İnsan papilloma virüsü (HPV), perineal talk ve sigara kullanımı hastalığın nedenleri olarak dikkate alınmazken, epidemiyolojik ve genetik analizler, EOK'nin çeşitli germ hattı genetik mutasyon sendromlarında ana unsur olduğunu göstermiştir

(29). Bu genlerin nasıl katkıda bulunduğu dair mekanizmalar açıklanmamıştır (29). En yaygın olanları, BRCA1 ve BRCA2 genleri ve Lynch sendromu (endometriyal ve kolorektal kanserlerle ilişkili) gibi hatalı homolog rekombinasyon DNA onarımı ile ilişkilidir (29). DNA uyumsuzluğu onarımında rol oynayan genlerdeki mutasyonların neden olduğu Lynch sendromu, özellikle de seröz olmayan over kanser riskini artırır (47). Ek genetik sendromlar, Peutz-Jegher ve diğer daha nadir bozuklukları içerir (29). Over kanseri ile ilişkili risk faktörleri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Over kanseri ile ilişkili risk faktörleri

Artmış risk	Azalmış risk
Geç çocuk sahibi olma	18 ay veya daha uzun süre emzirme
Erken menarş	Geç menarş
Endometriozis	Multiparite
Beş yıldan uzun süredir östrojen replasman tedavisi	Oral kontraseptif kullanımı
Genetik yatkınlığı düşündüren aile öyküsü	Histerektomi*
Genetik sendromlar	Tüp ligasyonu*
Yüksek yağlı diyet-obezite	Az yağlı diyet
Geç menopoz	Erken menopoz
Düşük parite	Aspirin
Sigara	D vitamini

* Histerektomi ve tüp ligasyonu, hormonal veya potansiyel olarak kanserojen faktörlere lokal maruziyeti sınırlayan utero-ovarian kan akışının azalması nedeniyle over kanseri riskinin azalmasıyla ilişkilidir (30).

5. Klinik Belirtiler, Tarama ve Tanı

Over kanseri semptomları spesifik değildir ve tanıdan önce tipik olarak aylar süren karın şişkinliği, pelvik ağrı, erken doyma, mide bulantısı, bağırsak fonksiyonunda değişiklik, idrar semptomları, vajinal kanama, sırt ağrısı, yorgunluk ve kilo kaybı gibi şikayetlerle seyredebilir (7, 8, 48). Karın ağrısı ve şişkinlik şikayetleri

sebebiyle irritabl bağırsak sendromuyla karışabilir (29). Hastalığın diyaframdan plevral boşluklara yayılması plevral efüzyonlara ve solunum semptomlarının gelişmesine neden olabilir (7).

Hastalar inguinal bölgede, aksillada veya supraklaviküler fossada abdominal veya nodal kitlenin farkına varabilir (7).

Over kanserinde tam bir klinik değerlendirmenin ardından tanıya yardımcı olmak için rutin olarak ilk pelvik ultrason ve serum CA 125 ölçümü kullanılır (7, 8). Hastalığı doğru bir şekilde tanımlamak, yaygınlığını belirlemek, evreleme ve cerrahi planlamaya yardımcı olmak için toraks, karın veya pelvis bilgisayarlı tomografi (BT) ve pelvik manyetik rezonans görüntüleme (MRG) kullanılır (7, 8).

Optimal evreleme cerrahidir ve total abdominal histerektomi, bilateral salpingo-ooferektomi, omentektomi, biyopsi ile peritoneal yüzeylerin incelenmesi veya şüpheli alanların çıkarılması ile para-aortik ve pelvik lenf nodu diseksiyonunu içerir (8).

Evreleme prosedürü, over kanserinin Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) ile geleneksel olarak evrelemesi veya Amerikan Ortak Kanser Komitesi tarafından tümör, lenf nodu, metastaz sınıflandırmaları ile cerrahi evreyi oluşturacaktır (8).

Şu anda, over kanseri için yerleşik bir tarama testi yoktur, bu nedenle erken evrede klinik teşhisini engeller (3). Semptomlar da en sık ilerlemiş hastalıkta karşımıza çıkar (7). Bununla birlikte tanısız ilk değerlendirmede kullandığımız CA 125, FIGO evre I hastalığı olanların yalnızca yaklaşık %50'sinde yükseldiğinden, erken hastalığı saptamadaki faydası sorgulanmaktadır (7, 31). İlerlemiş hastalıkta ise yaklaşık %85'inde CA 125 yükselmektedir (7, 31).

Over kanserine özgü bir belirteç olmayan CA 125 jinekolojik olmayan malignitelerde (örneğin meme, akciğer, kolon ve pankreas kanseri) ve iyi huylu hastalıklarda (örneğin endometriozis, pelvik inflamatuvar hastalık ve over kistleri) da yükselebilmektedir (7).

Serum karsinoembriyonik antijen (CEA) ve CA 19-9 seviyeleri bazen bir over kitlesinin gastrointestinal kaynaklı mı yoksa primer müsinöz over tümörü mü olduğunun belirsiz olduğu durumlarda ölçülmektedir (7).

Kadın üreme yolunun müllerian epiteli tarafından salgılanan bir glikoprotein olan insan epididim proteini 4 gibi ek biyobelirteç kombinasyonları CA125 ile test

edilmiştir, ancak daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (8). Bu nedenle genomik tarama stratejisini iyileştirmeye yönelik çabalar da devam etmektedir (8).

6. Evreleme

FIGO evrelemesi, prognozun en güçlü göstergesi olarak kullanılmaya devam etmektedir (7, 29) (Tablo 2). Primer cerrahi en yaygın ve tercih edilen yaklaşımdır, ancak bunun mümkün olmadığı durumlarda görüntüleme kılavuzluğunda veya laparoskopik biyopsi yapılmalıdır (7).

Evreleme, total histerektomi, bilateral salpingo-ooferektomi ve tüm görünür periton tutulumlarının maksimal sitoredüktif cerrahisi ve periton boşluğunun kapsamlı cerrahi değerlendirmesiyle laparotomi yoluyla gerçekleştirilir (48).

Tablo 2. FIGO over kanseri evrelemesi

Evre I Sadece overlere ve fallop tüp(ler)ine sınırlı tümör
<ul style="list-style-type: none">• IA Sadece bir overle (kapsül sağlam) veya fallop tüpü ile sınırlı tümör; over veya fallop tüpü yüzeyinde tümör yok; asit veya peritoneal yıkamada malign hücre yok
<ul style="list-style-type: none">• IB Her iki over (kapsüller sağlam) veya fallop tüpleri ile sınırlı tümör; over veya fallop tüpü yüzeyinde tümör yok; asit veya peritoneal yıkamada malign hücre yok
<ul style="list-style-type: none">• IC Aşağıdakilerden herhangi biri ile bir veya her iki over veya tüple sınırlı tümör
IC1 Ameliyat sırasında cerrahi dökülme
IC2 Kapsül ameliyattan önce yırtılmış veya over veya fallop tüpü yüzeyinde tümör
IC3 Asit veya peritoneal yıkamada bulunan malign hücreler
Evre II Tümör, pelvik uzantılı (pelvik ağzın altında) veya primer periton kanseri olan bir veya her iki over veya fallop tüpünü içerir
<ul style="list-style-type: none">• IIA Tüpleri veya uterusu veya her ikisini birden etkileyen hastalık
<ul style="list-style-type: none">• IIB Diğer pelvik dokulara uzanma

<ul style="list-style-type: none"> • IIC Overlerden birinin veya her ikisinin yüzeyinde tümör, rüptüre kapsül, sitolojik olarak pozitif asit veya pozitif periton yıkaması olan IIa veya IIb
Evre III Abdominal hastalığı veya etkilenmiş lenf düğümleri veya her ikisi (yüzey karaciğer hastalığı hala evre III'tür)
<ul style="list-style-type: none"> • IIIA Abdominal peritoneal yüzeylerin mikroskopik tutulumu veya retroperitoneal lenf düğümlerine metastaz
IIIA(i) Yalnızca pozitif retroperitoneal lenf nodları (sitolojik veya histolojik olarak kanıtlanmış)
IIIA(ii) Boyutu >10 mm olan metastazlar
<ul style="list-style-type: none"> • IIIA2 Lenf nodları ile veya lenf nodu tutulumsuz mikroskopik periton tutulumu
<ul style="list-style-type: none"> • IIIB 2 cm çapa kadar hastalık
<ul style="list-style-type: none"> • IIIC 2 cm'den büyük hastalık +/- bölgesel lenf düğümleri
EvreIV Peritoneal metastazlar hariç uzak metastazlar: plevral efüzyonların sitolojik olarak pozitif olması ve karaciğer metastazlarının parankimal olması gerekir
<ul style="list-style-type: none"> • IVA Pozitif sitoloji ile plevral efüzyon
<ul style="list-style-type: none"> • IVB Karın boşluğu dışındaki organlara, inguinal lenf düğümlerine ve abdomen dışındaki lenf düğümlerine metastazlar

7. Over Kanserinde Prognoz

Over kanserinin prognozu, FIGO evresi ve ilk cerrahi rezeksiyon sonra kalan hastalık hacmi ile ilişkilidir (8, 29, 47). FIGO evre III hastalığı olan, cerrahi ve kemoterapiden sonra tam tedavi yanıtı elde edilen hastaların %50'sinin sağkalım süresi 5 yıldan fazladır; nükseden ve platine duyarlı over kanserli hastaların medyan sağkalımı ortalama 3 yılken; platin direncinin başlangıcından itibaren hastaların medyan sağkalımı yaklaşık 1 yıldır (29).

EOK'nin %70'i evre III veya IV'te tanı almaktadır (31). Prognoz, tanı anındaki evre ile güçlü bir şekilde ilişkilidir, ancak histolojik derece de özellikle nüksün tahmininde prognostik bir rol oynar (31).

Tablo 3. Over kanserinde kötü prognostik faktörler

65 yaşından büyük olması
Berrak hücreli veya müsinöz tümörler (histoloji)
Yaygın hastalık (ileri evre)
Büyük rezidüel tümör hacmi
Kötü hücre farklılaşması (yüksek dereceli)

8. Over Kanserinde Tedavi

Cerrahinin amacı histopatolojik tanı koymak, mümkün olduğu kadar kanser dokusunu çıkarmak ve FIGO evresini belirleyebilmektir (29). Klinik değerlendirmede kritik olan, cerrahi rezektabilite ve ek kemoterapi ihtiyacıdır (49). Evre I hastalığı olan hastalar için cerrahi rezeksiyon, tümör derecesi, histoloji ve komşu yapılara bağlılık tarafından belirlenen adjuvan tedaviyle birlikte birincil tedavidir (49). KT ile tedavi, tam cerrahi evrelemenin varlığına ve hastalığın derecesine bağlı olacaktır (49).

Over kanseri için geleneksel tedavi, cerrahi tümör sitoreduksiyonunu takiben sırasıyla platin ve taksan bazlı kemoterapi kombinasyonudur (31, 45). Cerrahi evreleme, total abdominal histerektomi, bilateral salpingo-ooferektomi ve pelvik-paraaortik lenf nodları ile omentumun çıkarılmasını ve ayrıca endike olduğunda apendektomi gibi diğer ek prosedürler içerir (29, 31). Apendektomi, metastaz olasılığı nedeniyle müsinöz over kanseri için tipik bir ek prosedürdür (31).

Genellikle, cerrahi olarak doğru evrelenmiş, iyi diferansiye hastalığı olan hastalar adjuvan kemoterapi tedavisi olmaksızın gözlemlenebilirken, evre II ve evre III hastalar genellikle 3 ila 6 kür ek adjuvan platin/taksan bazlı tedavi alırlar (49). Pratikte standart öneri, altı kür platin adjuvan tedavisidir (8). Her 3 haftada bir intravenöz karboplatin ve paklitaksel uygulaması, ileri evre EOK için standart birinci basamak KT ilaç tedavisidir (8).

Düşük malignite potansiyeline sahip over kanseri tipik olarak 30 ila 50 yaş arasındaki kadınlarda görülür (31). Hastaların yüzde 82'sinde evre I'de ortaya çıkar ve yüzde 99'a varan bir sağkalıma sahiptir (31). Bu olumlu prognoz, tek taraflı salpingo-ooferektomi gibi fertilitiyi koruyucu konservatif önlemlerin değerlendirilmesine izin

verir (31). Cerrahi sitoredüksiyon terapötik olarak kabul edilir ve adjuvan kemoterapi, postoperatif rezidüel hastalığı veya tanımlanabilir invaziv implantları olan hastalar için uygulanabilmektedir (31). İlerleyen dönemde nüks olasılığı nedeniyle reproduktif yıllardan sonra total abdominal histerektomi ve unilateral salpingo-ooferektomi ile cerrahi tedavinin tamamlanması düşünülmelidir (31).

Evre IA düşük dereceli olan tümörlerde ve fertilitiyi koruma cerrahisini tercih eden hastalarda, çıkarılan dokuların patolojik incelemesiyle uterus ve kontralateral over yerinde bırakılabilir (8). Düşük dereceli hastalığı olan genç hastalar için konservatif cerrahi, kalan normal over ve uterusun korunması da dahil olmak üzere kesinlikle endikedir, ancak mümkünse hastalığın derecesinin çok iyi belirlenmesi gerekmektedir (49).

Daha kötü bir prognoza işaret eden histolojiler arasında berrak hücreli veya farklılaşmamış kanserler bulunurken, daha iyi prognoz müsinöz veya geçiş hücreli kanser ile ilişkilidir (49).

BRCA mutasyonuna uğramamış kansere kıyasla BRCA 1 veya 2 ile ilişkili kanserler, kemoterapiye daha iyi yanıt verme eğilimindedir ve daha uzun sağkalıma sahip olabilmektedirler (49, 50, 51).

Özetle; EOK'nin evre II-IV için tedavi seçenekleri, mümkünse tam cerrahi rezeksiyon, ardından platin bazlı kemoterapi veya neoadjuvan kemoterapi kullanımı, aralıklı sitoredüktif cerrahi ve ardından ek platin/taksan kemoterapisinden oluşur (49).

Neoadjuvan kemoterapi, tümörlerinin tamamen gros rezidüel hastalık (R0) olmayacak şekilde sitoredüksiyona uğramasının muhtemel olmadığı veya cerrahi adaylığı zayıf olan evre III veya IV olan hastalarda düşünülmektedir (1).

Şu anda ileri evre over kanseri için standart ve kabul edilebilir 5 tedavi seçeneği bulunmaktadır (49):

1. Sitoredüktif cerrahiye takiben IV platin/taksan bazlı kemoterapi
2. Sitoredüktif cerrahiye takiben IP/IV kemoterapi
3. Sitoredüktif cerrahiye takiben bevacizumab idamesi ile IV platin/taksan bazlı kemoterapi
4. 3 ve 6 kür kemoterapi arasında aralıklı sitoredüktif cerrahi ile neoadjuvan kemoterapi, kemoterapiye takiben batın içi yönlendirilmiş bölgesel

tedavi (ameliyat sırasında veya sonrasında ısıtılmış intraperitoneal kemoterapi-heated intraperitoneal chemotherapy [HIPEC])

5. Ameliyat olamayan veya neoadjuvan kemoterapi yoluyla ilerleme kaydedemeyen hastalar için kemoterapi

Vasküler endotelial büyüme faktörüne (VEGF) karşı bir monoklonal antikor olan bevacizumab yani bu antianjiyogenik tedavi, tekrarlayan, platine dirençli over kanserinde kullanım için onaylanmıştır (44).

DNA hasar yanıtı yolları over kanserinde aktif terapötik hedeflerdir (46). Poli ADP-riboz polimeraz inhibitörü (PARPi) olan olaparib'in başarılı bir şekilde kullanılması, özellikle BRCA mutasyonları olanlar için yeni bir tedavi modelinin oluşmasına yol açmıştır (46). Olaparib, BRCA mutasyonları ve tekrarlayan hastalığı olanlarda kullanım için 2014 yılında onaylanmıştır (44). PARP inhibitörleri, immünoterapi ve ısıtılmış intraperitoneal kemoterapi (heated intraperitoneal chemotherapy-HIPEC) alanındaki yeni tedavilerin, over kanseri için mevcut tedavi modelini dönüştürme yeteneğine sahip olduğu ve sağkalımı önemli ölçüde artıracığı düşünülmektedir (1).

Aslında, platine duyarlı, nükseden over kanseri olan hastalar için idame tedavisi olarak PARP inhibitörü niraparib'i kullanan yakın zamanda yayınlanmış bir faz III klinik denemesi, BRCA veya homolog rekombinasyon eksikliği durumlarından bağımsız olarak hastaların önemli ölçüde uzamış progresyonsuz sağkalımını göstermiştir (44). Bu gözlemler, PARP inhibitörlerinin over kanseri tedavisinde daha geniş bir rolü olabileceğini düşündürmektedir (44). Bunun gibi çalışmalar, PARP inhibitörlerinin over kanserli birçok birey için tedavi sürecini değiştirme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (44).

SİSPLATİN

Sisplatin ilk metal bazlı kemoterapötiklerden biridir ve ciddi yan etkilerine, direnç geliştirmelerine rağmen over kanserinin ana tedavisi olarak kullanılmaktadır (52, 56). Cis-diamindikloroplatin (II) (en çok sisplatin olarak bilinir), over, testis, mesane, kolorektal, akciğer ve baş-boyun dahil olmak üzere geniş bir solid kanser yelpazesine karşı klinik aktiviteye sahip platin bazlı bir bileşiktir (52, 53, 54, 55). Sisplatin ile ilişkili yan etkiler bulantı, kusma, miyelosupresyon, hepatotoksisite,

nefrotoksisite, nörotoksisite, ototoksisiteyi içerir (52, 53). Bununla birlikte, ana sınırlayıcı faktör, apoptozu indükleyen ROS üretiminin bir sonucu olarak kümülatif nefrotoksisitedir (52, 55).

Sisplatin hücreye difüzyon veya bir taşıyıcı ile girer ve hücre içindeki daha düşük klorür konsantrasyonları nedeniyle klorür iyonlarını serbest bırakarak hidrate hale gelir (53). Sisplatinin bu sulu bileşim formu, nükleer ve mitokondriyal DNA'nın nükleotidleri ile çapraz bağlar kurarak kanser hücrelerinin sınırsız replikasyonunu inhibe eder (53, 54, 55). Ek olarak, sisplatin süperoksit anyonları ve hidroksil radikallerinin üretimi yoluyla oksidatif strese neden olmaktadır (55).

Sisplatin, birden fazla mekanizma yoluyla antikanser aktivite gösterir, ancak en kabul edilebilir mekanizması, DNA üzerindeki pürin bazları ile etkileşime girerek DNA lezyonlarının üretilmesini ve ardından apoptoza yol açan birkaç sinyal iletim yolunun aktivasyonunu içerir (56). DNA lezyonları oluşturmak, mesajcı ribonükleik asit (mRNA) ve proteinlerin üretimini bloke etmek, DNA replikasyonunu durdurmak, sonunda nekroz veya apoptoza yol açan çeşitli transdüksiyon yollarını etkinleştirmek için genellikle genomik DNA veya mitokondriyal DNA ile bağlanır (56).

Bu nedenle, platin bazlı kemoterapi şu anda yüksek dereceli seröz over kanseri olan hastalar için, şiddetli yan etkilere ve kullanımına bağlı direnç gelişmesine rağmen hala etkili bir tedavi olarak kullanılmaktadır (54, 55). Genellikle bu hastalar birinci basamak tedaviden yararlanır, ancak sonrasında kanser nüksü ve kemorezistans gelişebilmektedir (54, 55). Sisplatin direncinden kanser hücrelerinde ilaç birikiminin azalması, ilacın glutatyon ve metallothioneinler ile reaksiyona girerek etkisiz hale getirilmesi ve DNA lezyonlarının daha hızlı onarılması sorumludur (56).

Sisplatinin klinik sınırlamaları, araştırmacıları binlerce sisplatin analogu oluşturmaya yöneltmiştir (56). Ancak dünya çapında yalnızca ikisi (karboplatin ve oksaliplatin) onaylanmıştır ve birkaçı klinik deneylere girmiştir (56). Ancak platin bileşiklerinin çoğu, sisplatine göre önemli bir avantaj göstermemektedir (56).

PAKLİTAKSEL

Paklitaksel orijinal olarak *Taxus brevifolia*'dan izole edilen bir kemoterapötik ajandır (57, 58). Son yirmi yılda kemoterapide en önemli ilerleme olarak kabul edilen

ilk mikrotübül stabilize edici ajandır (59). Antimitotik antikanser ajanlar ailesine aittir ve β -tubulin alt birimlerine bağlanarak mikrotübülleri stabilize ederek mitozu bloke eder (57). Sonuç olarak, paklitaksel hücre bölünmesini bloke eder ve apoptotik hücre ölümüne yol açar (57). Klinik olarak over, meme, endometriyal, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, mesane ve serviks kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde geniş aktiviteye sahip en yaygın kullanılan antineoplastik ajanlardan biridir (57, 59, 60). Ne yazık ki, birçok kanser ilaç direnci geliştirmektedir (57). Bazı kanser hücreleri, ilaç etkisine karşı daha düşük paklitaksel afinitesi olan mutasyona uğramış β -tubulini ifade eder. (57). Bununla birlikte ilaç direncinin en önemli mekanizması, ABC ailesinden ilaç taşıyıcılarının aşırı ekspresyonudur (57). Bu mekanizmalar arasında en önemlisi, MDR1 geni tarafından kodlanan glikoprotein P'nin (P-gp, ABCB1) ekspresyonudur (57).

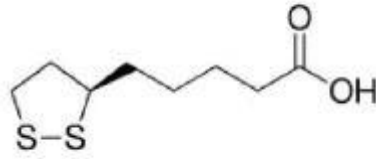
Tübülün mikrotübüller halinde birleşmesini önleyen diğer tübülün bağlayıcı antikanser ilaçların aksine, paklitaksel tübülün mikrotübüller halinde birleşmesini teşvik eder ve mikrotübüllerin ayrışmasını önleyerek hücre döngüsü ilerlemesini bloke eder, mitozu önler ve kanser hücrelerinin büyümesini engeller (58). Profaz sırasında, mikrotübüller kromozomları kutuplara doğru çekmek için bir iğ oluşturur (58). Daha sonraki aşamalarda depolimerize olurlar ve iğ yapısı çözülür (58). Paklitaksel tedavisi tübülün polimerizasyonunu destekler ve mitozun ilerlemesini engeller (58).

Bir dizi klinik denemeden sonra, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), 1992'de ileri over kanseri tedavisi için paklitaksel'i onaylamıştır (58). O zamandan beri de paklitaksel meme, kolorektal kanser ve mesanenin skuamöz hücreli karsinomunun tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (58). Ayrıca ikinci basamak tedavi olarak AIDS ile ilişkili Kaposi sarkomunun tedavisinde de kullanılır (58, 59, 60).

ALFA LİPOİK ASİT

ALA, tüm prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde bulunan doğal bir antioksidan bileşiktir (61). İnsanlar da dahil olmak üzere bitkiler ve hayvanlar tarafından küçük miktarlarda sentezlenir (61). Tiyoasetik asit olarak da bilinen ALA, yapısında kükürt içeren kısa zincirli bir yağ asididir (Şekil 4) (62). Çok sayıda metabolik fonksiyonda yer alan organik bir bileşiktir ve hem suda hem de yağda çözünür (63). İnsanlarda ALA, piruvat dehidrogenaz (PDG) ve α -ketoglutarat dehidrogenaz (KGDG)

kompleksleri gibi enerji metabolizmasında yer alan birkaç mitokondriyal çoklu enzim kompleksi için temel bir yardımcı faktör olarak görev yapar (61, 63). Diyabet, hipertansiyon, ateroskleroz, Down sendromu, bilişsel işlev bozukluğu, meme kanseri, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere oksidatif stresle ilişkili patolojilerin ve bazı kanser türleri gibi birçok hastalık durumunun tedavisinde sıklıkla kullanılır (61, 62). Araştırmacılar, bu kronik hastalıkları tedavi etmedeki etkinliğinin ötesinde, çeşitli kanser türlerinde de olumlu etkilerini kanıtladılar (61). ALA'nın terapötik bir ajan ve besin takviyesi olarak kullanımı hızla büyümektedir (62). ALA'nın antioksidan etkisi, ROS'u temizleme ve endojen antioksidanları yenileme yeteneği nedeniyle hücrel büyümede önemli bir rol oynar (62, 63). ALA, serbest radikal süpürücü olarak benzersiz bir özellik gösteren dihidrolipoik aside (DHHLA) indirgenir (62, 63).



Şekil 4. ALA kimyasal yapısı

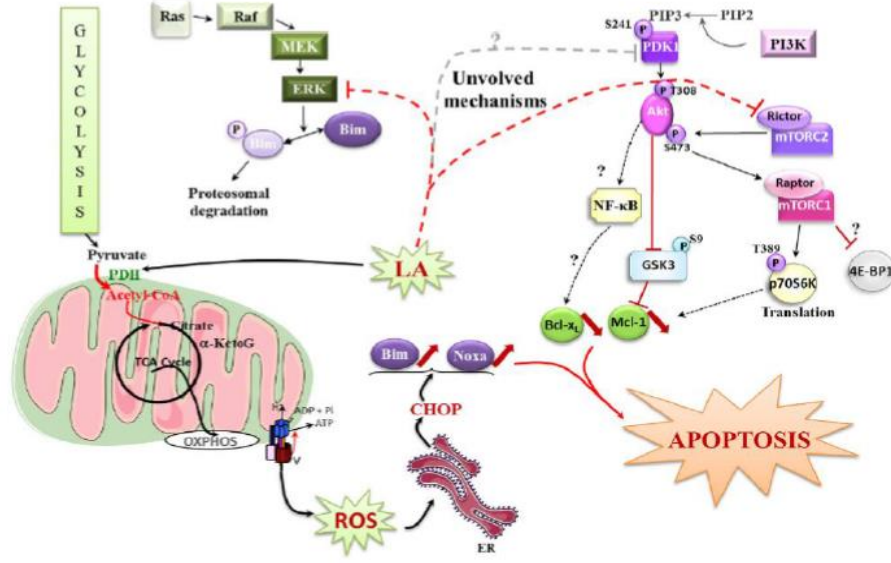
ROS temizleyicileri olarak ALA'nın iki karşıt rol oynadığı söylenmektedir; konsantrasyon ve redoks modülasyonuna bağlı olarak antioksidanlar ya da pro-oksidanlar (62). Küçük dozlarda reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırarak normal hücreleri korurlar. Bununla birlikte, belirli bir yüksek eşikte, kanser hücrelerinde apoptozu ve sitotoksiteyi indükleyebilirler (62).

Çalışmalar, ALA'nın eksojen uygulamasının çeşitli kanser türlerinde proliferasyonu engellediğini göstermiştir (61). Tümör proliferasyonunun, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) dahil olmak üzere farklı tirozin kinaz reseptörlerinin (TKR'ler) aşırı ekspresyonundan kaynaklandığı ve PI3K/AKT, ERK ve mTOR gibi onkojenik sinyal yollarının aktivasyonuna yol açtığı iyi bilinmektedir (61). Birlikte ele alındığında, ALA, EGFR sinyal yollarını hedefleyerek önemli bir anti-proliferatif rol oynar (61). Ayrıca özellikle kanser gelişiminde rol oynayan c-Myc'nin

aktivasyonunu bloke ederek ERK'nin fosforilasyonunu önler (61). Ayrıca, ALA, PI3K'nin aktivasyonunu engeller ve bu yolların inhibisyonunu güçlendirir (61).

Antiproliferatif rolüne ek olarak, ALA doza bağlı bir şekilde farklı kanser hücrelerinin apoptozisini indükler (61). Apoptoz, pro- ve antiapoptotik proteinler olmak üzere iki protein alt tipi tarafından kontrol edilir (61). Çalışmalar, ALA'nın, anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler arasındaki dengeyi düzenleyerek çeşitli kanser hücre dizilerinde apoptozu destekleyen ROS üretebildiğini göstermiştir (61). AKT'nin fosforilasyonu, anti-apoptotik proteinlerin (Mcl-1, bcl-xL) indüklenmesini ve pro-apoptotik proteinlerin (örn. Bim, Nova, Bax) azalmasını tetikler (61). ALA üç farklı düzeyde hareket eder; ilki AKT yolunu inhibe ederek anti-apoptotik proteinlerin baskılanmasına ve pro-apoptotik proteinlerin artmasına neden olur (61). İkincisi ROS üretimi ile pro-apoptotik proteinlerin transkripsiyonunu indükler (61). Üçüncüsü AKT yolunu negatif olarak düzenleyen AMPK proteinini aktive eder (61) (Şekil 5).

ALA'nın anti-tümör etkileri, p53 proteininin artması yoluyla G1 fazında hücre döngüsü durmasıyla gerçekleşmektedir (62). p53, hücre döngüsü kontrol noktalarını, DNA onarımını ve apoptozu modüle etmede önemli bir rolü olan bir tümör baskılayıcı faktördür (62). Ek olarak, p53, ROS üretimi ve ROS kaynaklı oksidatif stres ile ilişkilendirilmiştir (62). Tümör hücrelerinin p53'ten yoksun olduğu bilindiğinden, ALA'nın da komşu normal hücrelere kıyasla tümör hücrelerinde p53 gen ekspresyonunu seçici olarak arttırdığı gösterilmiştir (62).



Şekil 5. ALA'nın tümör oluşumunda yer alan sinyal yolları ve apoptoz üzerindeki etkileri (16)

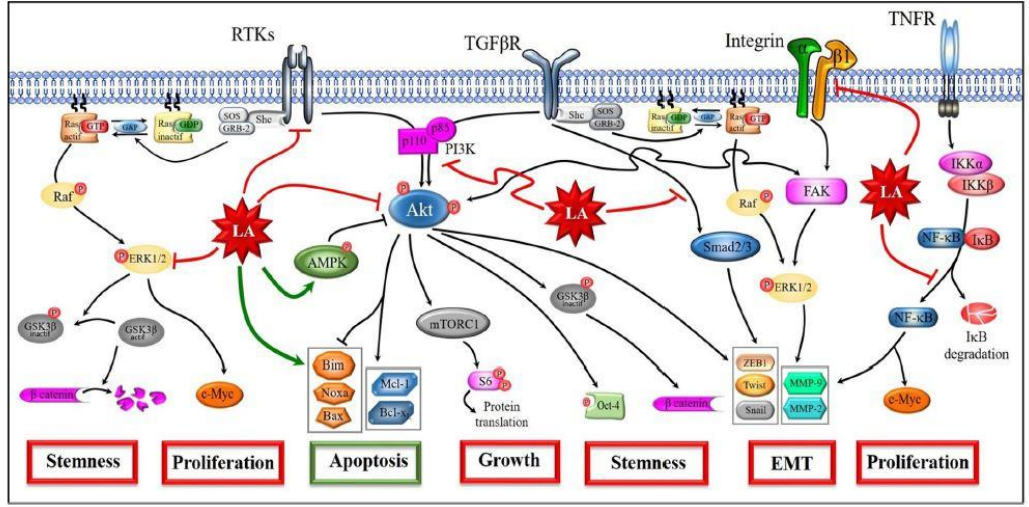
İnvazyonda yer alan anahtar enzimler, özellikle MMP-2 ve MMP-9, tip IV kollajeni bozar ve tümör hücresi invazyonu ve malignitede çok önemli roller oynar. ALA'nın meme kanseri hücre dizilerinde doza bağımlı bir şekilde MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyonunu azaltarak invazyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (61, 65). Bu bulgularla uyumlu olarak ALA, E-cadherin'i artırarak ve N-cadherin, vimentin ve aktive edilmiş β -katenin'i azaltarak EMT sürecini de inhibe etmektedir (61).

Yapılan çalışmalar, etkinliklerini artırmak için ALA'yı antikanser ilaçlarla birleştirmenin umut vadecisi olduğunu göstermektedir (61).

ALA kemoterapinin sitotoksitesini arttırmadaki potansiyel rolüne ek olarak, hastaları nöropati, bağırsak hasarı ve ishale karşı koruyarak KT yan etkilerine karşı önleyici bir role sahiptir (61).

Bu nedenle, ALA, proliferasyon, invazyon, migrasyon, EMT ve apoptoz ile ilgili sinyal yollarının çoğunda birkaç ayırt edici özelliği etkileyerek çeşitli kanser modellerinde anti-tümör aktiviteler sergilemektedir (Şekil 6) (61).

Bu nedenle ALA, kanser karşıtı tedavileri geliştirmek için umut verici bir molekül olabileceği öngörülmektedir (61).



Şekil 6. ALA'nın tümör oluşumunda yer alan sinyal yolları üzerindeki etkileri (Yeşil oklar ve çerçeve aktivasyonu; kırmızı oklar ve çerçeveler inhibisyonu gösterir)

MATERYAL VE METOD

ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİMYASALLAR VE SARF MALZEMELER

RPMI 1640 (Roskuyucuklu Park Memorail Institute) with L-glutamine, with 25mM HEPES (CAPRICORN), Fetal Bovin Serum (FBS) (GIBCO), Penicillin-streptomisin (CAPRICORN), Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS) (CAPRICORN), Trypsin-EDTA (Biological Industries), TRIzol Reagent (Invitrogen), İsoopropanol (Sigma), Ethanol (Honeywell), Methanol (Honeywell), Primerler (Sentebiolab), Kristal Viyole (BioShop), Dimetil sülfoksit (DMSO) (Roche), Sterile Water Molecular Grade (Multicell), 6, 24, 96 kuyucuklu hücre kültür kabı (NEST), 96- Kuyucuklu PCR Array Plak (Thermo), T25 flask ve T75 Flask (Cellstar), Falcon Tüpü (Cellstar), rezervuar (NEST), RIPA (Milipor), Sisplatin (Cayman Chemical Company Item: 13119), Paklitaksel (Cayman Chemical Company Item: 10461), Alfa Lipoik Asit (Sigma, Lot # WXBC8687V)

Çalışmada kullanılan diğer tüm kimyasal maddeler analitik derecede ve yüksek saflıkta olacak şekilde ticari kaynaklardan elde edilmiştir.

ÇALIŞMALARDA KULLANILAN CİHAZLAR

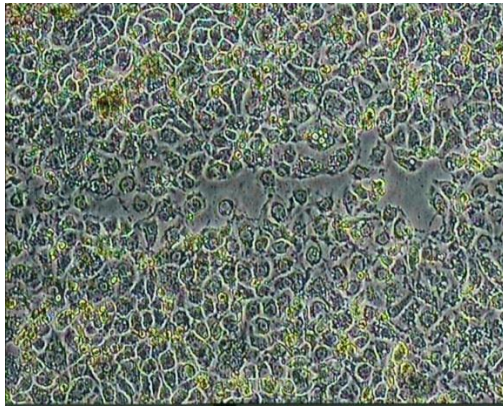
CO₂'li inkübatör (Nuair DHD AutoFlow CO₂ Air Jacketed Incubator), Biological Safety Cabinets Class II Laminar Flow (Teknomar Chemocell LRCX-UV), inverted mikroskop (Olympus CKX41), su banyosu (Mettler), otomatik mikropipetler (10, 200, 1000 µl'lik) (Brand), hassas terazi (Denver Instrument SI 234), Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 (Thermo), santrifüj (Hettich Zentrifugen Rotofix 32), mikro-santrifüj (Hettich Zentrifugen Mikro 200R), Soğutmalı Santrifüj (Hettich Zentrifugen), Thermal cycle (Techne TC-3000), RT- PCR (Thermo Scientific PikoReal 96), -20 Derin Dondurucu (BEKO), No Frost Buzdolabı (BEKO), kuru inkübatör (Nuair incubator EN 120), Vorteks (Dragon Lab MX F), -80°C Dondurucu (Nuair), Arthur Image Based Cytometer

ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİTLER

BI Cell Proliferation Kit XTT based Colourimetric Assay (REF: 20-300-1000, LOT: 2046899), Corning Matrigel Invasion Chamber 24 well plate 8.0 micron (Lot 7338003), Total Antioxidant Status Assay Kit (Rel Assay Diagnostics Lot MT 20116A), Total Oxidant Status Assay Kit (Rel Assay Diagnostics Lot MT 201280), cDNA (Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit) Synthesis Kit with Rnase Inhibitor (High Capacity) (A.B.T. Lot W4F0121-04), 2X qPCR SYBR-Green MasterMix-without ROX (A.B.T. Lot W2CO221-Q4), ELISA KIT'leri (Bioassay Technology Laboratory), Human Phospho-AKT ELISA Kit (Lot 202104006), Human Phospho-Mammalian target of rapamycin ELISA Kit (Lot 202105004), Human phospho forkhead box O1 ELISA Kit (Lot 202104006), Human Mitogen activated protein kinase ELISA Kit (Lot 202104006), Annexin-V-Floresanin İzotiyosiyanat (FITC) / Propidyum İyodür (PI) Apoptosis Kit (A.B.P. Lot AB 2126A1), TUNEL Chromogenic Apoptosis Detection Kit (A.B.P. Catalog Number A049)

OVCAR-3 HÜCRE HATTININ TEMİNİ VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

OVCAR-3 hücreleri over kanserinin en sık görülen epitelyal alt tipinden olan insan ovarian adenokarsinoma hücreleridir. Çalışmamızda kullanılan hücreler daha önce ATCC'den alınan ve laboratuvarımızda stoklanan hücre dizinidir. Deneyler Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histolojisi ve Embriyoloji Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 7. Çalışmamızda kullandığımız OVCAR-3 hücrelerinin 4X inverted mikroskopik görüntüsü

OVCAR-3 hücrelerinin rutin kültür basamakları; hücrelerin kültür ortamında çoğaltılması, pasajlanması, ekim için sayılması, kullanılacak kültür plakalarına ekilmesi, dondurulması ve çözülmesini kapsamaktadır.

In vitro koşullarda yapılan hücre kültürü için kullanılan besi ortamı, hücrelerin bu koşullarda yaşamaları, büyüme ve bölünmeleri için gereksinim duydukları maddeleri içerecek düzeyde olmalıdır. Çalışmamızda kullanılan besi ortamı %10 FBS, %1 L-glutamin, penisilin (100 U/ml) + streptomisin (100 mikrogram [μg]/ml) içeren RPMI 1640 besi yeridir. Hücrelerin proliferasyonu, pasajlanmaları ve takip işlemleri inverted mikroskop ile izlendi. Hücreler kendileri için uygun kültür ortamı olan 37°C'de, %95 nem ve %5 CO₂'li inkübatörde takip edildi, %80-90 sıklığa eriştiklerinde çalışmalar yapıldı.

Hücreler çoğaltılma ve pasajlanma işleminde; RPMI 1640 besi yeri ile T25 flasklara ekildi ve 37°C'de, %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde iki günde bir besi ortamları tazelenerek inkübe edildi. Monolayer olup tutunarak üreyen hücrelerin pasajlanması için ilk olarak yapışıkları yüzeyden ayrılması gerekir. Flasklar öncelikle PBS ile yıkanıp ölü hücrelerden ve hücre artıklarından iyice arındırıldı sonrasında bunlar aspire edildi. Devamında tripsin ilave edilerek hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlandı. Flask içerisindeki hücre-ortam karışımı 15 ml'lik falkonlara aktarılıp 1500 rpm 'da 4 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. Çöken hücreler taze besi yeri ile homojenize edilerek uygun oranda flasklara ekimi gerçekleştirildi. Hücrelerin yeniden flaska yapışıp çoğalmalarının sağlanması için inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin sayım aşamasında tripan mavisi boyası kullanıldı. Tripan mavisi sadece ölü hücrelerin membranlarından geçebildiği için ölü hücreler mavi (boya almış) ve canlı hücreler boya almamış olarak görülür. Bu hücre sayım aşamasını gerçekleştirebilmek için hücreler yukarıda bahsettiğimiz tripsinizasyon işleminden geçti. Santrifüj sonrasında kalan pelet üzerine 5ml taze besi yeri eklendi. 1ml'lik ependorf tüpe, 45 mikrolitre (μl) tripan mavisi üzerine 5 ml'lik hücre süspansiyonundan 5 μl eklenerek hücre süspansiyonu 10 kat dilüe edildi. Bu karışımdan 10 μl alınarak neubauer lamına eklendi. Böylece canlı hücre sayımı gerçekleştirildi ve bu aşama hücre ekimi yapılacak her bir deney testi için ayrı ayrı yapılarak çalışmaya göre çeşitli sayılarda ekim gerçekleştirildi.

Hücrelerin dondurularak saklanması, kriyotüpler içerisinde DMSO kullanılarak yapıldı. Hücrelerin dondurulması, tripsinizasyon ve santrifüj basamakları yapıldıktan sonra 1,5 ml hacimli kriyotüplere, 9:1 oranında besiyeri ile süspansiyon hücre ve DMSO (%10 DMSO) konularak gerçekleştirildi. Kriyotüplere konulan hücreler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C’de muhafaza edildi.

Dondurulmuş hücrelerin yeniden çözülüp ekilmesi aşamasında kriyotüpteki hücreler hızlı bir şekilde 37°C’de su banyosunda çözülüp biraz taze besi yeri eklenerek önce falkona alınıp santrifüj edildi, DMSO içeren besi yeri uzaklaştırıldı. Ardından taze besi yeri ile homojenize edilerek kültür kaplarına ekilip uygun kültür ortamında inkübe edildi.

XTT TESTİ (HÜCRE CANLILIĞI TESTİ)

ALA, sisplatin, paklitaksel değişen dozlarda OVCAR-3 hücrelerine uygulanıp zamana ve doza bağımlı olarak hücre canlılığının tespiti ve hücrelerin yüzde ellisinin (%50) yaşadığı dozu (IC₅₀) saptamak için XTT hücre proliferasyon testi kullanıldı. Çalışmada kullanılan Sisplatin (Cayman Chemical Company Item: 13119), Paklitaksel (Cayman Chemical Company Item: 10461), Alfa Lipoik Asit (Sigma, Lot # WXBC8687V) ≥ %98 saflıkta temin edildi.

Bu testte suda eriyebilen bir madde olan XTT’nin canlı hücrelerde turuncu renkli formazon bileşenlerine indirgenmesi prensibi kullanılmaktadır. Boyanın yoğunluğu bir spektrometre ile okutulmakta ve metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılı olan formazon oluşumu sayesinde hücre canlılığı testi sonuçları hızlı bir şekilde değerlendirilebilmektedir.

Kullandığımız maddelerin sitotoksitesisi ve doz ile zamana bağlı etkisi “BI Cell Proliferation Kit XTT based Colourimetric Assay (REF: 20-300-1000, LOT: 2046899)” ile yapıldı. Toz halinde bulunan maddeler çeşitli dozlarda %10 serumlu tam besi ortamında binde bir oranında DMSO içinde çözüldü ve konsantrasyonları ayarlanarak etkileri araştırıldı. Seçilen konsantrasyon aralığı literatür bilgileri dikkate alınarak belirlendi. Test kit protokolüne göre gerçekleştirildi.

Hücreler 96 kuyucuklu hücre kültürü plakaları içine 1x10⁴/kuyucuk OVCAR-3 hücresi olacak şekilde 100 µl RPMI içinde ekildi. Hücreler yüzeye yapışmaları için 37 °C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. 24 saatin sonunda besi yeri aspire

edildi. Ardından ALA için, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 125 µM, 250 µM, 500 µM, 750 µM, 1 milimolar (mM); Sisplatin için, 0,0625 µM, 0,125 µM, 0,25 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 4 µM, 8 µM, 16 µM, 32 µM, 64 µM, 128 µM; Paklitaksel için, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM çalışma konsantrasyonları %10 serumlu tam besi ortamı içinde hazırlandı. Hazırlanan dozlar 100 µl besi yeri ortamı içinde kontrol kuyucukları dışındaki kuyucuklara uygulandı. Her doz triplike çalışıldı. Aynı zamanda zamana bağlı etkiyi de araştırmak için 24, 48 ve 72. saatler için doz uygulandı. 24 saat sonunda her kuyucuk için 100 µl besi yeri, 50 µl XTT reagent solution A, 1 µl XTT activator solution (aktivatör) karışımı hazırlanıp kuyucuk başına ilave edildi (Kit kullanımına göre). Ardından hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 4 saat inkübe edilip çalışılan grupların absorbans değerleri ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okundu. Hücre canlılığı yüzdesi her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile hesaplanarak IC₅₀ oranı belirlendi.

Hücre canlılığı (%) = (Madde uygulanan grubun absorbans değeri / Kontrol grubunun absorbans değeri) x100

24, 48 ve 72. saat değerlerine göre çıkan sonuçlarla AAT Bioquest programı kullanılarak IC₅₀ değerleri hesaplandı.

Ardından elde edilen IC₅₀ dozları üzerinden kombine dozlar için XTT deneyleri 24, 48, 72 saat için 3 tane 96 kuyucuklu plakaya 1x10⁴/kuyucuk hücre ekilerek uygulandı. Deney grupları aşağıdaki gibi seçildi:

- Kontrol
- ALA IC₅₀
- Sisplatin IC₅₀ + Paklitaksel IC₅₀
- ALA IC₅₀ + Sisplatin IC₅₀ + Paklitaksel IC₅₀

TRİZOL REAGENT İLE TOTAL RNA İZOLASYONU

Gen düzeyinde ekspresyon değerlendirmesi yapabilmek amacıyla kontrol ve doz gruplarında RNA izolasyonu yapıldı.

1. Her kuyucuk başına 3x10⁵ hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plaklara hücre ekimi yapıldı. XTT ile tespit edilen IC₅₀ dozları ve kontrol gruplarına madde uygulaması sonrası belirlenen IC₅₀ süresi kadar inkübe edildi.

2. Hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarından, bir kuyucuk başına 500 µl olacak şekilde Trizol ilave edilip scraper kazıyıcı ile tamamen kaldırılıp ependorf tüplere (1 ml'lik) aktarıldı.

3. Her bir ependorf tüpe 200 µl kloroform eklenip ve iyice pipetlenip vortex yapıldıktan sonra tekrar oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi.

4. Soğutmalı santrifüj ile +4°C' de 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilip renksiz olan üst faz toplandı, ependorf tüplere alındı.

5. Toplanan üst fazın üzerine 250 µl izopropanol eklenip pipetlendi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyonu yapıldı.

6. Soğutmalı santrifüjde +4°C'de 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi.

7. Peletin üzerine 500 µl moleküler biyolojik grade %70'lik ethanol eklendi. (%70'lik yapmak için moleküler grade steril water kullanıldı)

8. Soğutmalı santrifüjde +4°C'de 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj yapıldı.

9. Süpernatant atılıp pelet kısa bir süre hava ile kurutuldu.

10. Pellet 40 µl RNase-DNase free water ile çözüldü.

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazı (Thermo) yardımı ile tespit edildi.

Nanodrop cihazı RNA konsantrasyonlarını otomatik olarak hesaplayıp vermektedir. Hesaplama işlemini $260\text{nm Abs} \times 40$ formülasyonuna göre hesaplamaktadır. İzole edilen RNA'ların saflıkları spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm ile yapılan ölçümlerin karşılaştırılmasından hesaplanır. 260/280 oranı, örneklerin saflığı ile ilgili tahmini bir karşılaştırma olanağı sunar. Doğru örnek kalitesini değerlendirmek için 260/280 oranları genel spektral kalite birlikte analiz edilir.

Elde edilen RNA lar ependorf içinde -20°C veya -80°C de saklanabilir.

CDNA SENTEZİ

İzole edilen RNA'lardan, cDNA sentezi için cDNA Synthesis Kit with Rnase Inhibitor (High Capacity) ile oligo d(T) primeri ve Revers Transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak üretici firmanın protokolü doğrultusunda gerçekleştirildi.

Kit içeriği:

1. RTase (200U/µl)

2.10X Reaction Buffer

- 3.RNase Inhibitor (40U/ μ l)
 - 4.20X dNTP mix (2.5mM each)
 - 5.Random hexamer (50pM)
 6. RNase free water
- Total RNA: 10ng-5 μ g
Poly(A)+ RNA:1ng-500ng

Protokol:

1. 2X RT master mix hazırlanışı: hacim toplamı 10 μ l olmalı

Without RNase inh:		With RNase inh
10X Reaction Buffer---	→ 2 μ l	2 μ l
20X dNTP mix	1 μ l	1 μ l
Random hexamer.	2 μ l	2 μ l
WizScript™ RTase.	1 μ l	1 μ l
RNase Inhibitor.	-	0,5 μ l
RNase free water.	4 μ l	3,5 μ l

(İşlemlerin hepsi buz üstünde yapıldı)

- 2.10 μ l 2X RT master mix den mikrosantrifüj tüpe alındı.
- 3.10 μ l RNA örneği eklendi. Pipetlendi.
- 4.Mini santrifüj ile baloncuklar elimine edildi.
- 5.Termal cycle a yerleştirildi. Termal cycle programı:

25 °C → 10 dk

37°C → 120 dk

85 °C → 5 dk

+4 °C de → bir süre kalabiliyor

Termal cycle sonrası ependorflar RT-PCR yapmak üzere -20°C’de muhafaza edildi.

GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (REAL-TİME PCR, RT-PCR)

Gen ekspresyon ürününün kantitasyonu amacıyla kullanılan hassas moleküler bir metottur. Bu yöntem ile RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte ve çok sayıda örnek çalışılabilmektedir. RT-PCR’da ürünlerin analizi reaksiyon esnasında yapılmaktadır. Çalışmamızda 96 kuyucuklu mikroyapıya

okuyabilen RT-PCR sistemi kullanılmıştır. ALA, sisplatin, paklitaksel uygulaması sonrasında hücre dizininden total RNA izolasyonu yapıldı ve takiben elde edilen RNA'ların miktar ve kalitesi tespit edildi. Sonrasında, total RNA'lardan cDNA Synthesis Kit with Rnase Inhibitor (High Capacity) ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezinden sonra, mRNA seviyelerindeki ekspresyon düzeyleri farklılıkları RT-PCR yöntemi ile belirlendi. Bütün doz grupları için her bir gen triplike olarak çalışıldı. ALA, sisplatin ve paklitaksel tekli ve kombine uygulamalarının OVCAR-3 hücrelerinde kontrol grubuna göre apoptoz, hücre döngüsü, PI3K-AKT yolağı ve tümör hücresi adezyonlarıyla ilişkili genlerin ifadelerinin nasıl değiştiği ve istatistiksel olarak anlamlılık değerleri araştırıldı. Bu amaçla öncelikli olarak panelde yer alan genlere uygun gömülü primerler için cihazda yapışma sıcaklıkları ve döngü sayısı optimizasyonları yapıldı. Reaksiyon sonucunda elde edilen Cq (quantification cycles) değerleri dikkate alınarak kontrol ve doz gruplarındaki gen ifadelerindeki değişim hesaplandı. Her panelde referans-housekeeping genler PCR kontrol grubunda yer alarak hedef genlerdeki rölatif değişikliği analiz etme imkanı sunmaktadır. PCR sırasında elde edilen amplikonlar (çoğaltılan gen ürünü), doğrudan logaritmik artışa geçtikleri döngü sayısına göre değerlendirildi. Önce konsantrasyonu bilinen seçtiğimiz housekeeping gen beta-aktin'in bir standart amplifikasyon eğrisi oluşturulmuş ardından çalışılan örnekteki geçiş noktasına göre cDNA'nın rölatif miktarı kantitasyon software tarafından belirlendi. Elde edilen veriler Cq olarak kaydedildi. Analizi gerçekleştirilen genlerin ve referans gen olarak normalizasyonda kullanılan housekeeping genin (beta-aktin) primer dizileri Tablo 4'te gösterilmiştir. Genlerin reverse ve forward dizileri Tablo 4'te verildi. Diziler OriGene (<https://www.origene.com/>) online web sayfası ve kullanılarak dizayn edildi.

Tablo 4. RT-PCR'da analiz edilen genlerin primer listesi

Genler	Primer Dizisi
beta Actin	F: CACCATTGGCAATGAGCGGTTC R: AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT
BCL 2	F: ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT R: GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC
BAX	F: TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG R: TGTGTCCACGGCGGCAATCATC

p53	F: ATCTACAAGCAGTCACAGCACAT R: GTGGTACAGTCAGAGCCAACC
TNF alpha	F: CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG R: ATGGGCTACAGGCTTGTCACCTC
MMP 2	F: AGCGAGTGGATGCCGCCTTTAA R: CATTCCAGGCATCTGCGATGAG
MMP 9	F: GCCACTACTGTGCCTTTGAGTC R: CCCTCAGAGAATCGCCAGTACT
MMP 11	F: GAGAAGACGGACCTCACCTACA R: CTCAGTAAAGGTGAGTGGCGTC
MMP 3	F: CACTCACAGACCTGACTCGGTT R: AAGCAGGATCACAGTTGGCTGG
TIMP 1	F: GGAGAGTGTCTGCGGATACTTC R: GCAGGTAGTGATGTGCAAGAGTC
TIMP 2	F: ACCCTCTGTGACTTCATCGTGC R: GGAGATGTAGCACGGGATCATG
TIMP 3	F: TACCGAGGCTTCACCAAGATGC R: CATCTTGCCATCATAGACGCGAC
P16 (CDKN2A)	F: CTCGTGCTGATGCTACTGAGGA R: GGTCGGCGCAGTTGGGCTCC
CDK4	F: CCATCAGCACAGTTCGTGAGGT R: TCAGTTCGGGATGTGGCACAGA
CDK6	F: GGATAAAGTTCCAGAGCCTGGAG R: GCGATGCACTACTCGGTGTGAA
PI3K	F: GAAGCACCTGAATAGGCAAGTCG R: GAGCATCCATGAAATCTGGTCGC
AKT1	F: TTCTGCAGCTATGCGCAATGTG R: TGGCCAGCATACCATAGTGAGGTT
RAPTOR (MTOR1)	F: GATCGTCAACAGCTATCACACGG R: CGAGTCGAAGTTCTGCCAGATC
RICTOR (MTOR2)	F: GCCAAACAGCTCACGGTTGTAG R: CCAGATGAAGCATTGAGCCACTG
PDK-1	F: CATGTACGCTGGGTAATGAGG R: CTCAACACGAGGTCTTGGTGCA
EIF 4E-BP1	F: CACCAGCCCTTCCAGTGATGAG R: CCTTGGTAGTGCTCCACACGAT

Gerçek zamanlı RT-PCR ile kontrol grubu ve dozların uygulanmış olduğu gruplar arasındaki genlerin ekspresyonlarının nasıl değiştiği custom olarak dizayn edilen plaka ile belirlendi (Sentebiolab). Primerlerin gömülü olduğu plakalar için Real-Time PCR'da reaksiyon karışımı oranı, kite göre hazırlanıp çoklu mikropipet yardımıyla plakalara yüklendi (Tablo 5).

Tablo 5. RT-PCR reaksiyon karışımı

Gerçek Zamanlı PZR Reaksiyon Karışımı (96 kuyucuklu plaka için; bir reaksiyon)	
Master Mix	5 µl
cDNA	1 µl
Nüklease Free Water	3,4 µl
F-R mix den	0,6 µl
Son Hacim	10 µl

(Bir kuyucuk için 10 µl koyuyoruz)

Firmanın belirtmiş olduğu (Sentebiolab) sulandırma katsayıları doğrultusunda 100pmol luk reverse ve forward ana stokları oluşturuldu. Sonrasında 10pmol luk PCR stokları hazırlandı. Bunun için; 10 µl Forward, 10 µl Reverse, 80 µl Nüklease Free Water'dan alınıp 100 µl lik 10 pmol lük PCR için hazırlanmış stok elde edildi. Hepsi deney zamanına kadar -20⁰C de muhafaza edildi.

ELİSA DENEYİ

6 kuyucuklu plaklara her grup için üç kuyucuk olacak şekilde ve 3×10^5 /kuyucuk hücre ekimi yapıldı. Ertesi gün hücreler plakalara yapışıp konfluent hale geldiğinde ilaç dozları uygulandı. IC₅₀ süresi olan 48 saat dolduğunda hücrelerin besi yeri alındı. PBS ile kuyucuklar yıkandı. Ardından her kuyucuğa 350 µl RIPA solüsyonu koyuldu. Hücreler kazıyıcı yardımı ile kaldırılıp ependorf tüplere toplandı. -20⁰C'ye kaldırılıp deney gününe kadar muhafaza edildi. Çalışmamızda OVCAR-3 hücreleri üzerinde ALA, Sisplatin ve Paklitaksel maddelerinin uygulamalarının p-MTOR, p-FOXO1, p-AKT, MAPK protein seviyelerine olan etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi.

Human Phospho-AKT ELISA Kit:

Cat.No E4531 Hu

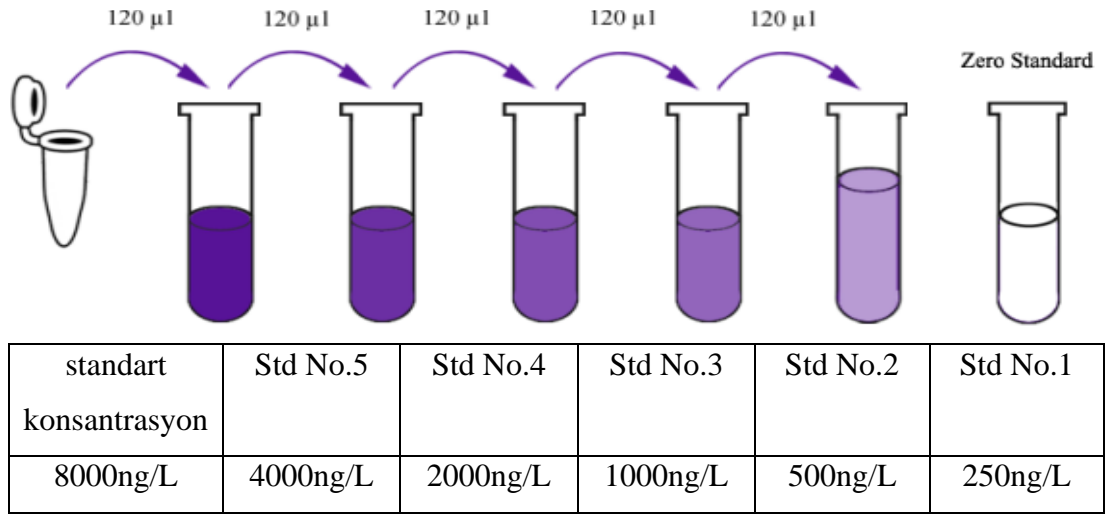
Bioassay Technology Laboratory

Ana stok standart (std): 8000ng/L

4000ng/L standart stok solüsyonu oluşturmak için ana stok standartın 120 µl 'si (8000ng/L) 120 µl standart seyreltici ile sulandırıldı. 2000ng/L, 1000ng/L, 500ng/L ve 250ng/L solüsyonları üretmek için standart stok solüsyonunu (4000ng/L) 1:2 standart seyreltici ile seri olarak seyreltildi. Standart seyreltici sıfır standart (0ng/L) olarak kabul edilir. Önerilen standart çözeltilerin seyreltilmesi aşağıdaki tablodaki gibidir:

Tablo 6. Ana stok standart çözeltinin seyreltilmesi

4000ng/L	Std No.5	120 µl std dilüent + 120 µl orginal std
2000ng/L	Std No.4	120 µl std dilüent + 120 µl Std No.5
1000ng/L	Std No.3	120 µl std dilüent + 120 µl Std No.4
500ng/L	Std No.2	120 µl std dilüent + 120 µl Std No.3
250ng/L	Std No.1	120 µl std dilüent + 120 µl Std No.2



Yıkama tamponu hazırlama:

500 ml 1x yıkama tamponu elde etmek için 20 ml Yıkama Tamponu Konsantresi 25 kat deiyonize veya distile su ile seyreltildi. Konsantrede kristaller oluşmuşsa, kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırıldı.

25x ana stok + 500ml distile su

Deney basamakları:

1. Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Deney oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

2. Standart kuyuya 50 µl standart eklendi. (Standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiğinden, standart kuyuya antikor eklenmez.)
3. Numune kuyularına önce 40 µl örnek ardından bu kuyulara 10 µl antikor eklendi ve sonrasında numune kuyularına ve standart kuyulara 50ul streptavidin-HRP eklendi (Kör kontrol kuyusuna eklenmez). İyice karıştırıldı. Plaka bir kapatıcı ile örtüldü. 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
4. Kapatıcı çıkarılarak plaka yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. Kuyular her yıkama için 30 saniye ila 1 dakika arasında 300 µl yıkama tamponu ile yıkandı.
5. Her kuyuya 50 µl substrat solüsyonu A ardından her kuyuya 50 µl substrat solüsyonu B eklendi. Karanlıkta 37°C'de 10 dakika boyunca yeni bir kapatıcı ile kaplanmış plak inkübe edildi.
6. Her kuyuya 50 µl stop solüsyonu eklendi, maviden sarıya renk dönüşümü izlendi.
7. Stop solüsyonu eklendikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropilaka okuyucu kullanarak hemen her kuyunun optik yoğunluğunu (OD değeri) belirlendi.

Human Phospho-Mammalian target of rapamycin ELISA Kit:

Cat.No E4485Hu

Bioassay Technology Laboratory

Ana stok standart (std): 24ng/L

12ng/L standart stok solüsyonu oluşturmak için ana stok standartın 120 µl 'si (24ng/L)

120 µl standart seyreltici ile sulandırıldı. 6ng/L, 3ng/L, 1.5ng/L ve 0.75ng/L

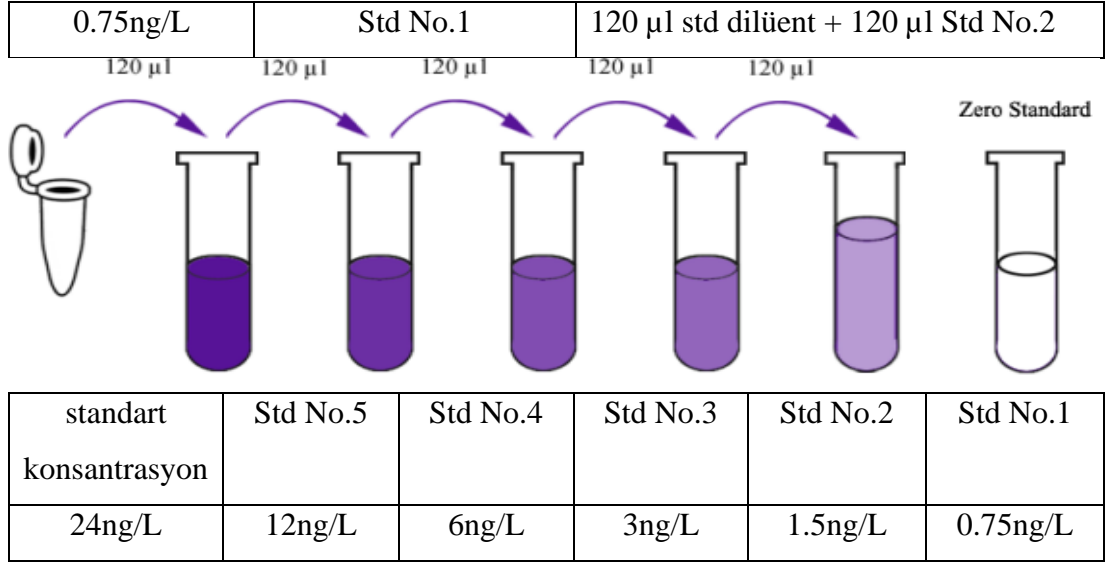
solüsyonları üretmek için standart stok solüsyonunu (12ng/L) 1:2 standart seyreltici

ile seri olarak seyreltildi. Standart seyreltici sıfır standart (0ng/L) olarak kabul edildi.

Önerilen standart çözeltilerin seyreltilmesi aşağıdaki tablodaki gibidir:

Tablo 7. Ana stok standart çözeltinin seyreltilmesi

12ng/L	Std No.5	120 µl std dilüent + 120 µl orginal std
6ng/L	Std No.4	120 µl std dilüent + 120 µl Std No.5
3ng/L	Std No.3	120 µl std dilüent + 120 µl Std No.4
1.5ng/L	Std No.2	120 µl std dilüent + 120 µl Std No.3



Yıkama tamponu hazırlama ve deney basamakları yukarıdaki gibidir.

Human phospho forkhead box O1 ELISA Kit:

Cat.No E4227hu

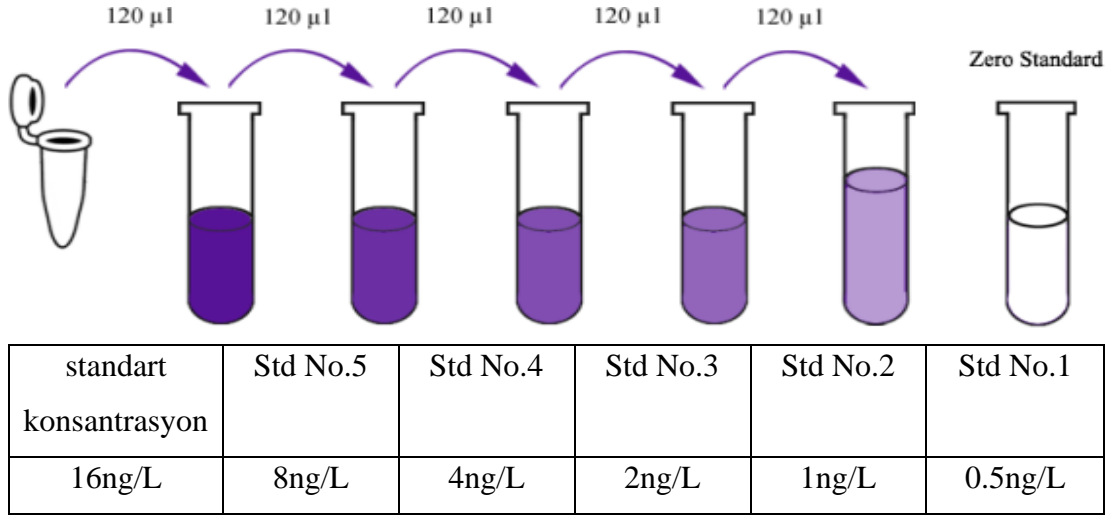
Bioassay Technology Laboratory

Ana stok standart (std): 16ng/L

8ng/L standart stok solüsyonu oluşturmak için ana stok standartın 120 µl 'si (16ng/L) 120 µl standart seyreltici ile sulandırıldı. 4ng/L, 2ng/L, 1ng/L ve 0.5ng/L solüsyonları üretmek için standart stok solüsyonunu (16ng/L) 1:2 standart seyreltici ile seri olarak seyreltilir. Standart seyreltici sıfır standart (0ng/L) olarak kabul edildi. Önerilen standart çözeltilerin seyreltilmesi aşağıdaki tablodaki gibidir:

Tablo 8. Ana stok standart çözeltinin seyreltilmesi

8ng/L	Std No.5	120 µl std dilüent + 120 µl orginal std
4ng/L	Std No.4	120 µl std dilüent + 120 µl Std No.5
2ng/L	Std No.3	120 µl std dilüent + 120 µl Std No.4
1ng/L	Std No.2	120 µl std dilüent + 120 µl Std No.3
0.5ng/L	Std No.1	120 µl std dilüent + 120 µl Std No.2



Yıkama tamponu hazırlama ve deney basamakları yukarıdaki gibidir.

Human Mitogen activated protein kinase ELISA Kit:

Cat.No E5688Hu

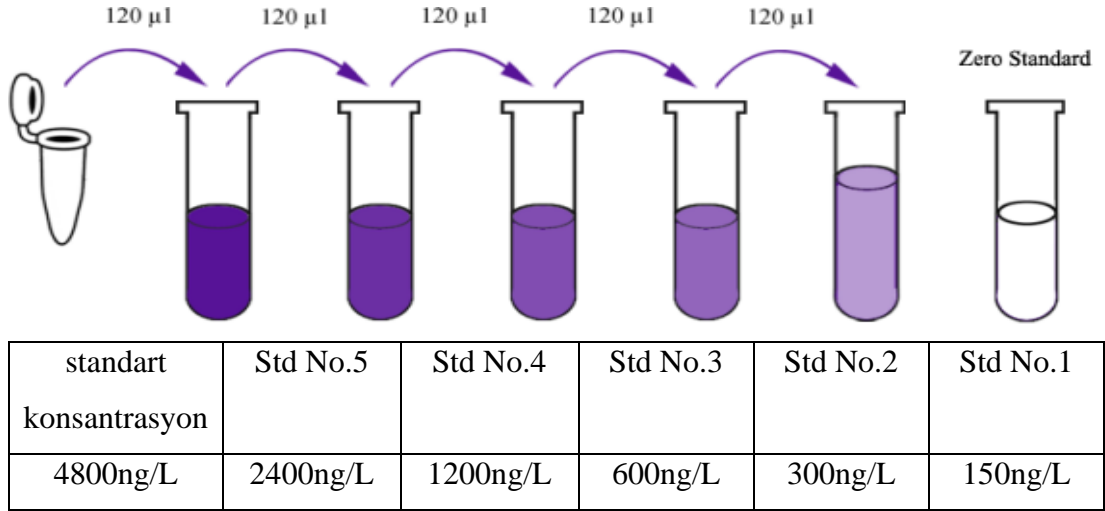
Bioassay Technology Laboratory

Ana stok standart (std): 4800ng/L

2400ng/L standart stok solüsyonu oluşturmak için ana stok standartın 120 µl 'si (4800ng/L) 120 µl standart seyreltici ile sulandırıldı. 1200ng/L, 600ng/L, 300ng/L ve 150ng/L solüsyonları üretmek için standart stok solüsyonunu (2400ng/L) 1:2 standart seyreltici ile seri olarak seyreltildi. Standart seyreltici sıfır standart (0ng/L) olarak kabul edildi. Önerilen standart çözeltilerin seyreltilmesi aşağıdaki tablodaki gibidir:

Tablo 9. Ana stok standart çözeltinin seyreltilmesi

2400ng/L	Std No.5	120 µl std dilüent + 120 µl orginal std
1200ng/L	Std No.4	120 µl std dilüent + 120 µl Std No.5
600ng/L	Std No.3	120 µl std dilüent + 120 µl Std No.4
300ng/L	Std No.2	120 µl std dilüent + 120 µl Std No.3
150ng/L	Std No.1	120 µl std dilüent + 120 µl Std No.2



Yıkama tamponu hazırlama ve deney basamakları yukarıdaki gibidir.

İNVAZYON KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ (MATRİGEL İNVAZYON TESTİ)

Deney gruplarındaki ilgili hücrelerin invazyon kapasitesi ‘matrigel invasion chamber’ invazyon kapları (Corning) kullanılarak 24 kuyucuklu kültür plakalarında araştırıldı. Bu invazyon odacıklarının hücrelere sağladıkları özel şartlar sayesinde *in vitro* koşullar altında hücrelerin invaziv özellikleri saptanabilmektedir. İnvazyon odacıkları 8 mikron çaplı porlar içeren matrigel matrix kaplı bir membran ile örtülüdür. Bu matrigel matrix bazal membranı *in vitro* koşullarda oluşturma imkanı sağlamaktadır. Bu membran invaziv özelliği olmayan hücrelerin membranın diğer yüzeyine geçmesini engellerken invaziv özelliği olan hücreler membranın diğer yüzeyine geçebilmektedir. Bu sayede matrijel kaplı membran invaziv ve invaziv olmayan hücreleri birbirinden ayırabilmektedir.

Deneyde kısaca, 24 kuyucuklu plakaya matrigel chamberi yerleştirmeden önce invazyon kuyucuğunun alt odacığına 750 µl serumlu besi yeri koyuldu. İnvazyon odacığının dışının kemoatraktan olması sağlandı. Matrigel membranın (8 µm por açıklıklı) üst kısmına ise, gece boyunca serumsuz kültür ortamında, dozları uygulanan OVCAR-3 hücreleri eklendi. Doz grupları için penisilin-streptomisin içeren ama FBS (serum) olmayan besi yerinde hazırlandı. Her invazyon odasında 25×10^3 hücre olacak şekilde FBS içermeyen besi yerinde dozları hazırlandı. Her kuyucukta 500 µl olacak

şekilde kuyucuklara doz gruplarının hücrelerini uyguladık. Hücreler 48 saat 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde bekledi.

İnvaziv karakterli hücreler seruma kemoatrakt yaparak 8 µm çaplı porlar ile örtülü matrigel matriks ortamından geçtiler. Matrigel matrikste bulunan invaziv hücreler metanol ile fikse edildikten sonra kristal viyole ile boyanarak mikroskop altında 40X büyütmede sayıldı.

İnkübasyon saatinin sonunda invaziv özellikte olan hücreler invazyon odacığının membranının dış yüzeyine geçeceklerinden invazyon odacığının içindeki besi yeri uzaklaştırıldı. Gece boyunca inkübasyonu takiben membranın üst kısmında kalan invaze olmamış hücreler kulak pamuğu çubuğu ile silinerek temizlendi. İnvaziv olan dış yüzeydeki hücreler, önce 2 ml metanol ile fikse edildi, ardından da 1 ml kristal viyole ile boyanarak ışık mikroskopunda sayılarak değerlendirildi. Deney basamakları aşağıdaki gibidir:

48 Saat sonra

1. Kuyucuklardaki besi yerleri döküldü.
2. 2 defa PBS ile yıkandı.
3. 750 µl dışına 500 µl chamber içine daha önceden -20 ye soğuması için bıraktığımız methanol uygulandı.
4. -20°C'de 10 dk inkübe edildi.
5. Methanol pipetle çekildi.
6. 750 µl dışına 500 µl içine kristal viyole boyası konuldu. 3-5 dk arasında kabin içinde bekletildi.
7. PBS ile boyadan arınana kadar yıkandı.
8. Işık mikroskopunda fotoğrafları çekildi.

KOLONİ OLUŞUM DENEYİ

Deney gruplarımız için hazırladığımız dozların uygulaması sonrası OVCAR-3 hücrelerinin koloni oluşumunu nasıl etkilediğini belirlemek için 6 kuyucuklu plakalara kontrol ve doz grupları için kuyucuk başına 10³ hücre ekildi. 14 gün boyunca hücrelerin 2 günde bir ortamlarını değiştirerek 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. On dört günün sonunda hücreler soğuk metanolla -20°C'de 10 dakika fikse

edildi. Fikse olan koloniler kristal viyole boyası ile 15 dakika boyandı. Boyanan koloniler kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak sayılıp değerlendirildi.

YARA İYİLEŞME (WOUND HEALİNG) DENEYİ

Hücre migrasyonunu ve hücre-hücre etkileşimini incelemek için yapılan bir deney olan yara iyileşme deneyi, OVCAR-3 hücrelerinde ALA, sisplatin, paklitaksel maddelerinin etkisini belirlemek için yapıldı. Wound healing deneyi için 6 kuyucuklu plakaya % 100 konfluent olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Hücrelerin plak yüzeyine tutunması gözlemlendikten sonra besi yeri kaldırıldı. PBS ile 3 kere yıkama yapıldı. 200 µl lik pipet ucu yardımı ile “+” şeklinde plak zeminine çizim yapıldı. Çizimin amacı, hücrelerin göç etmesini ve boşluğu kapatmasını gözlemlemek amacıyla hücresiz bir alan oluşturmaktır. Sonrasında PBS ile tekrar yıkanıp doz grupları besi yeri içinde uygulandı. 0, 16 ve 24. saatte invert mikroskopta 4X büyütme ile resimler çekilip kontrol grubu ile karşılaştırılıp analizi yapıldı.

TAS (TOTAL ANTİOXİDANT STATUS) VE TOS (TOTAL OXİDANT STATUS) DENEYİ

ROS metabolik ve fizyolojik süreçlerde üretilir ve bunları enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidatif mekanizmalar yoluyla uzaklaştıran organizmalarda zararlı oksidatif reaksiyonlar meydana gelebilir. Belirli koşullar altında oksidanların artması ve antioksidanların azalması önlenemez. Antioksidan moleküller bu zararlı reaksiyonları önler veya engeller.

Farklı antioksidan moleküllerin ayrı ayrı ölçülmesi pratik olmadığından ve antioksidan etkileri katkılı olduğundan, bir örneğin toplam antioksidan kapasitesi ölçülür ve buna toplam antioksidan durumu (TAS) denir.

Deney prensibinde numunedeki antioksidanlar, koyu mavi yeşil renkli ABTS radikalini renksiz indirgenmiş ABTS formuna indirger. 660 nm'de absorbans değişimi numunenin toplam antioksidan seviyesi ile ilişkilidir.

Bütün doz grupları için TAS, TOS deneyleri triplike olarak çalışıldı.

Tablo 10. Aşağıdaki sırayla kit içeriği rezervuarda pipetlenir:

Numune veya Standart veya H ₂ O	18 µl
Reagent 1	300 µl
İyice karıştırılır	
30 saniye sonra absorbansı (A1) okunur	Dalga boyu 660nm
Reagent 2	45 µl
İyice karıştırılır	
37°C'de 5 dakika sonra absorbansı (A2) veya oda sıcaklığında 10 dakika sonra absorbansı (A2) okunur	Dalga boyu 660nm

Hesaplama:

$$A2 - A1 = \Delta \text{Abs of standard or numune or H}_2\text{O}$$

Sonuçlar = $[\Delta \text{Abs H}_2\text{O} - \Delta \text{Abs Sample}] / [\Delta \text{Abs H}_2\text{O} - \Delta \text{Abs Standard}]$ formülü ile bir örneğin toplam antioksidan kapasitesi ölçülür.

Farklı oksidan moleküllerinin de ayrı ayrı ölçülmesi pratik olmadığı ve oksidan etkilerinin aditif olduğu için bir numunenin toplam oksidan durumu (TOS) ölçülür.

Deney prensibinde numunede bulunan oksidanlar, demir iyonu-şelatör kompleksini demir iyonuna oksitler. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan güçlendirici moleküller tarafından uzatılır. Ferrik iyon, asidik bir ortamda kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, numunede bulunan toplam oksidan molekül miktarı ile orantılıdır.

Tablo 11. Aşağıdaki sırayla kit içeriği rezervuarda pipetlenir:

Numune veya Standart veya H ₂ O	45 µl
Reagent 1	300 µl
İyice karıştırılır	
30 saniye sonra absorbansı (A1) okunur	Dalga boyu 530nm
Reagent 2	15 µl
İyice karıştırılır	

37°C'de 5 dakika sonra absorptansı (A2) veya oda sıcaklığında 10 dakika sonra absorptansı (A2) okunur	Dalga boyu 530nm
---	------------------

Hesaplama:

$$A2 - A1 = \Delta \text{Abs of standard or sample}$$

$$\text{Sonuçlar} = \Delta \text{Abs Sample} / \Delta \text{Abs Standard}$$

formüllerine göre yapıldı.

ANNEXIN V İLE APOPTOZ TESPİTİ

Apoptoz, gelişimin normal bir parçası olarak meydana gelen dikkatli düzenlenmiş bir hücre ölümü sürecidir. Uygun olmayan şekilde düzenlenmiş apoptoz, kanser gibi hastalık durumlarında rol oynar. Apoptoz, nükleer kromatinin kompaktlaşması ve parçalanması, sitoplazmanın büzülmesi ve membran asimetrisinin kaybı dahil olmak üzere karakteristik morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle nekroz gibi diğer hücre ölüm mekanizmalarından ayırt edilir.

Normal canlı hücrelerde, fosfatidil serin (PS), hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde bulunur. Bununla birlikte, apoptotik hücrelerde PS, plazma zarının iç kısmından dış yüzeyine doğru yer değiştirir, böylece PS'yi dış hücre ortamına maruz bırakır.

İnsan antikoagülanı annexin V, PS için yüksek afiniteye sahip 35-36 kDa Ca^{+2} bağımlı bir fosfolipid bağlayıcı proteindir. Bir florofor veya biyotin ile etiketlenmiş Annexin V, dış yüzeye yer değiştiren PS'ye bağlanarak apoptotik hücreleri tanımlayabilir.

ALA IC_{50} , Sisplatin IC_{50} + Paklitaksel IC_{50} ve ALA IC_{50} + Sisplatin IC_{50} + Paklitaksel IC_{50} dozları OVCAR-3 hücrelerine uygulanıp 48 saat inkübasyonu tamamlandıktan sonra hücreler toplandı. Soğuk PBS içinde yıkandı. Yıkanmış hücreler yeniden santrifüjlenerek süpernatant atıldı ve hücreler 1X annexin bağlama tamponunda yeniden süspanse edildi. Her 100 μL hücre süspanسیونuna 5 μL FITC annexin V ve 1~2 μL PI eklendi. Hücreler oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 400 μL 1X annexin bağlayıcı tampon eklenerek hafifçe karıştırıldı (örnekler buz üzerinde tutulur). Hücreler slaytlara yüklendikten sonra

uygun filtreler kullanarak PI floresansı ve Annexin V, Arthur Image Based Cytometer'da aynı anda ölçülüp cihazın işletim yazılımıyla analiz edildi.

TUNEL TESTİ İLE APOPTOZ TAYİNİ

DNA kırıklarının *in situ* olarak tanımlanması sağlayan TUNEL testi hücrelerde apoptozun saptanmasında kullanılan bir metottür. DNA fragmentasyonu apoptozun terminal evresini gösteren bir olaydır ve hücre içi endonükleazların aktivitesi ile gerçekleşir. İlerlemiş DNA fragmentasyonu sonucunda DNA'da tek ve çift zincir kırıkları meydana gelmekte ve bu zincir kırıklarının *in situ* floresans veya kolorimetrik olarak belirlenmesi, TUNEL ismi verilen histokimyasal analiz ile yapılabilmektedir. DNA kırıklarının 3'-OH terminaline floresan işaretli nükleotidler "terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)" enzim kabiliyetinin eklenmesiyle floresan mikroskop altında, bu DNA kırıkları görülebileceği gibi aynı zamanda bu floresan işaretlere HRP bağlı antikolar bağlanarak da kolorimetrik olarak belirlenebilir.

Çalışmamızda ABP Biosciences TUNEL Chromogenic Apoptosis Detection Kit (Cat. No: A049) kullanıldı.

Tablo 12. Kit bileşenleri

Materyal	Miktar	Konsantrasyon
TdT reaction buffer (Component A)	8 mL	1X solution
TdT enzyme (Component B)	100 µL	15 U/µL
Biotin-11-dUTP (Component C)	50 µL	50X solution
HRP-Streptavidin (Component D)	50 µL	100X solution
DAB stock solution (Component E)	150 µL	33X solution
DAB diluent (Component F)	5 mL	1X solution

DNase I (Component G)	10 µL	2 U/µL
DNase I buffer (Component H)	1 mL	1X solution

TUNEL testi için hücreler, 8 odacık içeren lamlara (BD Falcon Culture Slides; 8 Chamber Polystyrene Vessel Tissue culture treated Glass Slide) ekildi. Her bir odacığa içine 15×10^3 hücre olacak şekilde hücreler eklendi, her grup ikili tekrar olacak şekilde etkili bulunan doz ve zaman aralığında hücreler inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besi yeri aspire edildi ve PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Kit protokolüne göre;

1. Odacık başına 500 µl olacak şekilde fiksasyon solüsyonu (%4 Paraformaldehit içeren PBS, 7,4 pH) ile bir saat inkübe edildi
2. PBS ile yıkama yapıldı
3. Oda sıcaklığında 30 dakika boyunca %0,2 Triton X-100 içeren PBS içinde permeabilizasyon yapıldı
4. PBS ile yıkama yapıldı
5. Endojen peroksidazları etkisiz hale getirmek için numuneler %2 hidrojen peroksit ile 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi
6. PBS ile yıkama yapıldı
7. Örnekler 100 µL TdT reaksiyon tamponu (Bileşen A) ile 10 dakika inkübe edildi
8. Kullanmadan hemen önce TdT reaksiyon kokteyli (TdT reaction buffer (Component A) + TdT enzyme (Component B) + Biotin-11-dUTP (Component C)) hazırlandı
9. TdT reaksiyon tamponunu uzaklaştırıldıktan sonra her numuneye 50 µL TdT reaksiyon kokteyli eklenir ve çözeltinin yüzeye tamamen yayılmasını sağlandı
10. Işıktan koruyarak 37°C'de 60 dakika nemli ortamda inkübe edildi
11. 2X SSC'de numuneleri 2 x 10 dakika inkübe ederek reaksiyonu durduruldu
12. PBS içinde %3 BSA ile numuneler 2 x 10 dakika yıkandı
13. HRP-Streptavidin boyama solüsyonunu hazırlandı (HRP-Streptavidin [Component D] + Staining buffer)
14. Her numuneye 100 µL HRP-Streptavidin boyama solüsyonu eklendi ve ışıktan koruyarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi

15. PBS içinde %3 BSA ile numuneler 2 x 5 dakika yıkandı
 16. DAB boyama solüsyonu hazırlandı (DAB stock solution [Component E] + DAB stock solution [Component E])
 17. Her numuneye 100 µL DAB boyama solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında inkübe edildi. İstenilen düzeyde boyama elde edilene kadar renk gelişimini izlendi (tipik olarak 10-60 dakika). PBS ile yıkamayla reaksiyonu durduruldu.
 18. Numuneler hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.
- Işık mikroskop (Olympus) ile görüntüleme işlemi gerçekleştirildi.

VERİLERİN İSTATİSTİKSEL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

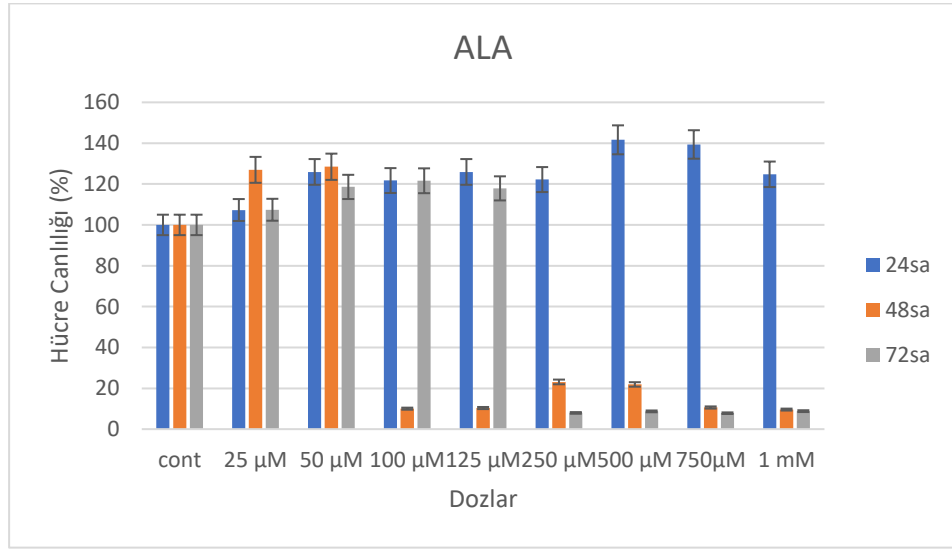
Verilerin analizi $\Delta\Delta CT$ metodu kullanılarak bilgisayar programı ile kantitasyonu yapılarak web tabanlı "RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis" programında bulunan, Volcano Plot analizleri kullanıldı. Metodun amacı, iki ekspresyon sonucunun $\pm 3SD$ karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Böylelikle, gen ekspresyonunun karşılaştırılması yapılan durumlarda kontrol ve doz grubu ilgili genlerin ekspresyon değerleri rölatif olarak belirlenebildi. Grupların karşılaştırılması "RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis" programında bulunan "Student t-testi" analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

Eliza okuyucusundan alınan optik dansite değerlerinin, boş kuyucukta okunan değerler ile normalizasyonu sağlandı. Standartların OD değerleri bilinen konsantrasyonları ile %95 anlamlılık düzeyinde standart eğrisi grafinin formülasyonu aracılığıyla kalibre edildi. Veriler GraphPad Prism 8.0.2 (263) (GraphPad software Inc. San Diego, California USA) paket programıyla analiz edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi (Post hoc. Tukey'in Çoklu kıyaslama testi); parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanıldı. Tüm incelemelerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

XTT TESTİ (HÜCRE CANLILIĞI TESTİ) SONUÇLARI

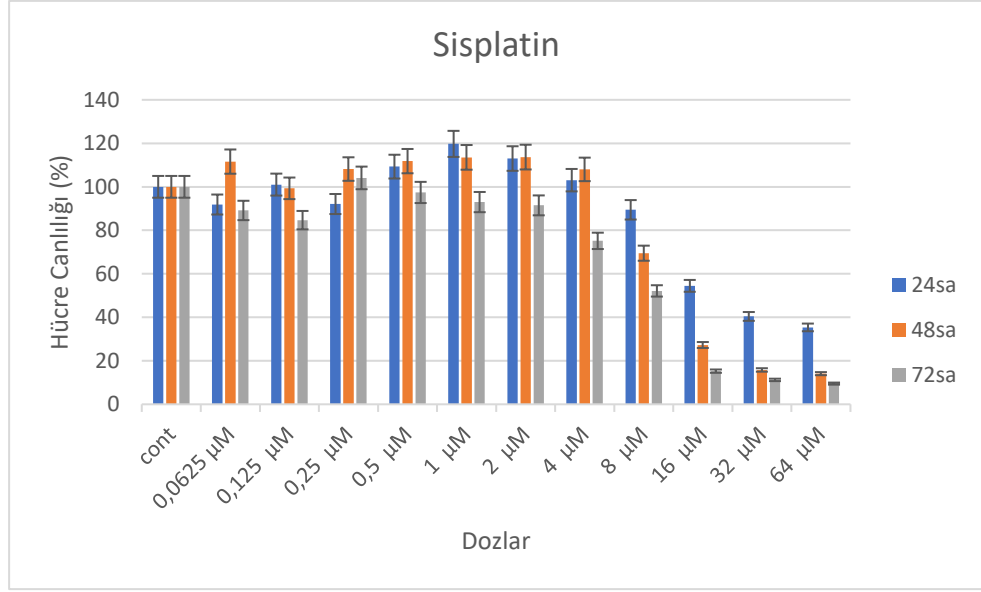
Çalışma sonucuna göre ALA'nın IC₅₀ dozu 48. saatte 83.1 µM olarak saptandı. 24 saatlik hücre canlılığı testi sonuçlarında, hücre proliferasyonunun %50'lerin altına düşmemesi sebebiyle 48.saatteki doz oranı IC₅₀ olarak kabul edildi. ALA'nın değişen doz aralıkları ve zamana göre etkisi Şekil 8'de görülmektedir.



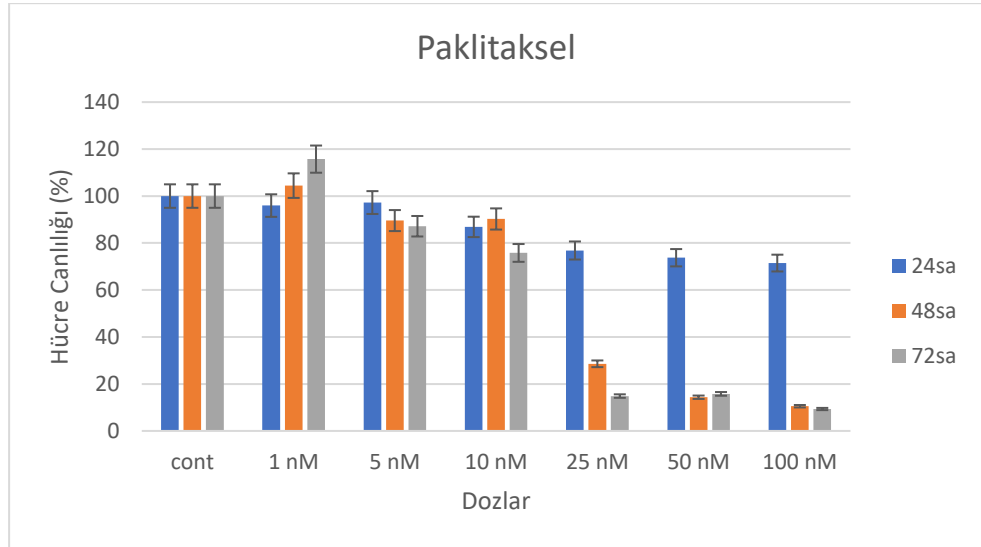
Şekil 8. ALA'nın çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi

Bu nedenle sisplatin ve paklitakselin de kombinasyon çalışmaları için 48. saatteki IC₅₀ dozları çalışıldı. Sisplatinin IC₅₀ dozu 48.saatte 10.6 µM, paklitakselin IC₅₀ dozu 48.saatte 19 nM olarak saptandı.

Sisplatin ve paklitakselin değişen doz aralıkları ve zamana göre etkisi sırasıyla Şekil 9 ve 10'da görülmektedir.

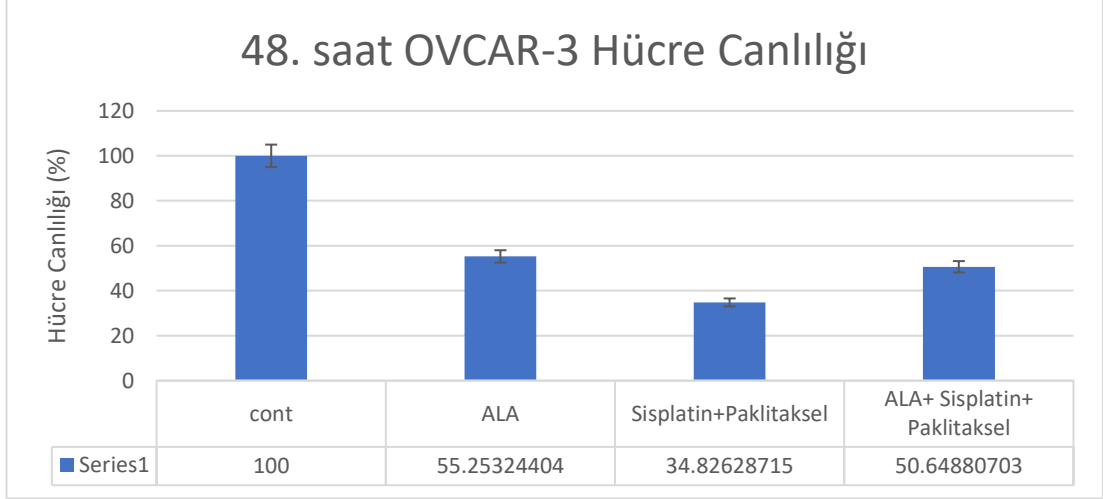


Şekil 9. Sisplatinin çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi



Şekil 10. Paklitakselin çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi

Ardından bu dozlar ile kombinasyon XTT deneyi yapıldı. Kombine dozlarda Sisplatin IC₅₀ + Paklitaksel IC₅₀ ve ALA IC₅₀ + Sisplatin IC₅₀ + Paklitaksel IC₅₀ şeklinde seçildi, kombine dozlarında etkili zamanı 48. saat olarak tespit edildi ve doz aralıkları ve zamana göre etkisi Şekil 11’de gösterildi.



Şekil 11. Kombine dozun zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi

TRİZOL REAGENT İLE TOTAL RNA İZOLASYONU SONUÇLARI

Trizol Reagent ile kontrol grubu ve doz grubu OVCAR-3 hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen total RNA'ların konsantrasyon ve saflık oranları Nanodrop ile saptandı.

GERÇEK-ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR) SONUÇLARI

Çalışmamız sonucunda araştırmamızda incelediğimiz genlerden istatistiksel olarak anlamlı değişim görülen genler ve değişim durumları Tablo 13'te verilmiştir. Tablo 13'te kırmızı renk, housekeeping gene göre kat değişiminde artışı; mavi renk azalışı, siyah renk anlamlı olmayan artış ya da azalmayı ifade etmektedir. p-değerlerindeki istatistiksel olarak anlamlı olanlar kırmızı renk ile gösterilmiştir (p değeri <0,05).

Tablo 13. RT-PCR sonucuna göre ALA ve kombinasyon gruplarındaki değişiklik gösteren genler.

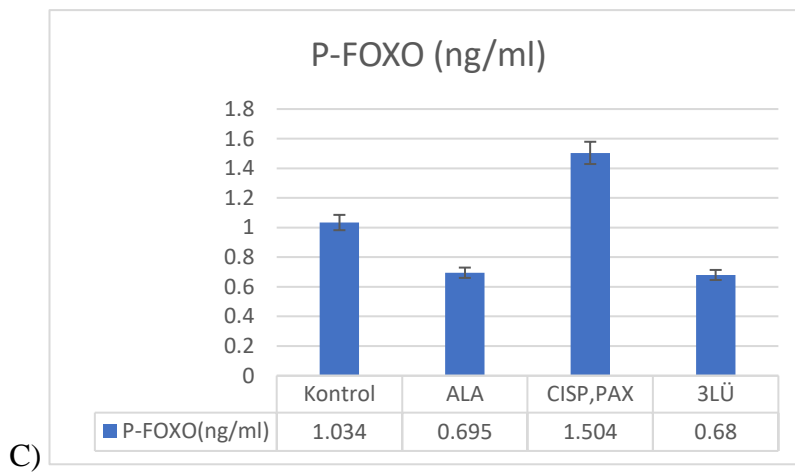
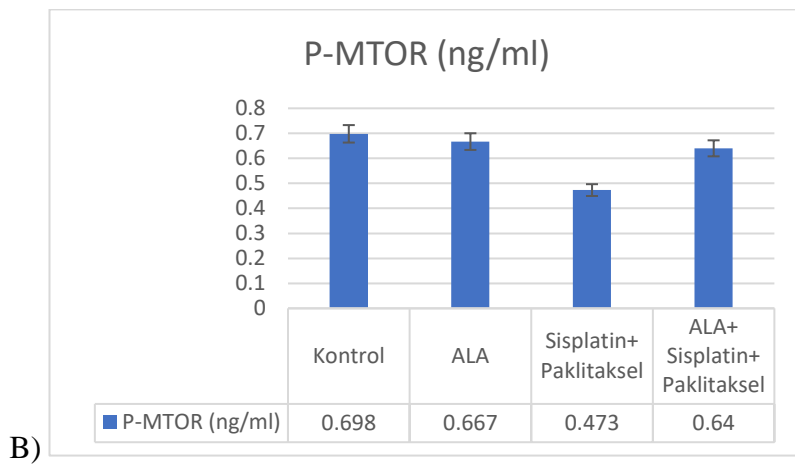
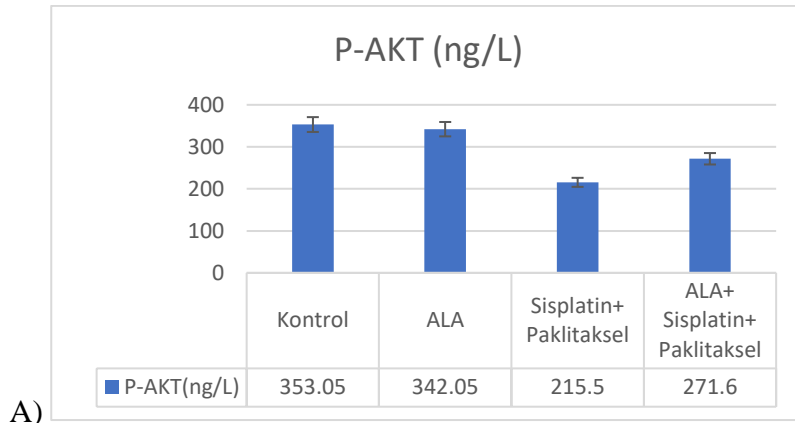
Gen	ALA		Sisplatin+ Paklitaksel		ALA+ Sisplatin+ Paklitaksel	
	Kat Değişimi	p-değeri	Kat Değişimi	p-değeri	Kat Değişimi	p-değeri
Beta Actin	1.00		1.00		1.00	
P53	0.07	0.372329	25.46	0.374911	0.06	0.371832
BAX	1.85	0.903704	7.78	0.376796	0.09	0.253177
BCL-2	0.05	0.321227	1.55	0.416577	0.08	0.329232
TNF-α	1.77	0.877127	0.31	0.786638	0.13	0.260621
CDK4	0.02	0.130984	0.06	0.805230	0.02	0.129962
CDK6	0.99	0.688929	0.99	0.707922	0.03	0.356813
P16 (CDKN2A)	0.08	0.175644	0.18	0.996958	0.00	0.165358
PI3K	0.67	0.286051	1.53	0.993383	0.17	0.156077
AKT	0.37	0.369123	23.53	0.373034	1.90	0.414523
RAPTOR	0.01	0.106713	4.39	0.286550	0.09	0.250814
RICTOR	0.52	0.208646	1.41	0.352096	0.20	0.035915
PDK-1	1.94	0.300448	8.98	0.374105	0.21	0.151892
EIF-4E BP-1	0.58	0.398436	78.25	0.273949	0.12	0.366682
MMP-2	1.91	0.546245	2.55	0.864757	0.11	0.358145
MMP-3	0.38	0.378295	0.12	0.374330	0.24	0.379576
MMP-9	5.66	0.059012	19.16	0.005410	0.19	0.003877
MMP-11	1.72	0.249582	0.65	0.546055	0.24	0.045168
TIMP-1	0.26	0.469311	2.39	0.961450	0.01	0.321967
TIMP-2	0.06	0.365223	1.25	0.624569	0.04	0.364011
TIMP-3	0.29	0.428198	1.40	0.483057	0.37	0.786736

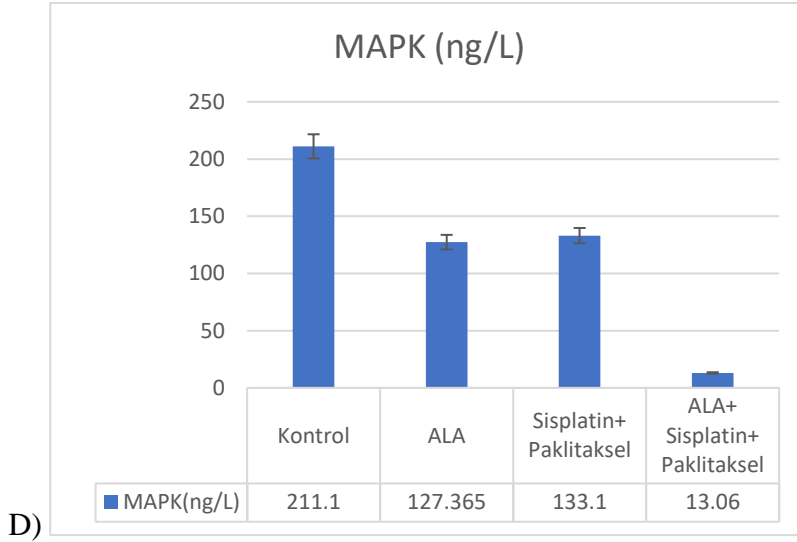
RT-PCR sonucuna göre;

Tümör baskılayıcı p53 geninin ekspresyonu Sisplatin+Paklitaksel doz grubunda artmışken; tek başına ALA ve ALA+Sisplatin+Paklitaksel kombine doz grubunda azaldı. Pro-apoptotik gen grubundan Bax ekspresyonu da p53'e paralel olarak Sisplatin+Paklitaksel grubunda arttı; diğer 3'lü doz grubunda azaldı. Sisplatin+Paklitaksel grubu ve 3'lü doz grubunda tümör oluşumunda rol oynadığı düşünülen TNF- α 'nın ekspresyonu azaldı. ALA ve 3'lü kombine uygulanan gruplarda, anti-apoptotik gen grubundan olan Bcl-2 gen ekspresyonunda azalma; hücre siklusu düzenleyici genlerden bütün gruplarda CDK4'te azalma, 3'lü doz grubunda CDK6 ekspresyonlarında azalma tespit edildi. Fakat bu grup genlerdeki değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir. PI3K-AKT yolağındaki gen gruplarından tek başına ALA uygulaması yapılan grupta AKT, RAPTOR ifadelerinde azalma; üçlü doz uygulanan grupta PI3K, RAPTOR, RICTOR, PDK-1 VE EIF-4E BP 1 ifadelerinde azalma tespit edildi. Bu değişikliklerden üçlü gruptaki RICTOR gen ifadesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p değeri <0,05). Sisplatin+Paklitaksel doz grubunda AKT, RAPTOR, PDK-1 VE EIF-4E BP 1 ifadelerinde artış oldu. Tümör hücresi adezyonu ile ilişkili genlerden tek başına ALA grubunda ve Sisplatin+Paklitaksel doz grubunda MMP-3 azaldı, MMP-9 ifadesi arttı; üçlü doz uygulanan grupta MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-11 ifadelerinin azaldı ve bu gruptaki MMP-9 ve 11 gen ifadelerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p değeri <0,05). Metalloproteinazların doku inhibitörü olan TIMP-1,2 ve 3 ekspresyonları tek başına ALA ve 3'lü doz grubunda azalmışken Sisplatin+Paklitaksel grubunda TIMP-1'de artış gözlemlendi.

ELISA DENEYİ SONUÇLARI

ELISA sonuçları incelendiğinde; P-AKT ve P-MTOR'da en fazla azalmayı Sisplatin+Paklitaksel grubunda, P-FOXO ve MAPK proteinleri için en düşük değerler ise ALA+Sisplatin+Paklitaksel üçlü doz grubunda bulundu. Çalışmadan elde ettiğimiz veriler Şekil 12 ve Tablo 14'te verilmiştir.





Şekil 12. A) P-AKT ve B) P-MTOR C) P-FOXO D) MAPK ELISA sonuçları sütun grafiği

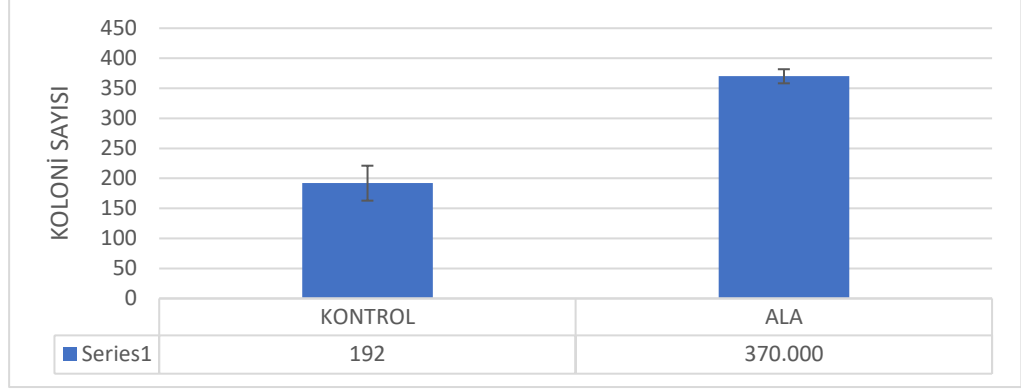
Tablo 14. ELISA kontrol ve doz grupları sonuçları

	Kontrol	ALA	Sisplatin+Paklitaksel	ALA+Sisplatin+Paklitaksel
P-AKT (ng/L)	353,05±9,51 ^{a,b}	342,05±18 ^c	215,5±13,39 ^{a,c}	271,6±33,7 ^b
P-MTOR1(ng/ml)	0,698±0,027	0,667±0,13	0,473±0,016	0,64±0,065
P-FOXO1(ng/ml)	1,034±0,034 ^{d,e,f}	0,695±0,012 ^{d,g}	1,504±0,0179 ^{e,g,h}	0,68±0,001 ^{f,h}
MAPK (ng/L)	211,1±57,48 ¹	127,365±33,99 ¹	133,100±21,8 ^j	13,06±10,21 ^{1,i,j}

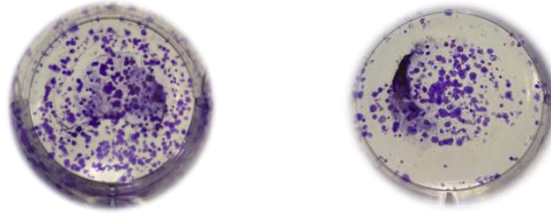
P-AKT, ^{a,b,c} P < 0.01; **P-FOXO**, ^{d,e,f,g,h} P < 0.01; **MAPK**, ^{1,i,j} P < 0.01

KOLONİ OLUŞUM DENEYİ

ALA'nın koloni formasyonuna etkisini araştırmak amacıyla yapılan deneyde kontrol grubu hücrelerde koloni ortalaması 192±11,7; ALA (83.1 µM) uygulanan doz grubu hücrelerde koloni sayısı 370±29,1 bulundu. Şekillerde gözlendiği gibi koloni formasyonunun doz grubunda kontrole göre arttığı belirgin biçimde dikkati çekmektedir (Şekil 13 ve 14). ALA'nın sisplatin ve paklitaksel ile kombine uygulamalarında koloni oluşumu gözlenmedi.



Şekil 13. OVCAR-3 hücrelerinde kontrol ve ALA doz gruplarında koloni sayıları



Alfa Lipoik Asit (83.1 µM)

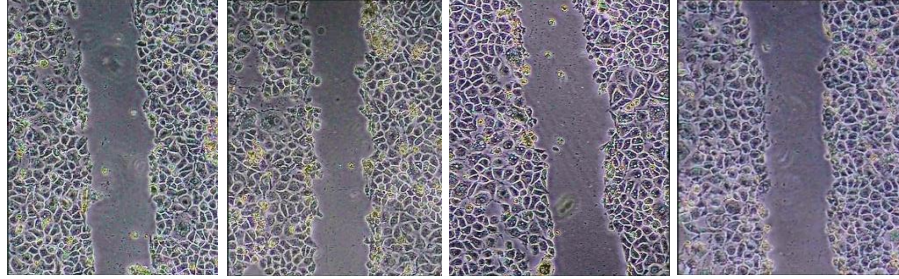
Kontrol

Şekil 14. OVCAR-3 hücrelerinde kontrol ve ALA doz gruplarında koloni görüntüsü

WOUND HEALING DENEYİ SONUÇLARI

OVCAR-3 hücrelerinde ALA, sisplatin ve paklitaksel maddelerinin tekli ve kombine dozlarının hücre-hücre etkileşimi ve hücre migrasyonuna etkisini belirlemek için yaptığımız wound healing deneyi sonuçlarının 0, 16 ve 24 saatte 4X büyütme ile resimleri çekilip kontrol grubu ile karşılaştırılıp analizi yapıldı.

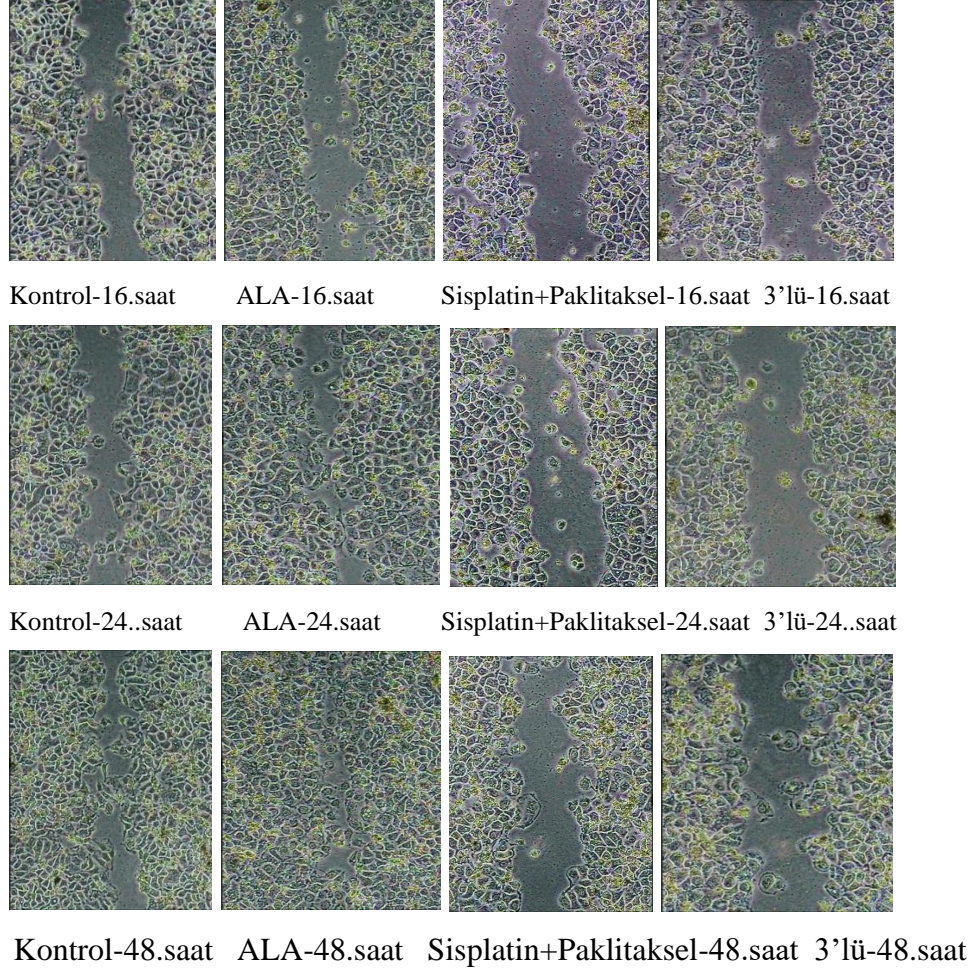
ALA doz grubu tek başına kontrole kıyaslandığında wound healing deneyinde hücre göçü ve hücre-hücre etkileşiminin belirgin oranda arttırdığı gözlemlendi (Şekil 15).



Kontrol-0.saat

ALA-0.saat

Sisplatin+Paklitaksel-0.saat 3'lü-0.saat



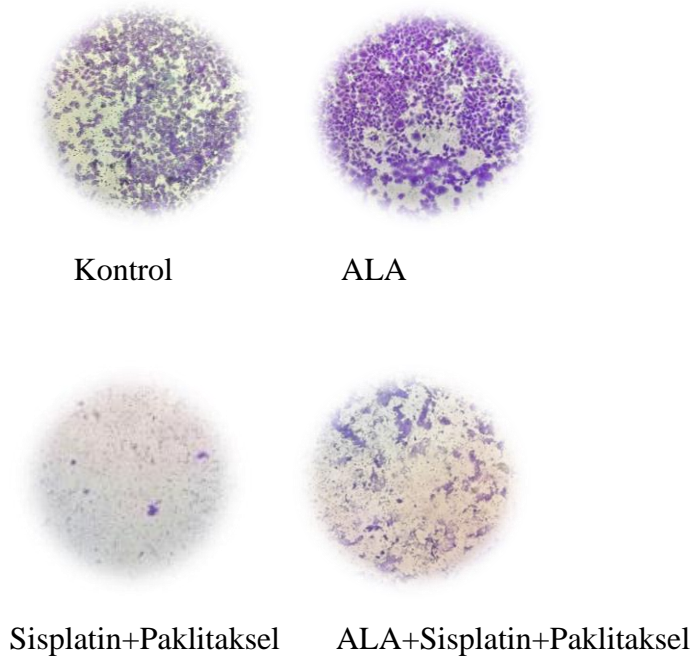
Şekil 15. Wound healing deneyi 0-16-24-48. saat sonuçları (4X)

16 saat sonunda kontrol grubuna kıyasla ALA'nın tek başına yara alanında hücrelerin göçünü artırmasında bir farklılık gözlenmezken 24 ve 48 saat sonunda ALA ile muamele, kontrol ile karşılaştırıldığında OVCAR-3 hücrelerinin göçünü artırdığı morfolojik olarak görüldü. Sisplatin+paklitaksel ikili ve ALA'nın eşlik ettiği üçlü doz grupların arasında yara iyileşmesinde bir farklılık gözlenmedi ve her iki grup da kontrol ve tek başına ALA uygulamalarına göre hücre göçünü belirgin olarak daha fazla engelledi.

MATRİGEL İNVAZYON TESTİ SONUÇLARI

Matrigel matriks bazal membrandaki düzenekte sayım işlemleri sonucunda kontrol hücrelerinden ortalama $1199 \pm 10,2$ hücrenin, tek başına $83,1 \mu\text{M}$ ALA uygulanan doz grubu hücrelerden de ortalama olarak $1256 \pm 17,9$ hücrenin invaze olup

kontrol odacığının diğer tarafına geçtiği tespit edildi. Sisplatin+paklitaksel ikili doz uygulamasında $8\pm 0,8$ hücrenin; üçlü uygulamada $36\pm 1,6$ hücrenin invaze olup kontrol odacığının diğer tarafına geçtiği tespit edildi. ALA tekli uygulamasının OVCAR-3 hücrelerinin invazyon durumlarını azaltmadığı; sisplatin+paklitaksel ikili uygulamasının invazyonu engellemede ALA ile 3'lü kombine uygulamasından daha etkili olduğu gözlemlendi (Şekil 16).



Şekil 16. Kontrol, ALA, Sisplatin+Paklitaksel ve ALA+Sisplatin+Paklitaksel gruplarında invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)

OKSİDATİF STRES DÜZEYİNİN TOTAL OKSİDAN (TOS) VE TOTAL ANTIOKSİDAN (TAS) SEVİYE ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ

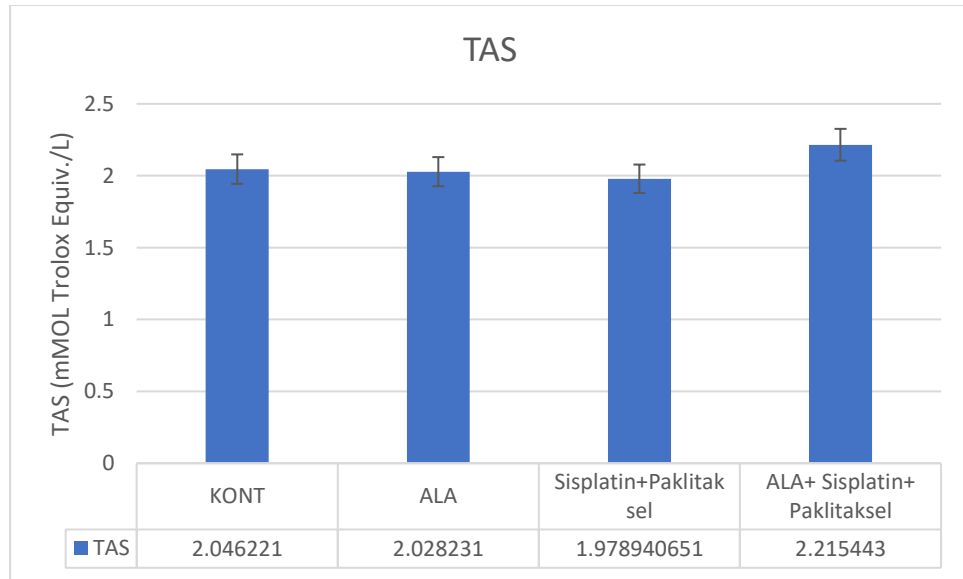
Toplam antioksidan durum (TAS), toplam oksidan durum (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI), hücre içi oksidatif durumu belirleyen oksidatif profillerdir.

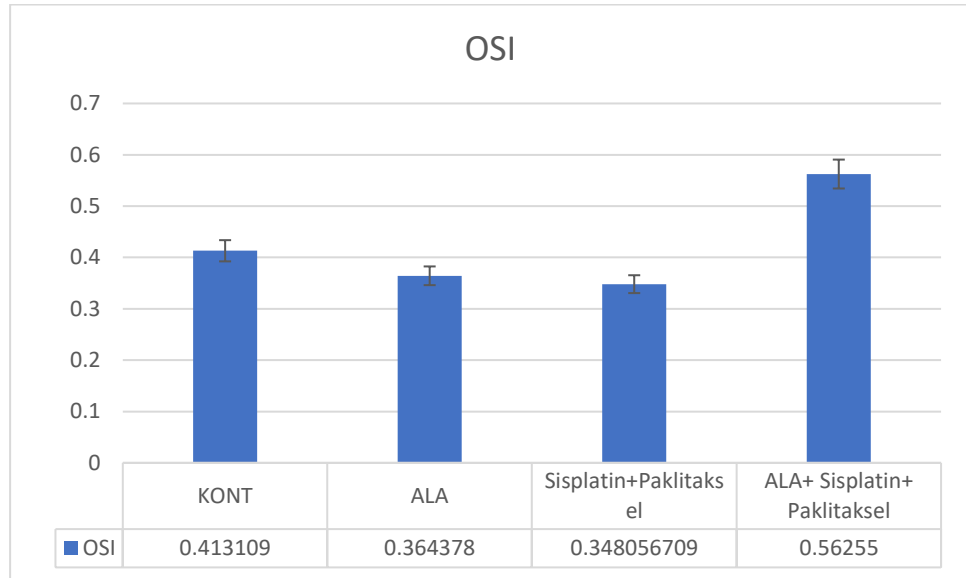
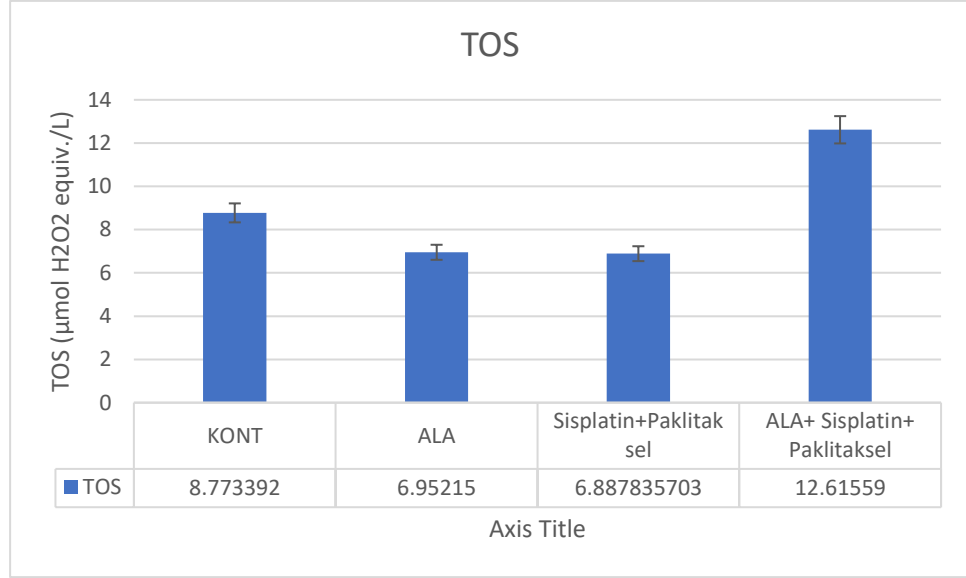
TAS ve TOS sonuçlarına bağlı olarak TOS'un TAS'a bölünmesiyle elde edilen oksidatif stres indeksi (OSI) değerini hesapladık. OSI sonuçlarını ifade edecek belirli bir birim yoktur. Deney sonuçlarına göre gruplar arasındaki karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p değeri $>0,05$); fakat TAS değeri kontrole

kıyasla üçlü doz uygulanan grupta artmış, TOS değeri kontrole kıyasla tek başına ALA ve sisplatin+paklitaksel grubunda azalmışken üçlü doz uygulanan grupta artmıştır. Sonuç olarak TAS, TOS ve OSİ değerlerini gösteren grafikler aşağıdaki gibidir (Tablo 15, Şekil 17).

Tablo 15. OVCAR-3 hücrelerinde kontrol ve doz gruplarının TAS, TOS ve OSİ değerleri

	TAS (mmol/L)	TOS (mmol/L)	OSİ
Kontrol	2,046221±0,43922	8,773392±3,492355	0,413109±0,044289
ALA	2,028231±0,492744	6,95215±1,041634	0,364378±0,060188
Sisplatin+Paklitaksel	2,036239±0,298847	7,072024±1,505179	0,351848±0,076177
ALA+Sisplatin+Paklitaksel	2,215443±0,473616	12,61559±4,632374	0,56255±0,099626





Şekil 17. OVCAR-3 hücrelerinde kontrol grubuna göre kontrol ve doz gruplarında TAS, TOS, OSI değerleri

ANNEXIN V İLE APOPTOZ TESPİTİ

Annexin V ile apoptoz tespiti deneyinde ALA, sisplatin ve paklitaksel ile ikili ve üçlü kombinasyon uygulamalarında apoptozu kontrol grubuna oranla belirgin şekilde artırmıştı; fakat en yüksek artış yine Sisplatin+Paklitaksel 3'lü doz grubunda bulundu (Tablo 16).

Tablo 16. OVCA3 hücrelerinde Annexin V ile apoptoz tespiti deneyinde kontrol, H₂O₂, ALA, Sisplatin+Paklitaksel ve ALA+Sisplatin+Paklitaksel doz uygulamalarının sonuçları

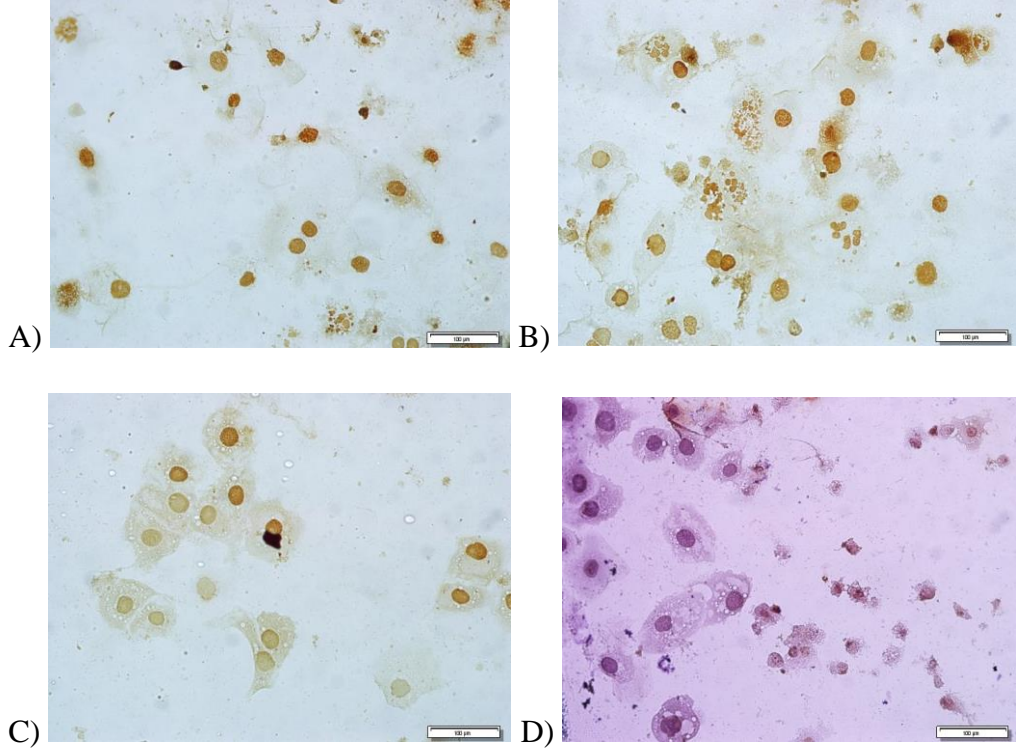
	Canlı hücre (%)	Apoptotik hücre (%)
Kontrol	99	1
H ₂ O ₂	46	54
ALA	45	55
Sisplatin+Paklitaksel	39	61
ALA+Sisplatin+Paklitaksel	40	60

TUNEL TESTİ İLE APOPTOZ TAYİNİ

Apoptoz için sinyal alındıktan sonra hücrede birçok biyokimyasal ve morfolojik değişimler gözlenir. Bu değişiklikler; hücre küçülmeye ve kondanse olmaya başlaması, hücre iskeleti dağılması, çekirdek zarı yer yer eriyip ve DNA'sının parçalara ayrılmasıdır.

Apoptotik hücreler, normal hücrelerden daha kolay ayırt edilebileceği membranla çevrili küçük parçalara ayrılırlar. Hücre sitoplazması, sıkıca paketlenmiş organeller ve bazılarında çekirdek parçaları da mevcut olan apoptotik cisimcikler meydana gelir. Bu özellikler dikkate alınarak mikroskop altında kontrol ve doz gruplarında preparatta her biri için 5 farklı alanda, 40Xbüyütmede, 200 hücre sayılmış, TUNEL pozitif hücreler sayılan tüm hücrelere oranlanarak apoptotik indeks bulundu. Çekirdeklerdeki veya apoptotik cisimlerdeki immünoreaktivite pozitif olarak kabul edildi. Kontrol ve doz gruplarına ait örnek preparat görüntüleri Şekil 18'de gösterilmiştir.

Kontrol grubu hücrelerde ortalama apoptotik hücre oranı % 17,7 iken, doz grubu hücrelerden ALA'da ortalama apoptotik hücre yüzdesi %45, Sisplatin+ Paklitaksel doz grubunda %83, ALA+Sisplatin+Paklitaksel doz grubunda %60 olarak belirlendi. TUNEL ile apoptotik indeks değerlendirmesinde en yüksek oran sisplatin+paklitaksel doz grubunda bulundu.



Şekil 18. TUNEL ile A)'da ALA+Sisplatin+Paklitaxel B)'de Sisplatin+Paklitaxel C) ALA D) Kontrol doz uygulamalarının immünoreaktivite gösteren OVCAR-3 hücrelerinin ışık mikroskop görüntüleri, A, B, C, D: 200X, immünoperoksidaz&hematoksilen

TARTIŞMA

Over kanseri gelişmiş ülkelerde jinekolojik kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir ve sıklıkla ileri bir aşamada ortaya çıkar (3). İlerlemiş over kanserinin mevcut standart tedavisi sitoredüktif cerrahi ve platin/taksan bazlı kemoterapidir (3, 39, 66). Tedaviye yanıt oranı yaklaşık %80-90'dır, ancak çoğu genellikle nüks eder ve kemoterapiye direnç geliştirir (3, 39). 5 yıllık sağkalım oranı <%35'tir (39). Bu nedenle over kanserinin tanı ve tedavisine yönelik alternatif yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır (3).

EOK'nin morfolojik olarak heterojen yapıya sahip olması uzun süredir etkin karakterizasyonuna ve tedavisinin optimize edilmesine engel olmuştur (3). Over kanserleri, histolojik alt tipten bağımsız klasik olarak platin bazlı kemoterapi olan sitotoksik ajanlarla tedavi edilmiştir (39, 44). Bu alt tipleri karakterize ederek uygun terapötik stratejiler oluşturabilmek adına tümöral yolları ve potansiyel biyobelirteçleri ortaya koymak için çok çaba sarf edilmiştir (39). Tümör heterojenitesi alt tipler arasında ve tek bir tümör içinde de oldukça yüksek görünmektedir ve bu da tedavi başarısızlığının önemli bir nedenini temsil etmektedir (39).

Son otuz yılda, potansiyel ilaç adaylarını (mono veya kombine tedaviler olarak) belirlemek veya mevcut kemoterapi rejimlerinin over kanserine karşı terapötik etkinliğini geliştirmek için bir dizi klinik öncesi ve klinik çalışma yapılmıştır (45).

Son yıllarda araştırmacılar, alfa lipoik asit, askorbik asit, kurkumin gibi doğal bileşiklerden kaynaklanan bazı umut verici sitotoksik ilaçları üretmeye odaklanmışlardır (62). Esas olarak mevcut kemoterapinin yan etkilerini azaltmak, hatta ortadan kaldırmak hedeflenmektedir. Bu nedenle kemoterapötiklerle sinerjik etkiyi güçlendirmek için bu tedavilere alternatif olarak bazı yeni terapötik stratejiler geliştirilmeye çalışılmaktadır (62, 66).

Antioksidan tedavi, serbest radikallerin yan etkilerini önleyen veya azaltan tedavi olarak tanımlanabilir (62). Eksojen antioksidanların dokuları in vivo oksidatif stresten korumadaki etkinliği değişkendir ve antioksidanın tipine, biyofarmasötik özelliklerine, etki alanındaki konsantrasyonuna ve oksidatif stresin doğasına bağlıdır (62).

Önemli bir antioksidan olan ALA'nın da terapötik bir ajan ve besin takviyesi olarak kullanımı hızla artmaktadır (62). Diabetes mellitus, hipertansiyon, Alzheimer,

Parkinson, Down sendromu, bilişsel işlev bozukluğu gibi birçok hastalık durumunun, komplikasyonlarının ve başta meme kanseri olmak üzere bazı kanser türlerinin tedavisinde kullanılmıştır (16, 19-21, 68). Antioksidan etkisi, ROS'u temizleme ve endojen antioksidanları yenileme yeteneği nedeniyle hücrel büyümede önemli bir rol oynar (62). Birçok araştırma ALA gibi antioksidanların, normal vücut dokusunu korurken antineoplastik ajanların sitotoksik etkisini güçlendirerek önemli rollere sahip olduğunu belirtmiştir (20, 62). Ayrıca kanserli hücreler tarafından biriken yüksek oksidatif stresi azaltmak için de apoptoza ve hücre proliferasyonunun inhibisyonuna yol açtığı öne sürülmektedir (20).

Biz de çalışmamızda ALA'yı OVCAR-3 ovarian adenokarsinoma hücre hattında sisplatin ve paklitaksel kemoterapötik ajanlarıyla kombinasyon halinde kullandık. Over kanserinin bu ilaçlara kemosensitivitesini arttırarak mevcut etkinliğinden ödün vermeden daha düşük dozlarda uygulanabilirliğini değerlendirmeyi amaçladık.

Kafara ve ark.'larının yapmış oldukları çalışmada biri yüksek oranda kemorezistan olan iki insan over kanseri hücre hattında, ALA'nın iki anti-apoptotik protein olan Mcl-1 ve Bcl-xL ekspresyonunu azaltarak her iki hücre hattında proliferasyonu baskıladığını ve hücre ölümünü indüklediğini göstermişlerdir (16). Son yapılan in vitro çalışmalar meme, nöroblastom, kolon, karaciğer, mesane kanseri ve akut T hücre lösemisi hücrelerinde ALA'nın apoptozu indüklediğini ve proliferasyonu inhibe ettiğini göstermiştir (16, 61, 68).

ALA, sırasıyla NF- κ B sinyalini ve integrin β 1/ β 3'ü inhibe ederek meme ve akciğer kanseri hücrelerinde paklitaksel etkinliğini arttırmıştır (61). Benzer bir çalışma, ALA ve Dosetaksel tedavisinin, meme kanseri hücrelerinde tek ilaç yüklü protokollere kıyasla apoptozu arttırdığını göstermiştir (61). Başka bir çalışmada, ALA'nın, kolorektal kanserde kullanılan farklı etki mekanizmalarına sahip iki anti-kanser ajanının (5-fluorourasil, Temozolomid) sitotoksitesini güçlendirdiği ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde büyüme faktörü reseptörlerinin aktivasyonunu azaltarak ALA'nın gefitinib direncinin üstesinden geldiği gösterilmiştir (61, 72).

Feuerecker ve ark. ALA'nın hücre proliferasyonunu ve laktat oluşumunu inhibe ettiğini, nöroblastom hücre hatları olan Kelly, SK-N-SH, Neuro-2a ile meme kanseri hücre hattı olan SkBr3'te apoptozu arttırdığını göstermişlerdir (69, 72). ALA tiroid kanseri hücre hatları olan BCPAP, HTH-83, CAL-62 ve FTC-133'te de AMPK

aktivasyonu üzerinden mTOR-S6 sinyal yolunun inhibisyonu yoluyla tiroid kanseri hücre proliferasyonunu ve büyümesini baskılamıştır (69). Akciğer kanseri hücrelerinde ALA, Grb2 aracılı EGFR inhibisyonuyla hücre proliferasyonunu inhibe etmiştir (69). Çalışmalar ayrıca akciğer kanseri, meme kanseri ve kolon kanserinde ALA'ya bağlı hücre ölümünü destekleyen ROS üretimi gerçekleştiğini ve bunun da kanser hücrelerinde apoptozun mitokondriyal yolunu aktive ettiğini düşündürmektedir (69). ALA ayrıca ERK1/2 ve AKT sinyal yolunu etkileyerek metastatik meme kanseri hücrelerinin göçünü ve istilasını inhibe etmiştir (69).

Tripathy J. ve ark. çalışmalarında, radyoterapi öncesi ALA ile ön tedavinin MCF7 meme kanseri hücrelerini radyoterapiye karşı duyarlı hale getirdiğini ve ışınlamanın proliferasyon inhibisyonu üzerindeki etkisini güçlendirdiğini göstermişlerdir (64, 72). Bizim de OVCAR-3 hücreleri ile yapmış olduğumuz XTT çalışmalarımızda ALA 48. saatte (83.1µM) tek başına bu hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterdi ve hücrelerin %50'sini öldürdü. Beraberinde sisplatin ve paklitaksel ile kombinasyon XTT çalışmasında sisplatin+paklitaksel ikilisi (%34,8) kadar sitotoksik olmasa da ALA ile üçlü doz uygulamalarında da hücre canlılığını %50,6'ya kadar düşürdüler.

Proliferasyonu ek olarak, ALA ön tedavisi, MCF7 meme kanseri hücrelerinde ışınlanmadan sonra bu hücrelerin koloni oluşturma yeteneğini de önemli ölçüde inhibe etmiştir (64). Biz de ise tersine ALA tek başına koloni formasyonunu ortalamasını belirgin biçimde artırır. Bununla birlikte sisplatin ve paklitaksel ile kombine uygulamalarında koloni oluşumu gözlenmedi.

Migrasyon deneyinde, düşük doz ışınlama önceki çalışmaları da doğrular şekilde MCF7 meme kanseri hücrelerinde migrasyonu bir miktar arttırmıştır (64). ALA ön tedavisiyle, tüm dozlarda meme kanseri hücrelerinin migrasyonu etkili bir şekilde önlenmiştir (64). Biz de migrasyonu değerlendirmek amacıyla yaptığımız yara iyileşme deneyinde 24 ve 48 saat sonunda ALA'nın tek başına kontrol ile karşılaştırıldığında OVCAR-3 hücrelerinin göçünü artırdığını morfolojik olarak gördük. Sisplatin+paklitaksel ikili ve ALA'nın eşlik ettiği üçlü doz gruplarının arasında yara iyileşmesinde bir farklılık gözlemedik ve her iki grup da kontrol ve tek başına ALA uygulamalarına göre hücre göçünü belirgin olarak daha fazla engelledi.

Ayrıca bu çalışmada ışınlama yoluyla aktive olabilen MMP'lerin, ECM'nin bozulmasına neden olarak migrasyon, invazyon ve metastazı artırabileceği ileri sürülmüştür (64). ALA'nın hem MCF7 hem de MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde radyasyon kaynaklı MMP'lerin aktivitesini önemli ölçüde önlediğini göstermişlerdir (64, 72). Özellikle MMP-2 ve MMP-9'un ifadesinin ALA tarafından azaltılmasının, meme kanseri hücrelerinin radyasyon sonrası uzak bölgelere göçünü ve istilasını azaltabileceğini ileri sürmüşlerdir (64, 65). Bizim de yaptığımız PCR çalışmamızda tümör hücresi adezyonu ile ilişkili genlerden tek başına ALA grubunda ve Sisplatin+Paklitaksel ikili doz grubunda MMP-3'ün azaldığı, MMP-9 ifadesinin arttığı gözlemlendi; üçlü doz uygulanan grupta ise MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-11 ifadeleri azaldı ve bu gruptaki MMP-9 ve 11 gen ifadelerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p değeri <0,05). Metalloproteinazların doku inhibitörü olan TIMP-1,2 ve 3 ekspresyonları tek başına ALA ve 3'lü doz grubunda azalmışken Sisplatin+Paklitaksel grubunda TIMP-1'de artış gözlemlendi. Burada tümör hücresi adezyonu ile ilişkili genler üzerinde MMP'ler üzerinde inhibisyon açısından en etkili grup üçlü doz uygulanan gruptu; fakat TIMP sonuçlarındaki azalma desteklemedi.

İnvazyonu değerlendirmek amacıyla yaptığımız bir diğer matrigel-inazyon testi deneyinde ise ALA tek başına kontrole kıyasla OVCAR-3 hücrelerinin invazyon durumlarını azaltmazken; sisplatin+paklitaksel ikili uygulamasının invazyonu engellemede ALA ile 3'lü kombine uygulamasından daha etkili olduğu gözlemlendi.

Tümör hücresi adezyonu ile ilişkili genlerin PCR sonuçlarını ve matrigel-invazyon testi deneyini birlikte değerlendirecek olursak MMP ve TIMP'lerin gen ifadesinin azalması açısından en etkili grup ALA+Sisplatin+Paklitaksel üçlü doz grubunda olduğunu söyleyebiliriz; fakat matrigel-inazyon testi deneyinde bu gen ekspresyonlarını destekler şekilde üçlü doz grubunda invazyon azalmadı ve hatta sisplatin+paklitaksel ikilisini daha etkili bulduk.

TRPA1 (transient receptor potential-TRP ankyrin 1) kanalının hipoksiyle aktivasyonu DBTRG glioblastoma kanser hücrelerinde Ca^{+2} girişini, ROS ve sitokin üretimini uyararak apoptotik hücre ölümüne neden olmaktadır. Deveci ve ark. 'larının yaptıkları çalışmada, DBTRG glioblastoma hücrelerinde TRPA1 kanallarının hipoksi indüksiyonu ile aktivasyonu yoluyla artan apoptoz, Annexin V, mitokondriyal membran depolarizasyonu ve ROS değerlerinin ALA tedavisi ile azaldığını

göstermişlerdir (67). Yani ALA tiyol redoks sistemi üyelerini (indirgenmiş glutatyon-GSH ve glutatyon peroksidaz-GSH-Px) aktive edip mitokondriyal ROS üretimini inhibe ederek antioksidan ve anti-inflamatuar etkilere neden olurken TRPA1 kanalının inhibisyonuyla anti-apoptotik etkiye de neden olmuştur. Bu nedenle ALA tedavisinin TRPA1 aracılı Ca^{+2} girişinin inhibisyonu yoluyla, glioblastoma kanser hücrelerini öldürmek için potansiyel bir strateji olmayabileceği de ileri sürülmüştür (67). Bizim de Annexin V ile apoptozu değerlendirmek için yaptığımız deneyde ALA, sisplatin ve paklitaksel ile ikili-üçlü kombinasyon uygulamalarında apoptozu kontrol grubuna oranla belirgin şekilde artırdılar; en yüksek artış Sisplatin+Paklitaksel 2'li doz grubundayken (%61) ALA+Sisplatin+Paklitaksel grubu (%60) da bu değere oldukça yakın bulundu. Apoptozu değerlendirmek için yaptığımız bir diğer deney Tunel ile apoptoz tespitinde de Sisplatin+Paklitaksel doz grubundaki apoptotik hücreler üçlü doz grubuna göre daha yüksek tespit edildi. Buradan çıkardığımız sonuçta ise literatürde ALA'nın over kanserinde kullanılan bu kemoterapötiklerle yapılmış başka bir çalışması olmadığı için ALA'nın hem tek başına hem de bu ilaçlarla daha etkili bir pro-apoptotik ve sitotoksik etki ortaya çıkaramadığını söyleyebiliriz.

Bir diğer çalışmada ksenograft farelerde 18 gün boyunca ALA'nın oral uygulamasından sonra, normal salinle tedavi edilen kontrol fareleriyle karşılaştırıldığında ALA'nın farelerin akciğerlerinde tümör nodül sayılarını ve tümör yükünü önemli ölçüde azalttığını ve akciğer kanseri A549 hücre hattında hücre canlılığını azalttığını göstermişlerdir (68, 71). Bununla birlikte c-Myc ve Cyclin D1 gibi hücre döngüsü genlerinin ekspresyonları ALA ile arttığı için ALA kaynaklı proliferasyon inhibisyonunun c-Myc ve Cyclin D1'in katılımından ziyade başka bir mekanizma tarafından düzenlendiğini ileri sürmüşlerdir (68). ALA ile tedavi edilen A549 hücrelerinde Bax/Bcl-2 oranı artmış, bu da hücrelerin ALA tedavisinden sonra apoptozu gidebileceğini düşündürmüştür (68). Önceki çalışmalar, ALA'nın insan kolon kanseri, hepatoma ve skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde mitokondriyal O_2 üretimini, Akt inhibisyonunu ve p27Kip'e bağlı hücre döngüsü durmasını aktive ederek apoptozu indüklediğini göstermiştir (68). Bu gözlemlerin aksine, bu çalışmada ALA ile tedavi edilen A549 hücrelerinde hücre döngüsü ile ilgili proteinlerde (c-Myc ve Cyclin D1) ekspresyon artışı ve Akt aktivasyonu bildirmişlerdir (68). ALA'nın kaspaz-3 aktivitesini tetikleyerek hücre döngüsü durmasına neden olduğu ve apoptozu

aracılık eden p27, p21 ve p53 protein ekspresyonlarının artmasında hayati bir rol oynadığı da öne sürülmüştür (20). ALA'nın anti-tümör etkileri, p53 proteininin artması yoluyla G1 fazında hücre döngüsünün durmasıyla fark edilmiştir (16, 20). p53, hücre döngüsü kontrol noktalarını, DNA onarımını ve apoptozu modüle etmede önemli bir rolü olan bir tümör baskılayıcı faktördür (20). Ek olarak, p53, ROS üretimi ve ROS kaynaklı oksidatif stres ile ilişkilendirilmiştir (20). Tümör hücrelerinin genelde p53'ten eksik olduğu bilindiğinden ALA'nın komşu normal hücrelere kıyasla tümör hücrelerinde p53 gen ekspresyonunu seçici olarak arttırdığı gösterilmiştir (20). Bizim PCR sonuçlarımıza göre de hücre siklusu düzenleyici genlerde bütün gruplarda CDK4'te azalma, 3'lü doz grubunda CDK4 ve CDK6 ekspresyonlarında azalma tespit edildi. Hücre siklusu düzenleyici genlerin (CDK4, CDK6) ifadelerindeki azalmaya en etkili grubun üçlü doz grubu olduğunu söyleyebiliriz. Özellikle CDK4 ve 6 üzerinden etkili olan siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinden p16'nın ekspresyonu bütün gruplarda azaldı, bu da bizim beklediğimiz CDK4 ve 6 inhibisyonunu açıklamadı. Tümör baskılayıcı p53 geninin ekspresyonu Sisplatin+Paklitaksel doz grubunda artmışken; ilginç bir şekilde tek başına ALA ve ALA+Sisplatin+Paklitaksel kombine doz grubunda azalmıştır. p53, hücre döngüsünün G0/G1 evresinde rol alan birçok siklin bağımlı kinazın işlevini engelleyen p21 proteininin ifadesini düzenleyerek p21 proteini aracılığı ile hücre döngüsünü G1 aşamasında durdurmaktadır. Biz bu nedenle üçlü doz grubundaki CDK ifadelerindeki azalmayı p53 ekspresyonu azalmasıyla ilişkilendiremedik ve başka bir mekanizma üzerinden olabileceğini düşündük.

Tümör proliferasyonunun, EGFR dahil olmak üzere farklı tirozin kinaz reseptörlerinin aşırı ekspresyonundan kaynaklandığı ve PI3K/AKT, ERK ve mTOR gibi onkojenik sinyal yollarının aktivasyonuna yol açtığı iyi bilinmektedir (61). ALA, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ailesi üyesi olan ErbB2 ve ErbB3 ekspresyonundaki azalmayla da bağlantılı önemli bir anti-proliferatif rol oynar (20, 61). Enerji homeostazını koruyan önemli bir enerji seviyesi sensörü olan AMPK'nin fosforilasyonu ile aktivasyonunun, AKT efektörü olan mTOR protein kompleksini inhibe ederek tümör ilerlemesini kısıtladığı gösterilmiştir (61). İnhibitör rolüne ek olarak, ALA, AMPK aktivasyonu ile AKT yolunun inhibisyonunu güçlendirmekte, böylece kanser hücresi proliferasyonunu azaltmaktadır (61).

PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının over kanserindeki onkojenik rolü karmaşıktır. PI3K yolu, over kanserinin ~%70'inde sıklıkla uyarılır ve aktive edilmiş PI3K sinyalinin over tümörjenezinde, agresif fenotiplerin ortaya çıkmasında, kemo-radyoterapi direncinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (45, 46). Bu yolak ayrıca kötü prognoz ile ilişkilidir ve bu da onu tedavi için önemli bir hedef haline getirmektedir (46). Bu nedenle biz de OVCAR-3 hücreleri üzerinde ALA'nın özellikle bu yolak üzerindeki etkisini incelemek istedik. Bizim PCR sonuçlarımız; PI3K-AKT yolağındaki gen gruplarından tek başına ALA uygulaması yapılan grupta AKT, RAPTOR ifadelerinde azalma; üçlü doz uygulanan grupta PI3K, RAPTOR, RICTOR, PDK-1 ve EIF-4E BP 1 ifadelerinde azalma tespit edildi. Bu değişikliklerden üçlü gruptaki RICTOR gen ifadesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p değeri <0,05). İlginç bir şekilde Sisplatin+Paklitaksel doz grubunda AKT, RAPTOR, PDK-1 VE EIF-4E BP 1 ifadelerinde artış gözlemlendi. Üçlü doz grubunda PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının baskılanmış olması araştırdığımız kadarıyla literatürde ALA'nın over kanserinde merak edilen bir etkisiydi. Özellikle PDK-1 üzerinden yapmış olduğunu düşündüğümüz inhibisyon bu gen ifadeleriyle desteklenmiş oldu. ELISA deneyi ile bakılan protein düzeylerinde de anlamlı değişiklikler belirlendi. Bu kez p-AKT, p-mTOR protein seviyesi değişikliklerinde en etkili grup sisplatin+paklitaksel ikilisi oldu, p-FOXO1 ve MAPK protein seviyelerinde ise ALA+sisplatin+paklitaksel üçlü doz grubunda belirgin azalma gözlemlendi. Ne yazık ki beklediğimiz gibi PI3K/AKT/mTOR yolağının gen ekspresyon profilleri ve ELISA ile bakılan yolağın hücre içi aktif formlarının protein seviyelerinde ilişki kuramadık.

Önceki veriler, ALA'nın, anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler arasındaki oranı düzenleyerek çeşitli kanser hücre dizilerinde apoptozu destekleyen ROS üretebildiğini göstermiştir (61). Lösemi ve meme kanserinde, ALA tedavisinden sonra artan kaspaz-3 aktivitesi ile Bax/bcl2 oranı (apoptotik indeks) önemli ölçüde artmıştır (61). Hepatoma kanser hücrelerinde yapılan bir başka çalışma da ALA'nın kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktivasyonu ile intrinsik apoptotik yolu tetiklediğini göstermişlerdir (61). ALA epitel hücreleri, endotel hücreleri, nöronlar ve lenfositler dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinin apoptozu için gerekli olan proapoptotik proteinler Bim ve Noxa'nın ekspresyonunu artırmıştır (16, 61). Kafara ve ark.'larının yapmış oldukları çalışmada ALA tedavisi altında Bim'in ekspresyon artışı, Bcl-xL ve Mcl-1 gibi diğer

anti-apoptotik proteinlerdeki azalmayla uyumlu görülmüş, ancak hücrelerinde eksprese edilmeyen Bcl-2'yi araştırmamışlardır (16). Bununla birlikte bu çalışmada, Bcl-xL ekspresyonunun azalması mekanizmasını, Akt ve NF-κB'nin inhibisyonuna neden olmasıyla açıklamışlardır (16, 61). Gerçekten de, NF-κB ekspresyonu, Akt'nin hiperaktivasyonuna yanıt olarak çeşitli tümör tiplerinde yaygın olarak gözlenmiştir ve Bcl-2, Bcl-xL gibi genlerin aktivasyonu yoluyla hücreleri apoptozise karşı korumaktadır (16, 61). Bizim çalışmamızda OVCAR-3 hücrelerinde pro-apoptotik gen grubundan Bax ekspresyonu da p53'e paralel olarak Sisplatin+Paklitaksel grubunda artmış; diğer 3'lü doz grubunda azalmıştır. ALA ve 3'lü kombine uygulanan gruplarda, anti-apoptotik gen grubundan olan Bcl-2 gen ekspresyonunda azalma gözlemlendi. Buradan da ALA'nın apoptozu Bcl-2 gen ekspresyonunda azalma mekanizması üzerinden gerçekleştirdiğini düşündük.

Daha önce belirtildiği gibi, artan hücre bölünmesi hızı, metabolik aktivite ve intrinsik antioksidanın arızalanması nedeniyle kanser hücresi ilerlemesinde artan ROS üretimi kabul edilmiştir (20). Ayrıca sisplatinle etkilenen hücre içi mekanizmanın, mitokondriyal işlev bozukluklarına yol açan aşırı ROS birikimi olduğu ileri sürülmüştür (53). En etkili antioksidanlardan biri olan ALA'nın antiapoptotik etkileri, nefrotoksisite, nörotoksisite ve ototoksisite dahil olmak üzere sisplatin kaynaklı birçok hasarda geniş çapta gösterilmiştir (53). Ototoksisite üzerine yapılan birkaç fonksiyonel çalışma, sisplatinle maruz kalmadan önce ALA ile ön tedavinin koklear hücrelerde ROS birikimini önemli ölçüde önleyebildiğini ve işitme fonksiyonunu koruyabildiğini bulmuştur (53). Hücresel antioksidan sistemde, ALA'nın, hücreleri oksidatif strese korumak için ROS düzenlemesinde önemli bir rol oynayan okside glutatyonun (GSSG) azalmış indirgenmiş formuna (GSH) geri dönüşümüne katkıda bulunduğu bilinmektedir (53). Ayrıca, glutatyon peroksidaz (GPx) ifadesi ALA tarafından artırılmıştır (53). Bu nedenle, ALA'nın, GPx'in verimli şekilde düzenlenmesi yoluyla ROS kaynaklı apoptotik hücre ölümünden hücrelerin korunmasında merkezi bir role sahip olduğunu göstermişlerdir (53). Bu çalışma, ALA'nın oksidatif strese karşı antioksidan sistemde spesifik bir rol oynadığına dair doğrudan kanıt sağlar ve bir GSSG indirgeyici olarak sisplatin kaynaklı ototoksisitede ALA'nın terapötik rolünü göstermiştir (53). Biz de çalışmamızda ALA'nın antioksidan özelliklerini OVCAR-3 hücreleri üzerinde incelemek amacıyla toplam antioksidan durum (TAS), toplam

oksidan durum (TOS) deneyleri ile TOS'un TAS'a bölünmesiyle elde edilen oksidatif stres indeksi (OSI) değerlerini hesapladık. TAS, TOS ve OSI hücre içi oksidatif durumu belirleyen oksidatif profillerdir. Deney sonuçlarına göre gruplar arasındaki karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p değeri $>0,05$); fakat TAS değerinin kontrole ve özellikle sisplatin+paklitaksel grubuna kıyasla üçlü doz uygulanan grupta arttığı, TOS değerinin kontrole kıyasla tek başına ALA ve sisplatin+paklitaksel grubunda azalmışken üçlü doz uygulanan grupta arttığı gözlemlendi. Yani ALA'nın dahil olduğu üçlü doz grubunda hem antioksidan hem de oksidan etkinlikler ve OSI sisplatin+paklitaksel grubuna göre artış gösterdi.

Pankreas duktal adenokarsinomu en agresif maligniteler arasındadır ve tedavisinde güçlü antitümör ajanlar olarak önerilen gümüş nanopartiküller, aşırı gümüş dozlarının yan etkileri nedeniyle uygulamayı sınırlandırmaktadır (70). Sentezledikleri nanogümüşü, ALA varlığında veya yokluğunda insan pankreas duktal adenokarsinomu hücre hatlarında (BxPc-3, PANC-1 ve MIA-PaCa2) ve normal insan pankreas kanal hücre hattında (CRL-4023) tedavi amacıyla kullanmışlardır (70). Gümüş, pankreas kanseri hücrelerini seçici olarak ortadan kaldırmış ve ALA da sitotoksiteyi desteklerken, iyi huylu hücrelerin bu sitotoksiteye büyük ölçüde direndiğini göstermişlerdir (70). ALA, gümüş partikülleri ile kompleksler oluşturmuş ve gümüş kaynaklı ROS oluşumunu, mitokondriyal hasarı ve karaciğer toksisitesini azaltmıştır (70). Verileri, ALA varlığında nanogümüş uygulamasının pankreas kanseri tedavisinde güvenli ve etkili olduğunu göstermektedir (70).

Roby ve ark.'ları, over epitel hücresinden türetilmiş kanserin genetik bir fare modelini tanımlamışlardır (73). Roby modelini kullanarak, ALA'nın normal MOSEC (Mouse ovarian surface epithelial cells)'lerin ve tümörijenik MOSEC'lerin büyümesi üzerindeki etkisini araştırmışlar (73). Kökeninden bağımsız olarak, ALA, tümörijenik olan epitel hücrelerinin büyümesini inhibe ederken normal over yüzey epitel hücrelerini inhibe etmediği gözlemlenmiştir (73). ALA'nın tümörijenik over yüzey epitel hücreleri üzerindeki büyüme önleyici etkisi ile uyumlu olarak, sikline bağımlı kinaz inhibitörü p27'nin stabilitesi, ALA ile tedavi edilen tümörijenik hücrelerde artmış ve tümörijenik olmayan hücrelerde artmadığı gösterilmiştir (73). Özetle, verileri ALA'nın tümörijenik over yüzey epitel hücrelerinin büyümesini baskılayabildiğini göstermektedir. Potansiyel mekanizmaları, TNF α aracılı inflamatuvar sinyal yollarının

inhibisyonu ve p27 stabilizasyonu yoluyla hücre büyümesinin inhibe edilmesidir (73). Bizim PCR sonuçlarımıza göre de ALA tek başına TNF α üzerine etki göstermezken; sisplatin+paklitaksel ve ALA+sisplatin+paklitaksel doz gruplarında TNF α ekspresyonu azaldı.

Tüm bu literatür taraması ve bizim sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde ALA'nın ROS temizleyicisi olarak iki karşıt rol oynadığı görülmektedir. Konsantrasyona ve redoks modülasyonuna bağlı olarak anti-oksidan ya da pro-oksidan olarak davranabilmektedir (71). Düşük dozlarda ROS'u ortadan kaldırarak normal hücreleri korurken; yüksek dozlarda, kanser hücrelerinde apoptozu ve sitotoksiteyi indüklemektedir. (20, 71). Ayrıca ALA'nın, kemoterapötik ajanlar veya RT ile kombine edildiğinde çok daha güçlü anti-kanser etkilerine sahip olduğu da gösterilmiştir (72).

ALA bizim çalışmamızda da proliferasyon, invazyon, migrasyon, koloni oluşumu, yara iyileşmesi, apoptoz, hücre döngüsü, PI3K -AKT yolağı ve tümör hücresi adezyonlarıyla ilişkili genlerin ekspresyonları, p-AKT, p-mTOR, p-FOXO1 ve MAPK protein seviyeleri, total oksidan ve total antioksidan düzeylerinin ölçümünü ve apoptoz mekanizması üzerine birçok basamağı etkiledi, fakat OVCAR-3 hücrelerinde beklediğimiz gibi sisplatin-paklitaksel ikilisinin etkinliğini artırmadı. Literatürde over kanseri üzerine ALA'nın etki mekanizmalarının detaylıca yer almaması sebebiyle anti-kanser etkileri tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Bu altta yatan moleküler mekanizmaların daha iyi açıklanabilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

ALA'nın pan-inhibitör etkilerinin hem in vitro hem de in vivo çalışmalar ile zamana ve doza bağlı olarak daha fazla araştırılması gerektiği sonucuna vardık.

SONUÇ

Artan kanser insidansı ve tedavide karşılaşılan zorluklar nedeniyle mevcut kemoterapötik ilaçların sensitivitesini arttırmak önemlidir. İlaçların etkinliklerinden ödün vermeden daha düşük dozlarda uygulanabilecek alternatif yöntemlerin araştırılmaktadır. Mevcut ilaçlarla beraber yan etkisi az ve etki gücünü artırabilecek yeni potansiyel ajanlar açısından apoptoz, hücre döngüsü ilişkili kompleks mekanizmaları açıklayabilmek büyük öneme sahiptir. Bu nedenle araştırılan bir bileşik olan ALA, proliferasyon, invazyon, migrasyon, EMT ve apoptoz ile ilgili sinyal yollarının çoğunda birçok basamağı etkileyerek çeşitli kanser modellerinde anti-tümör aktiviteler sergilediği gösterilmiştir.

ALA'nın over kanserinde en sık kullanılan kemoterapi ajanları olan sisplatin ve paklitaksel ile kombinasyon halinde kullanılmak üzere yeniden tasarlanması düşüncesiyle yaptığımız çalışmamızdan çıkardığımız sonuç; ALA sisplatin ve paklitaksel ile kullanımında beklediğimiz bir ideal etki ortaya koymadığıdır.

KAYNAKLAR

1. Kuroki L, Guntupalli SR. Treatment of epithelial ovarian cancer. *BMJ*. 2020 Nov 9;371:m3773. doi: 10.1136/bmj.m3773. PMID: 33168565.
2. Barani M, Bilal M, Sabir F, Rahdar A, Kyzas GZ. Nanotechnology in ovarian cancer: Diagnosis and treatment. *Life Sci*. 2021 Feb 1;266:118914. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118914. Epub 2020 Dec 16. PMID: 33340527.
3. Rojas V, Hirshfield KM, Ganesan S, Rodriguez-Rodriguez L. Molecular Characterization of Epithelial Ovarian Cancer: Implications for Diagnosis and Treatment. *Int J Mol Sci*. 2016 Dec 15;17(12):2113. doi: 10.3390/ijms17122113. PMID: 27983698; PMCID: PMC5187913.
4. Chen SN, Chang R, Lin LT, Chern CU, Tsai HW, Wen ZH, Li YH, Li CJ, Tsui KH. MicroRNA in Ovarian Cancer: Biology, Pathogenesis, and Therapeutic Opportunities. *Int J Environ Res Public Health*. 2019 Apr 29;16(9):1510. doi: 10.3390/ijerph16091510. PMID: 31035447; PMCID: PMC6539609.
5. Tarhriz V, Bandehpour M, Dastmalchi S, Ouladsahebmadarek E, Zarredar H, Eyvazi S. Overview of CD24 as a new molecular marker in ovarian cancer. *J Cell Physiol*. 2019 Mar;234(3):2134-2142. doi: 10.1002/jcp.27581. Epub 2018 Oct 14. PMID: 30317611.
6. Friedrich M, Friedrich D, Kraft C, Rogmans C. Multimodal Treatment of Primary Advanced Ovarian Cancer. *Anticancer Res*. 2021 Jul;41(7):3253-3260. doi: 10.21873/anticancer.15111. Epub 2021 Jul 5. PMID: 34230119.
7. Ledermann JA, Raja FA, Fotopoulou C, Gonzalez-Martin A, Colombo N, Sessa C; ESMO Guidelines Working Group. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013 Oct;24 Suppl 6:vi24-32. doi: 10.1093/annonc/mdt333. Erratum in: *Ann Oncol*. 2018 Oct 1;29(Suppl 4):iv259. Erratum in: *Ann Oncol*. 2018 Oct;29 Suppl 4:iv259. PMID: 24078660.
8. Lheureux S, Gourley C, Vergote I, Oza AM. Epithelial ovarian cancer. *Lancet*. 2019 Mar 23;393(10177):1240-1253. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32552-2. PMID: 30910306.

9. Reid BM, Permuth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med*. 2017 Feb;14(1):9-32. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084. PMID: 28443200; PMCID: PMC5365187.
10. Bewtra C, Watson P, Conway T, Read-Hippee C, Lynch HT. Hereditary ovarian cancer: a clinicopathological study. *Int J Gynecol Pathol*. 1992 Jul;11(3):180-7. doi: 10.1097/00004347-199207000-00003. PMID: 1399227.
11. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1999 Jun;116(6):1453-6. doi: 10.1016/s0016-5085(99)70510-x. PMID: 10348829.
12. Folkins AK, Longacre TA. Hereditary gynaecological malignancies: advances in screening and treatment. *Histopathology*. 2013 Jan;62(1):2-30. doi: 10.1111/his.12028. PMID: 23240667.
13. Penninkilampi R, Eslick GD. Perineal Talc Use and Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Epidemiology*. 2018 Jan;29(1):41-49. doi: 10.1097/EDE.0000000000000745. PMID: 28863045.
14. Bolton KL, Chenevix-Trench G, Goh C, Sadetzki S, Ramus SJ, Karlan BY, Lambrechts D, Despierre E, Barrowdale D, McGuffog L, Healey S, Easton DF, Sinilnikova O, Benítez J, García MJ, Neuhausen S, Gail MH, Hartge P, Peock S, Frost D, Evans DG, Eeles R, Godwin AK, Daly MB, Kwong A, Ma ES, Lázaro C, Blanco I, Montagna M, D'Andrea E, Nicoletto MO, Johnatty SE, Kjøer SK, Jensen A, Høgdall E, Goode EL, Fridley BL, Loud JT, Greene MH, Mai PL, Chetrit A, Lubin F, Hirsh-Yechezkel G, Glendon G, Andrulis IL, Toland AE, Senter L, Gore ME, Gourley C, Michie CO, Song H, Tyrer J, Whittemore AS, McGuire V, Sieh W, Kristoffersson U, Olsson H, Borg Å, Levine DA, Steele L, Beattie MS, Chan S, Nussbaum RL, Moysich KB, Gross J, Cass I, Walsh C, Li AJ, Leuchter R, Gordon O, Garcia-Closas M, Gayther SA, Chanock SJ, Antoniou AC, Pharoah PD; EMBRACE; kConFab Investigators; Cancer Genome Atlas Research Network. Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. *JAMA*. 2012 Jan 25;307(4):382-90. doi: 10.1001/jama.2012.20. PMID: 22274685; PMCID: PMC3727895.

15. Lim HJ, Ledger W. Targeted therapy in ovarian cancer. *Womens Health (Lond)*. 2016 Jun;12(3):363-78. doi: 10.2217/whe.16.4. Epub 2016 May 24. PMID: 27215391; PMCID: PMC5384518.
16. Kafara P, Icard P, Guillamin M, Schwartz L, Lincet H. Lipoic acid decreases Mcl-1, Bcl-xL and up regulates Bim on ovarian carcinoma cells leading to cell death. *J Ovarian Res*. 2015 Jun 12;8:36. doi: 10.1186/s13048-015-0165-z. PMID: 26063499; PMCID: PMC4470044.
17. Bilaska A, Włodek L. Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacol Rep*. 2005 Sep-Oct;57(5):570-7. PMID: 16227639.
18. Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*. 2001 Oct;17(10):888-95. doi: 10.1016/s0899-9007(01)00658-x. PMID: 11684397.
19. de Oliveira AM, Rondó PH, Luzia LA, D'Abronzio FH, Illison VK. The effects of lipoic acid and α -tocopherol supplementation on the lipid profile and insulin sensitivity of patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 May;92(2):253-60. doi: 10.1016/j.diabres.2011.02.010. Epub 2011 Mar 2. PMID: 21371770.
20. Novotny L, Rauko P, Cojocel C. alpha-Lipoic acid: the potential for use in cancer therapy. *Neoplasma*. 2008;55(2):81-6. PMID: 18237244.
21. El Barky AR, Hussein SA and Mohamed TM. The Potent Antioxidant Alpha Lipoic Acid. *J Plant Chem and Ecophysiol*. 2017; 2(1): 1016.
22. PL W, Bannister LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE. *Gray's Anatomy*. Alimentary system 38th ed Churchill Livingstone, New York. 1995:1775-6
23. Moore KL, Dalley AF. *Clinically oriented anatomy*: Wolters kluwer india Pvt Ltd; 2018.
24. Sadler TW. *Medikal Embriyoloji*. Başaklar C, Çev.Ed, 13. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 2020.
25. Moore KL, Persaud TVN. *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*. Dalçık H, Yıldırım M, Çev.Ed 8. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2009
26. Karakoç L, Fındıklı N, Ünsal E, Enginsu E, Balaban B, Özkavukçu S, Ergin E *Üremeye Yardımcı Tekniklerde Laboratuvar Teorik Konular ve Pratik Uygulamaları*, Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 2019

27. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık 2021
28. Javadi S, Ganeshan DM, Qayyum A, Iyer RB, Bhosale P. Ovarian Cancer, the Revised FIGO Staging System, and the Role of Imaging. *AJR Am J Roentgenol.* 2016 Jun;206(6):1351-60. doi: 10.2214/AJR.15.15199. Epub 2016 Apr 4. PMID: 27042752.
29. Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. Ovarian cancer. *Lancet.* 2014 Oct 11;384(9951):1376-88. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62146-7. Epub 2014 Apr 21. PMID: 24767708.
30. Chobanian N, Dietrich CS 3rd. Ovarian cancer. *Surg Clin North Am.* 2008 Apr;88(2):285-99, vi. doi: 10.1016/j.suc.2007.12.002. PMID: 18381114.
31. 32. Roett MA, Evans P. Ovarian cancer: an overview. *Am Fam Physician.* 2009 Sep 15;80(6):609-16. PMID: 19817326.
32. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol.* 2000 Jul-Aug;19(1):3-10. doi: 10.1002/1098-2388(200007/08)19:1<3::aid-ssu2>3.0.co;2-s. PMID: 10883018.
33. Chen LM, Yang KY, Little SE, Cheung MK, Caughey AB. Gynecologic cancer prevention in Lynch syndrome/hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *Obstet Gynecol.* 2007 Jul;110(1):18-25. doi: 10.1097/01.AOG.0000267500.27329.85. PMID: 17601891.
34. Vo C, Carney ME. Ovarian cancer hormonal and environmental risk effect. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2007 Dec;34(4):687-700, viii. doi: 10.1016/j.ogc.2007.09.008. PMID: 18061864.
35. Kujawa KA, Lisowska KM. Rak jajnika--od biologii do kliniki [Ovarian cancer--from biology to clinic]. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2015 Dec 2;69:1275-90. Polish. doi: 10.5604/17322693.1184451. PMID: 26671919.
36. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol.* 2000 Jul-Aug;19(1):3-10. doi: 10.1002/1098-2388(200007/08)19:1<3::aid-ssu2>3.0.co;2-s. PMID: 10883018.
37. Stewart C, Ralyea C, Lockwood S. Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Semin Oncol Nurs.* 2019 Apr;35(2):151-156. doi: 10.1016/j.soncn.2019.02.001. Epub 2019 Mar 11. PMID: 30867104.

38. Shih IeM, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol.* 2004 May;164(5):1511-8. doi: 10.1016/s0002-9440(10)63708-x. PMID: 15111296; PMCID: PMC1615664.
39. Kossai M, Leary A, Scoazec JY, Genestie C. Ovarian Cancer: A Heterogeneous Disease. *Pathobiology.* 2018;85(1-2):41-49. doi: 10.1159/000479006. Epub 2017 Oct 12. PMID: 29020678.
40. Kindelberger DW, Lee Y, Miron A, Hirsch MS, Feltmate C, Medeiros F, Callahan MJ, Garner EO, Gordon RW, Birch C, Berkowitz RS, Muto MG, Crum CP. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol.* 2007 Feb;31(2):161-9. doi: 10.1097/01.pas.0000213335.40358.47. PMID: 17255760.
41. Medeiros F, Muto MG, Lee Y, Elvin JA, Callahan MJ, Feltmate C, Garber JE, Cramer DW, Crum CP. The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome. *Am J Surg Pathol.* 2006 Feb;30(2):230-6. doi: 10.1097/01.pas.0000180854.28831.77. PMID: 16434898.
42. 39. Diaz-Padilla I, Malpica AL, Minig L, Chiva LM, Gershenson DM, Gonzalez-Martin A. Ovarian low-grade serous carcinoma: a comprehensive update. *Gynecol Oncol.* 2012 Aug;126(2):279-85. doi: 10.1016/j.ygyno.2012.04.029. Epub 2012 Apr 30. PMID: 22555104.
43. Kurman RJ, Shih IeM. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol.* 2010 Mar;34(3):433-43. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181cf3d79. PMID: 20154587; PMCID: PMC2841791.
44. Kroeger PT Jr, Drapkin R. Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2017 Feb;29(1):26-34. doi: 10.1097/GCO.0000000000000340. PMID: 27898521; PMCID: PMC5201412.
45. Ediriweera MK, Tennekoon KH, Samarakoon SR. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance. *Semin Cancer Biol.* 2019 Dec;59:147-160. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.05.012. Epub 2019 May 22. PMID: 31128298.
46. Huang TT, Lampert EJ, Coots C, Lee JM. Targeting the PI3K pathway and DNA damage response as a therapeutic strategy in ovarian cancer. *Cancer Treat Rev.* 2020

- Jun;86:102021. doi: 10.1016/j.ctrv.2020.102021. Epub 2020 Apr 10. PMID: 32311593; PMCID: PMC7272282.
47. Webb PM, Jordan SJ. Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017 May;41:3-14. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2016.08.006. Epub 2016 Oct 3. PMID: 27743768.
48. Goff BA, Mandel LS, Melancon CH, Muntz HG. Frequency of symptoms of ovarian cancer in women presenting to primary care clinics. *JAMA*. 2004 Jun 9;291(22):2705-12. doi: 10.1001/jama.291.22.2705. PMID: 15187051.
49. Orr B, Edwards RP. Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2018 Dec;32(6):943-964. doi: 10.1016/j.hoc.2018.07.010. PMID: 30390767.
50. Nagamine K, Kondo J, Kaneshiro R, Tauchi-Nishi P, Terada K. Ovarian needle aspiration in the diagnosis and management of ovarian masses. *J Gynecol Oncol*. 2017 Jul;28(4):e40. doi: 10.3802/jgo.2017.28.e40. PMID: 28541632; PMCID: PMC5447143.
51. Vencken PMLH, Kriege M, Hoogwerf D, Beugelink S, van der Burg MEL, Hooning MJ, Berns EM, Jager A, Collée M, Burger CW, Seynaeve C. Chemosensitivity and outcome of BRCA1- and BRCA2-associated ovarian cancer patients after first-line chemotherapy compared with sporadic ovarian cancer patients. *Ann Oncol*. 2011 Jun;22(6):1346-1352. doi: 10.1093/annonc/mdq628. Epub 2011 Jan 12. PMID: 21228333.
52. Kakar SS, Jala VR, Fong MY. Synergistic cytotoxic action of cisplatin and withaferin A on ovarian cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jul 13;423(4):819-25. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.06.047. Epub 2012 Jun 16. PMID: 22713472; PMCID: PMC3402232.
53. Kim KH, Lee B, Kim YR, Kim MA, Ryu N, Jung DJ, Kim UK, Baek JI, Lee KY. Evaluating protective and therapeutic effects of alpha-lipoic acid on cisplatin-induced ototoxicity. *Cell Death Dis*. 2018 Aug 1;9(8):827. doi: 10.1038/s41419-018-0888-z. PMID: 30068942; PMCID: PMC6070527.
54. Kleih M, Böpple K, Dong M, Gaißler A, Heine S, Olayioye MA, Aulitzky WE, Essmann F. Direct impact of cisplatin on mitochondria induces ROS production that

- dictates cell fate of ovarian cancer cells. *Cell Death Dis.* 2019 Nov 7;10(11):851. doi: 10.1038/s41419-019-2081-4. PMID: 31699970; PMCID: PMC6838053.
55. Ayyagari VN, Hsieh TJ, Diaz-Sylvester PL, Brard L. Evaluation of the cytotoxicity of the Bithionol - cisplatin combination in a panel of human ovarian cancer cell lines. *BMC Cancer.* 2017 Jan 13;17(1):49. doi: 10.1186/s12885-016-3034-2. PMID: 28086831; PMCID: PMC5234112.
56. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem.* 2019 Jul;88:102925. doi: 10.1016/j.bioorg.2019.102925. Epub 2019 Apr 11. PMID: 31003078.
57. Świerczewska M, Klejewski A, Brażert M, Kaźmierczak D, Iżycki D, Nowicki M, Zabel M, Januchowski R. New and Old Genes Associated with Primary and Established Responses to Paclitaxel Treatment in Ovarian Cancer Cell Lines. *Molecules.* 2018 Apr 12;23(4):891. doi: 10.3390/molecules23040891. PMID: 29649113; PMCID: PMC6017641.
58. Zhu L, Chen L. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. *Cell Mol Biol Lett.* 2019 Jun 13;24:40. doi: 10.1186/s11658-019-0164-y. PMID: 31223315; PMCID: PMC6567594.
59. Alqahtani FY, Aleanizy FS, El Tahir E, Alkahtani HM, AlQuadeib BT. Paclitaxel. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol.* 2019;44:205-238. doi: 10.1016/bs.podrm.2018.11.001. Epub 2019 Apr 22. PMID: 31029218.
60. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell.* 2014 Sep 15;25(18):2677-81. doi: 10.1091/mbc.E14-04-0916. PMID: 25213191; PMCID: PMC4161504.
61. Farhat D, Lincet H. Lipoic acid a multi-level molecular inhibitor of tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2020 Jan;1873(1):188317. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.188317. Epub 2019 Nov 1. PMID: 31669587.
62. Attia M, Essa EA, Zaki RM, Elkordy AA. An Overview of the Antioxidant Effects of Ascorbic Acid and Alpha Lipoic Acid (in Liposomal Forms) as Adjuvant in Cancer Treatment. *Antioxidants (Basel).* 2020 Apr 25;9(5):359. doi: 10.3390/antiox9050359. PMID: 32344912; PMCID: PMC7278686.
63. Baeri M, Bahadar H, Rahimifard M, Navaei-Nigjeh M, Khorasani R, Rezvanfar MA, Gholami M, Abdollahi M. α -Lipoic acid prevents senescence, cell cycle arrest,

and inflammatory cues in fibroblasts by inhibiting oxidative stress. *Pharmacol Res.* 2019 Mar;141:214-223. doi: 10.1016/j.phrs.2019.01.003. Epub 2019 Jan 3. PMID: 30611855.

64. Tripathy J, Chowdhury AR, Prusty M, Muduli K, Priyadarshini N, Reddy KS, Banerjee B, Elangovan S. α -Lipoic acid prevents the ionizing radiation-induced epithelial-mesenchymal transition and enhances the radiosensitivity in breast cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 2020 Mar 15;871:172938. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.172938. Epub 2020 Jan 17. PMID: 31958458.

65. Tripathy J, Tripathy A, Thangaraju M, Suar M, Elangovan S. α -Lipoic acid inhibits the migration and invasion of breast cancer cells through inhibition of TGF β signaling. *Life Sci.* 2018 Aug 15;207:15-22. doi: 10.1016/j.lfs.2018.05.039. Epub 2018 May 23. PMID: 29802942.

66. Cortez AJ, Tudrej P, Kujawa KA, Lisowska KM. Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2018 Jan;81(1):17-38. doi: 10.1007/s00280-017-3501-8. Epub 2017 Dec 16. PMID: 29249039; PMCID: PMC5754410.

67. Deveci HA, Akyuva Y, Nur G, Nazıroğlu M. Alpha lipoic acid attenuates hypoxia-induced apoptosis, inflammation and mitochondrial oxidative stress via inhibition of TRPA1 channel in human glioblastoma cell line. *Biomed Pharmacother.* 2019 Mar;111:292-304. doi: 10.1016/j.biopha.2018.12.077. Epub 2018 Dec 24. PMID: 30590317.

68. Peng P, Zhang X, Qi T, Cheng H, Kong Q, Liu L, Cao X, Ding Z. Alpha-lipoic acid inhibits lung cancer growth via mTOR-mediated autophagy inhibition. *FEBS Open Bio.* 2020 Apr;10(4):607-618. doi: 10.1002/2211-5463.12820. Epub 2020 Mar 18. PMID: 32090494; PMCID: PMC7137803.

69. Salehi B, Berkay Yılmaz Y, Antika G, Boyunegmez Tumer T, Fawzi Mahomoodally M, Lobine D, Akram M, Riaz M, Capanoglu E, Sharopov F, Martins N, Cho WC, Sharifi-Rad J. Insights on the Use of α -Lipoic Acid for Therapeutic Purposes. *Biomolecules.* 2019 Aug 9;9(8):356. doi: 10.3390/biom9080356. PMID: 31405030; PMCID: PMC6723188.

70. An X, Liu L, Schaefer M, Yan B, Scholz C, Hillmer S, Wang K, Luo Y, Ji H, Gladkich J, Herr I. Alpha-Lipoic Acid Prevents Side Effects of Therapeutic Nanosilver without Compromising Cytotoxicity in Experimental Pancreatic Cancer. *Cancers*

(Basel). 2021 Sep 24;13(19):4770. doi: 10.3390/cancers13194770. PMID: 34638256; PMCID: PMC8507678.

71. Yue L, Ren Y, Yue Q, Ding Z, Wang K, Zheng T, Chen G, Chen X, Li M, Fan L. α -Lipoic Acid Targeting PDK1/NRF2 Axis Contributes to the Apoptosis Effect of Lung Cancer Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2021 Jun 4;2021:6633419. doi: 10.1155/2021/6633419. PMID: 34211631; PMCID: PMC8211503.

72. Choi HS, Kim JH, Jang SJ, Yun JW, Kang KM, Jeong H, Ha IB, Jeong BK. Synergistic Tumoricidal Effects of Alpha-Lipoic Acid and Radiotherapy on Human Breast Cancer Cells via HMGB1. *Cancer Res Treat*. 2021 Jul;53(3):685-694. doi: 10.4143/crt.2020.1015. Epub 2020 Dec 15. PMID: 33321563; PMCID: PMC8291200.

73. Vig-Varga E, Benson EA, Limbil TL, Allison BM, Goebel MG, Harrington MA. Alpha-lipoic acid modulates ovarian surface epithelial cell growth. *Gynecol Oncol*. 2006 Oct;103(1):45-52. doi: 10.1016/j.ygyno.2006.01.060. Epub 2006 Mar 29. PMID: 16574204.