

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SKOV-3 OVARIAN ADENOKARSİNOMA HÜCRE HATTINDA,
ALFA LİPOİK ASİT UYGULANMASININ EPİTELYAL
MEZENKİMAL GEÇİŞ ve MİGRASYON ÜZERİNE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ELİF ÖNDER**

**DANIŞMAN
PROF. DR. GÜLÇİN METE**

DENİZLİ – 2022

TEŞEKKÜR

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

Embriyoloji ve IVF eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile eğitimime katkı sağlayan, ileriki çalışma hayatımda etik çalışma ahlakını bana aşıl原因, her konuda değerli katkıları ve emekleriyle yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocalarım Doç. Dr. Nazlı ÇİL'e ve Dr. Öğr. Üyesi M. Serkant ÜNAL'a,

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan eğitimime katkı sağlayan, değerli hocalarım Prof. Dr. Hülya ÇETİN, Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR ve Doç. Dr. Nazan KESKİN'e,

Tez deneylerinde yanımda olan ve birçok konuda bana yardımlarını esirgemeyen çok kıymetli arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Mücahit SEÇME, Arş. Gör. Dr. Şiyzen ÇOBAN ve Arş. Gör. Dr. Deniz Kalemci'ye,

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

Her konuda desteklerini esirgemeyen, varlıklarına her daim şükrettiğim, çok sevgili annem, babam, ablam ve abime,

Hayat arkadaşım, en büyük desteğim, çok kıymetli canım eşime,

Ve hayat enerjim, mutluluğum, en sevdiğim, biricik oğluma,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Dr. Elif ÖNDER

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ONAY SAYFASI.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XIII
ÖZET.....	XV
SUMMARY	XVII
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER.....	5
OVER	5
Over Anatomisi.....	5
Over Embriyolojisi	6
Over Histolojisi	7
OVER KANSERLERİ	8
Epidemiyoloji	9
Risk Faktörleri.....	10
Over Kanseri Patogenezi	16
Over Kanseri Sınıflaması ve Histopatolojisi	17
Tanı.....	20
Evreleme	21
Prognosis	23
Metastaz.....	23
Tedavi	28
EPİTELYAL MEZENKİMAL TRANSİTOZ (EMT).....	29
EMT'yi Aktifleştiren Sinyal Yolakları	33
Kanser ve EMT	36
ALFA LİPOİK ASİT (ALA)	39

Proliferasyon ve Apopitozda Lipoik Asitin Etkileri.....	40
Metastaz, İnvazyon, Migrasyon ve EMT’de Alfa Lipoik Asitin	
Etkisi	42
MATERYAL VE METOT	44
BULGULAR	57
TARTIŞMA	87
SONUÇ	93
KAYNAKLAR	94

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- °C: Santigrad Derece
µg: Mikrogram
µl: Mikrolitre
µM: Mikromolar
2D: İki Boyutlu
AIF: Apoptoz-indükleyici Faktör
ALA: Alfa Lipoik asit
ASR: The Age Standardized Rate
bHLH: Basic helix-loop-helix
BMP: Kemik morfogenetik proteinler
BMP-4: Kemik morfojenik protein 4
cDNA: Komplementer (Tamamlayıcı) Deoksiribo Nükleik Asit
cm: Santimetre
CO₂: Karbondioksit
CTC: Dolaşan tümör hücreleri
CTNNB1: β-catenin
dk: Dakika
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO: Dimetil Sülfoksit
DNA: Deoksiribo Nükleik Asit
EGF: Epidermal büyüme faktörü
E-kadherin: Epitelyal kaderin
EMT: Epitelden mezenkime geçiş
EMT-TF: EMT Transkripsiyon faktörleri
EOK: Epitelyal Over Kanseri
EOK: Epitelyal over kanseri
ET-1: Endotelin 1
FAK: Fokal adezyon kinase
FBS: Föetal Bovin Serum
FIGO: Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu

FİGO: Uluslararası Jinekoloji Ve Obstetrik Federasyonu
FSH: Folikül Stimüle Edici Hormon
GAPDH: Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrojenaz
HGF: Hepatosit büyüme faktörü
HGSC: High-grade seröz karsinom
HIPEC: Isıtılmış intraperitoneal kemoterapi
HRT: Hormon replasman tedavisi
IC50 (LD50) : Letal Doz 50
İGE: İnsan gelişim indeksi
KGDG: α - keto gluterat dehidrojenaz
KKH: Kanser kök hücresi
LGSC: Low-grade seröz karsinom
MET: Mezenkimal epitelyal geçiş
miR-200: microRNA-200
MKKH: Metastatik kanser kök hücrelerinin
ml: Mililitre
mM: Milimolar
MMP: Matris metalloproteinazlar
mRNA: Mesajcı Ribo Nükleik Asit
mTOR: Mammalian Target of Rapamycin
ng: Nanogram
N-kaderin: Nöral kaderin
nm: Nanometre
nM: Nanomolar
OD: Absorbans Değerleri
OK: Over kanseri
PARPi: Poli ADP-riboz polimeraz inhibitörü
PBS: Fosfat Buffered Salin
PDH: Piruvat dehidrojenaz
PI3K: Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PKC: Protein kinaz C
pM: Pikomolar

pmol: Pikomol
PTEN: Fosfataz Ve Tensin Homoloğu
RNA: Ribo Nükleik Asit
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
RPM: Dakikadaki Devir Sayısı
RPMI: Roskuyucuklu Park Memorail Institute
RT: Radyoterapi
RT: Revers Transkriptaz Enzimi
RT-PCR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDH: Süksinat dehidrojenaz
SERM: Selektif Östrojen Reseptör Modülatörüdür
sn: Saniye
sp: Sapma
std: Standart
STIC: Seröz tubal intraepitelyal karsinom
subt: Substrat
TCA: Trikarboksilik asit döngüsünde
TCIPA: Tümör hücresi kaynaklı trombosit agregasyonu
TEM: Transendotelyal göç
TGF- β : Dönüştürücü büyüme faktörü β
TKR: Tirozin kinaz reseptörlerinin
U: Universal Unite
VCİ: Vena kava inferior
VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörüne
VKİ: Vücut Kitle İndeksi
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
XTT:2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)2HTetrazolium
Carboxanilide)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Over kanseri histopatolojik sınıflandırması.....	20
Şekil 2. Epitelyal ve mezenkimal hücrelerin morfolojik özellikleri	32
Şekil 3. Ana hatlarıyla tipik bir EMT	33
Şekil 4. EMT'yi aktive eden sinyal yolları.....	34
Şekil 5. EMT ve MET'in kanser ilerlemesi ve metastazındaki çeşitli işlevleri	39
Şekil 6. Alfa Lipoik Asit kimyasal yapısı	40
Şekil 7. Tümör oluşumunda yer alan bir kaç sinyal yolunda lipoik asitin etkileri	43
Şekil 8. Çalışmamızda kullandığımız SKOV-3 hücrelerinin 4X inverted mikroskopik görüntüsü.....	45
Şekil 9. Alfa lipoik asit'in çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi	57
Şekil 10. Alfa lipoik asit IC 50 dozunu gösteren grafik	58
Şekil 11. RT-PCR sonucuna göre kontrol ve farklı doz TGF β uygulanan gruplar arasında değişiklik gösteren genler	60
Şekil 12. RT-PCR sonuçlarına göre kontrol ve farklı doz TGF β uygulanan gruplar arasındaki değişimin sütun grafik gösterimi	60
Şekil 13. SKOV-3 hücrelerine 72 saat 100 ng/ml TGF β uygulaması sonrası SKOV-3 hücrelerinin epitelooid yapıdan mezenkimale dönüşümünün morfolojik olarak gösterilmesi	61
Şekil 14. RT-PCR sonucuna göre kontrol grubuna göre değişiklik gösteren genler .	62
Şekil 15. RT-PCR sonucuna göre kontrol grubuna göre deney grupları arasında değişiklik gösteren genlerin çizgi grafiği gösterimi.....	62
Şekil 16. RT-PCR sonucuna göre kontrol grubuna göre deney grupları arasında değişiklik gösteren genlerin küme grafiği gösterimi.....	63
Şekil 17. SKOV-3 hücrelerinde kontrol, TGF β , ALA ve komnasyonlarının uygulandığı deney gruplarında 72 saat sonra hücrelerin morfolojik olarak gösterimi	64
Şekil 18. Kontrol grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (100X).....	65
Şekil 19. TGF β grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (100X)	65
Şekil 20. ALA grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (100 X).....	65

Şekil 21. TGF β + ALA grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (100X)	66
Şekil 22. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında invazyon deneyi sonuç grafiği	67
Şekil 23. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve doz gruplarında koloni görüntüsü	68
Şekil 24. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında koloni deneyi istatistik sonuç grafiği.....	69
Şekil 25. Kontrol, TGF β , ALA ve kombine gruplarına ait 0. 16. ve 24. saat wound healing deneyi sonuçları.....	71
Şekil 26. E- Kadherin antikoru immünsitokimya boyama, zıt boyama olarak H&E, 400 ^x büyütme.....	73
Şekil 27. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında E- kadherin proteininin immünsitokimya istatik sonuç grafiği.....	74
Şekil 28. Vimentin antikoru immünsitokimya boyama, zıt boyama olarak H&E, 400 ^x büyütme.....	75
Şekil 29. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında vimentin proteininin immünsitokimya istatik sonuç grafiği.....	76
Şekil 30. Snail antikoru immünsitokimya boyama, zıt boyama olarak H&E, 400 ^x büyütme.....	77
Şekil 31. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında Snail proteininin immünsitokimya istatik sonuç grafiği.....	78
Şekil 32. Slug antikoru immünsitokimya boyama, zıt boyama olarak H&E, 400 ^x büyütme.....	79
Şekil 33. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında Slug proteininin immünsitokimya istatik sonuç grafiği.....	80
Şekil 34. Twist antikoru immünsitokimya boyama, zıt boyama olarak H&E, 400 ^x büyütme.....	81
Şekil 35. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında Twist proteininin immünsitokimya istatik sonuç grafiği.....	82
Şekil 36. Zeb antikoru immünsitokimya boyama, zıt boyama olarak H&E, 400 ^x büyütme.....	83

Şekil 37. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında Zeb proteininin immünsitokimya istatik sonuç grafiği.....	84
Şekil 38. beta katenin antikoru immünsitokimya boyama, zıt boyama olarak H&E, 400 ^x büyütme.....	85
Şekil 39. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında β -katenin proteininin immünsitokimya istatik sonuç grafiği.....	86

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Over Kanseri Risk Faktörleri	16
Tablo 2. Over kanseri evreye göre 5 yıllık survey tablosu	23
Tablo 3. RT-PCR’da analiz edilen genlerin primer listesi	52
Tablo 4. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon karışımı.....	52
Tablo 5. TGF β dozunu belirlemek için izole edilen RNA’lara ait konsantrasyon ve saflık değerleri.....	58
Tablo 6. Deney grubuna ait izole edilen RNA’lara ait konsantrasyon ve saflık değerleri.....	59
Tablo 7. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve doz gruplarında invazyona uğrayan hücre sayısı, ortalama ve standart sapmaları.....	66
Tablo 8. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında invazyon deneyi istatistik sonuç tablosu	66
Tablo 9. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında koloni sayısı, ortalama, standart sapma sonuçları	69
Tablo 10. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında koloni deneyi istatistik sonuçları	69
Tablo 11. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında yüzdeler olarak wound healig sonuçları	71
Tablo 12. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında yüzdeler olarak wound healig deneyi 16. saat istatistik sonuçları.....	71
Tablo 13. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında yüzdeler olarak wound healig deneyi 24. saat istatistik sonuçları.....	72
Tablo 14. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında E- kadherin proteininin immünsitokimya istatistik sonuçları.....	74
Tablo 15. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında vimentin proteininin immünsitokimya istatistik sonuçları	76
Tablo 16. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında Snail proteininin immünsitokimya istatistik sonuçları	78
Tablo 17. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında Slug proteininin immünsitokimya istatistik sonuçları	80

Tablo 18. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında Twist proteininin immünsitokimya istatik sonuçları	82
Tablo 19. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında Zeb proteininin immünsitokimya istatik sonuçları	84
Tablo 20. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında β -katenin proteininin immünsitokimya istatik sonuçları	86

ÖZET

SKOV-3 ovarian adenokarsinoma hücre hattında, alfa lipoik asit uygulanmasının epitelyal mezenkimal geçiş ve migrasyon üzerine etkisi

Dr. Elif ÖNDER

Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin beşinci önde gelen nedeni over kanseridir. Etkili bir tarama yöntemi olmadığından ve semptomları belirsiz olduğundan, epitelyal over kanseri (EOK)'nin erken tespiti zordur. Bu yüzden, genellikle hastalar ileri evrede tümör metastazı mevcutken teşhis edilir. Başlıca transçöломik yol vasıtasıyla metastaz yapan EOK hücreleri, epitelden mezenkime geçiş (EMT) ile primer EOK'den diğer bölgelere yayılır. Doğal bir antioksidan lipofilik bileşik olan alfa lipoik asit (ALA), kanserli hücreler tarafından biriktirilen oksidatif stresi, kanser hücrelerinde apoptoza ve hücre proliferasyon inhibisyonuna yol açarak azaltır. Çalışmamızın amacı over kanserinin en sık görülen tipi olan epitelyal alt tipinden bir hücre hattı olan SKOV-3 ovarian adenokarsinoma hücre hattında dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF β) bağımlı EMT'nin kurulması, ALA antioksidan bileşiğinin IC 50 dozunun uygulanmasının 2D (monolayer) hücre kültürleri yapılarak ALA'nın EMT ve over kanseri migrasyonunun etkisini araştırmaktır. Çalışmamızda SKOV-3 hücrelerinde EMT modeli kurmak için TGF β 1 dozu, RT-PCR sonucunda en uygun gen ekspresyonlarını sağladığımız doza göre, ALA IC 50 dozu ise XTT hücre canlılığı kiti kullanarak belirlendi. Kontrol, TGF β , ALA ve ALA+TGF β olmak üzere dört farklı grup oluşturuldu, EMT belirteçleri olan E-kadherin, vimentin, Snail, Slug, Twist ve Zeb, RT-PCR ile gen düzeyinde ölçüldü, immünsitokimya yöntemiyle de bu belirteçler protein düzeyinde ölçülerek çalışmamız desteklendi. Yine her grup için ayrı ayrı migrasyon ve proliferasyonu göstermek için wound healing, invazyon kapasitesini değerlendirmek için matrigel invazyon testi, kolonileşmeyi göstermek için kolonizasyon deneyi yapıldı. Deney sonuçlarına göre TGF β dozu 100/ng/ml ve 72 saat olarak, ALA IC 50 dozu 48. saat ve 219,033 μ M olarak belirlendi. RT-PCR sonuçlarına göre TGF- β grubunda EMT belirteçleri EMT ile uyumlu olup, ALA verilen gruplarda EMT'yi inhibe ettiği gösterildi. Bu belirteçleri protein düzeyinde göstermek için yapılan immünsitokimya sonuçları RT-PCR sonuçlarıyla uyumlu bulundu. Yine yapılan wound healing ve invazyon deneylerine

göre TGF β grubunda proliferasyon ve invazyon artarken, ALA uygulanan ve kombine gruplarda azaldı. Tüm bu bulgular ışığında TGF β 1 uygulayarak EMT modeli kurduğumuz ve daha invaziv ve proliferatif hale getirdiğimiz SKOV-3 hücrelerinde, ALA uygulayarak proliferasyon, migrasyon ve invazyonun engellendiğini hem gen düzeyinde hem de morfolojik olarak gösterdik. Bu çalışmanın sonuçları, ALA'nın over kanserinin proliferasyon, invazyon ve metastazının önlenmesi için umut verici bir terapötik ajan olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: metastaz, EMT transkripsiyonel faktörler, E-kadherin, vimentin, TGF β 1

SUMMARY

The effect on epithelial mesenchymal transition and migration of applying alpha lipoic acid in SKOV-3 ovarian adenocarcinoma cell line

Dr. Elif ÖNDER

Ovarian cancer is the fifth leading cause of cancer-related death in women. Because of there is no effective screening method and its symptoms are unclear, early diagnosis of epithelial over cancer (EOC) is difficult. Therefore, patients are usually diagnosed with advanced tumor metastases. EOC cells primarily metastasize via the transcoelomic pathway. It spreads from primary tumor by undergoing epithelial mesenchymal transition (EMT). It has been suggested that alpha lipoic acid (ALA), a natural antioxidant lipophilic compound, reduces the oxidative stress by causing apoptosis and inhibition of proliferation of cell in cancer cells. The aim of our study was to establish a transforming growth factor β (TGF β) dependent EMT model in the SKOV-3 ovarian adenocarcinoma cell line which is from the epithelial subtype of ovarian cancer and to investigate the effects of applying IC 50 dose of alpha lipoic acid on epithelial mesenchymal transcytosis and ovarian cancer migration. In our study for establish an EMT model in SKOV-3 cells, we determined the TGF β 1 dose by RT-PCR and used XTT cell viability kit to determine IC 50 dose of alpha lipoic acid. We created four different groups that are control, TGF β , ALA and ALA+TGF β and analyzed the EMT markers which are E-cadherin, vimentin, Snail, Slug, Twist and Zeb, at the gene level by RT-PCR. After that we determined these markers at the protein level with the immunocytochemistry method. The migration capacities of SKOV-3 cell were assessed by wound healing assey. We used matrigel invasion capacity test to show invasion and a colonization test to show colonization for each group. According to the test results, the TGF β 1 dose was determined as 100/ng/ml and 72 hours, and the ALA IC 50 dose as 48 hours and 219,033 μ M. According to the RT-PCR results, EMT markers in the TGF- β group were compatible with EMT, and it was shown to inhibit EMT in the groups given ALA. The results of immunocytochemistry to show these markers at the protein level are compatible with RT-PCR results. Again, according to wound healing, colonization and invasion

experiments, proliferation and invasion increased in TGF β group, but decreased in ALA and combined groups. According to all these findings, we have shown that proliferation, migration and invasion are inhibited both at the gene level and morphologically by applying ALA in SKOV-3 cells, which we established an EMT model and made more invasive and proliferative by applying TGF β 1. These results indicate that ALA suppresses the metastasis of ovarian cancer cells by regulating EMT, implying that ALA might be a potential therapeutic agent for the treatment of ovarian cancer.

Keywords: metastas, EMT transcriptional factor, E-cadherin, vimentin, TGF β 1

GİRİŞ

Kadınlarda kansere bağılı ölümlerin beşinci önde gelen nedeni over kanseridir [1, 2]. Over kanseri, tümörün ortaya çıktığı hücre kökenine göre; epitel, germ hücreli ve stromal olmak üzere üçe ayrılır. Son derece nadir görülen küçük hücreli karsinom ve sarkomlar gibi birkaç yumurtalık kanseri türü de bildirilmiştir [1, 3]. Over kanseri vakalarının % 85'inden fazlasını oluşturan EOK, over kanseri ile ilişkili ölümlerin çoğundan sorumludur [1, 4]. EOK'yi, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), şu tiplere ayırır: seröz, müsinöz, endometrioid, berrak hücreli, geçiş hücreli, mix tip, farklılaşmamış ve sınıflandırılmamış [5]. Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) tarafından, yapısal özelliklerine göre, EOK'yi ayrıca 3 sınıfa ayrılmıştır: seröz EOK'de FIGO grade 1 düşük dereceli olarak tanımlanırken, FIGO grade 2 ve 3 yüksek dereceli olarak birleştirilmiştir [6]. Histolojik alt tipler ve gradeler ile sınıflandırma prognostik önem taşır [5]. Grade 1'de, tümör overler veya fallop tüplerinde sınırlıdır, grade 2'de tümör pelvise kadar genişlemiştir, grade 3'de tümör pelvis dışı olan periton ve/veya retroperitoneal lenf nodlarına uzanmıştır ve grade 4 periton dışı uzak organ metastazı ile karakterizedir [7]. Endometrial ve servikal kanserlere göre over kanserinin morbiditesi daha düşük olmasına rağmen, jinekolojik kanserler arasında en yüksek ölüm oranına sahiptir [2]. Beş yıllık sağkalım oranı EOK'nin % 45'in altındadır [8] ve ileri evreli hastaların % 80'inde nüks ve kötü prognoz görülür [9]. Etkili bir tarama yöntemi olmadığından ve semptomları belirsiz olduğundan, EOK'nin erken tespiti zordur. Bu yüzden, genellikle hastalar ileri evrede tümör metastazı mevcutken teşhis edilir [9].

Çok aşamalı ve karışık bir süreç olan metastaz, kanser hücrelerinin ilk tümörlerden yayılarak vücudun farklı bölgelerinde yeni tümörler oluşturmasıdır. Bu süreç, özel bir gen dizisi ve sinyal yolları tarafından düzenlenir. Başlıca transçöломik yol vasıtasıyla metastaz yapan EOK hücreleri, EMT vasıtasıyla primer EOK tümöründen yayılır [10] ve periton boşluğu içindeki asidik sıvıda sferoid şeklinde serbestçe yüzer. Metastatik hücreler daha sonra mezotelyuma saldırır veya daha derinden peritoneal organları istila eder [11]. Ek olarak, metastatik over kanseri hücreleri, kan veya lenf damarlarından geçebilir ve hematojen ve lenfatik metastazda yeni tümörler oluşturmak için damar dışına sızabilir [11, 12]. Tüm over kanseri ölümlerinin yaklaşık % 90'ını EOK'nin ikincil bölgelere metastazı oluşturmaktadır

[11]. Bu nedenle, EOK metastazının altında yatan mekanizmaların anlaşılması, daha etkili terapötik araçların geliştirilmesini sağlayabilir.

EMT, geri dönüşümlü, epitel hücrelerinin apikal-bazal polaritesini ve hücre-hücre yapışmasını kaybettiği ve migrasyon kapasitesinin arttığı daha iç şeklindeki mezenkimal hücreler haline geldiği bir süreçtir. Bu süreç boyunca, E-kaderin gibi adherens bağlantılarının önemli bir bileşeni ve desmozomların stabilizasyonu için önemli olan okludinler, klaudinler, Epcam, $\alpha 6\beta 4$ integrin ve farklı sitokeratinler baskılanır. Aynı anda, vimentin, fibronektin, nöral kaderin (N-kaderin), $\beta 1$ ve $\beta 3$ integrinler ve matris metalloproteinazlar (MMP'ler) artış yönünde düzenlenir [7, 13]. Bu mezenkimal benzeri hücreler, mezenkimal epitelyal geçiş (MET) adı verilen bir süreç ile tekrar epitel durumuna dönebilirler [13]. Ayrıca, son kanıtlar kanser hücrelerinin hem epitelyal hem de mezenkimal hücre özelliğinde bir ara form olan "kısmi EMT" durumunda olabileceğini göstermektedir [14-16].

EMT'nin meydana geldiği duruma bağlı olarak, üç tür EMT tanımlanır. Embriyogenez sırasında önemli olan Tip I, yara iyileşmesi ve fibroz sırasında gözlenen tip II ve kanserin progresyonu ile ilişkili olan tip III [17]. Tip III EMT, kanser hücrelerinin kemo ve immünoterapiye direncini artırarak tümör başlatma ve metastaz yapma kapasitesini yönlendirir [13]. Ayrıca, kanser hücrelerini anoikise karşı daha dirençli hale getirir [18].

EMT'yle, TGF β , Wnt, Notch ve Hedgehog gibi birkaç anahtar sinyal yolağının ilişkili olduğu bilinmektedir. TGF β yolu, TGF β süper ailesinin üyeleri olan TGF β ler, Nodal ve kemik morfogenetik proteinler (BMP'ler) dahil aynı kökenli ligandların, TGF β reseptörlerine bağlanmasıyla etkinleştirilebilir. TGF β sinyali, TGF β reseptörlerinin uyarılması üzerine SMAD'a bağımlı ve SMAD'dan bağımsız iki yola ayrılır. SMAD bağımlı yolda, TGF β reseptörünün aktivasyonu üzerinden SMAD kompleksi sayesinde vimentin gibi mezenkimal genlerin ekspresyonu uyarılabilir. Bu sinyal yolakları devamında EMT transkripsiyon faktörlerinin (EMT-TF) aktivasyonuna yol açar. EMT'nin ana düzenleyicileri olarak çeşitli transkripsiyon faktörleri tanımlanmıştır. Bunlar; Snail faktörleri (SNAI1 aynı zamanda Snail olarak bilinir, SNAI2 ise aynı zamanda Slug olarak bilinir), bHLH faktörleri (E12 ve E47, Twist1 ve Twist2) ve ZEB faktörleri (Zeb1 ve Zeb2)'dir [19]. Aynı zamanda, Snail apikal-bazal polariteyi ve sıkı bağlantı oluşumunu düzenleyen genlerin

ekspresyonunu baskılamada iyi bilinen bir göreve sahiptir. Ek olarak, mezenkimal genleri direk olarak uyarmak için Snail, bir transkripsiyon aktivatörü olarak işlev görebilir [20].

Basic helix-loop-helix (bHLH) transkripsiyon ailesine ait Twist1 ve Twist2, geniş bir gelişimsel ve patolojik süreçler dizisinin ana düzenleyicileri olarak işlev görürler. Twist, epitel genlerinden E-kaderini azaltırken, N-kaderin ve vimentin gibi mezenkimal genlerin ekspresyonunu aktive eder. Zeb1 ve Zeb2, Zeb transkripsiyon faktör ailesinin iki üyesidir, doğrudan E-box elemanlarına bağlanır ve E- kadherin ekspresyonunu baskılar. Zeb proteinleri E-kadherine ek olarak, sıkı bağlantı genlerinin ve hücre polarite komponentlerinin ekspresyonunu doğrudan azaltarak EMT'yi harekete geçirir [20].

Doğal bir antioksidan lipofilik bileşik olan ALA, insanlar dahil bitkiler ve hayvanlar tarafından küçük miktarlarda sentezlenir. Trikarboksilik asit döngüsünde (TCA) yer alan mitokondriyal enzimler için önemli bir kofaktördür (örn. Piruvat dehidrojenaz (PDH), süksinat dehidrojenaz (SDH). ALA ayrıca, antioksidan ve redoks düzenleyici özelliklere sahiptir [21].

Alfa lipoik asit (ALA), tiyotik asit olarak da bilinir, doğal olarak oluşur ve yapısında kükürt içeren, kısa zincirli bir yağ asididir. Diabetes mellitus, hipertansiyon, Alzheimer hastalığı, Down sendromu, bilişsel işlev bozukluğu gibi birçok hastalıkta ve meme kanseri dahil olmak üzere bazı kanser türlerinin tedavisinde kullanılmıştır. ALA'nın terapötik bir ajan ve besin takviyesi gibi alternatif bir ilaç olarak kullanımı hızla artmaktadır. ALA'nın antioksidan etkisi, endojen antioksidanları yenileme ve reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleme kabiliyeti nedeniyle hücresel büyümede önemli bir rol oynar. ALA, serbest radikal temizleyicisi olarak ve birçok oksidatif stres ile inflamasyonu azaltması için dihidrolipoik aside indirgenmiştir. ALA'nın kanserli hücreler tarafından biriktirilen oksidatif stresi, kanser hücrelerinde apoptoza ve hücre proliferasyon inhibisyonuna yol açarak azalttığı öne sürülmüştür [22]. Çeşitli kanserlerde ALA'nın antikanser etkileri bildirilmiştir. ALA, esas olarak antioksidan ve serbest radikal temizleme aktivitesi aracılığıyla normal doku ve hücreleri radyasyona karşı koruyucu olarak rapor edilmiştir [23].

Çalışmamızda over kanserinin en sık görülen tipi olan epitelyal alt tipinden bir hücre hattı olan SKOV-3 ovarian adenokarsinoma hücre hattında, TGF- β 1 Bağımlı EMT nin kurulması sonrası alfa lipoik asit antioksidan bileşiminin farklı dozlar şeklinde uygulanmasının 2D (monolayer) hücre kültürleri yapılarak lipoik asitin epitelyal mezenkimal transitoz ve over kanseri migrasyonununa etkisi ve bu etki altında yatan mekanizmalar analiz edilecektir.

Çalışmamızda alfa lipoik asitin EMT'yi düzenleyerek insan over adenokarsinom hücre dizisi SKOV-3'te migrasyon ve invazyonu baskılayıp baskılamadığını ve bunun altında yatan mekanizmaları araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

OVER

Dişi gonad olan over, intraperitoneal yerleşimli bir çift endokrin organdır ve tipik olarak karnın sol ve sağ alt kadrantlarında bulunur. Hem hormon üretiminde hem de üremede temel rol oynar [24]. Granüloza ve teka hücreleri overde bulunur ve östrojen ve progesteron dahil olmak üzere çok sayıda hormon salgılar [25].

Overlerde; over kanseri, over torsiyonları, ektopik gebelikler, ovarian apseler, hormonal dengesizlikler veya kistler olmak üzere çok sayıda patolojik süreç meydana gelebilir. Bu patolojiler, etkilenenlerin sağlığı üzerinde zararlı etkilere sahip olabilir [26].

Over Anatomisi

Kadın üreme sisteminin temel organı olan overler, erkeklerde testis ile homologdur. Yaklaşık 3 x 1,5 x 1 cm boyutlarında oval şekilli gonadal yapılardır. Aşağı ve öne doğru uzanan çift halinde bulunan overler pelvis içinde ve uterusun hemen yanındadır. Ovarian fossa içinde, üreterlerin önünde ve external iliak damarların arkasında bulunurlar [27]. Zigotu implantasyon için uterus boşluğuna taşıma işlevi gören fallop tüpleri yoluyla uterusu bağlanır [28]. Hiç doğum yapmamış kadınlarda, pembemsi ve pürüzsüz bir dış yüzeye sahipken, multiparlarda daha grimsi renkte ve tekrarlayan yumurtlamalardan dolayı buruşuk yüzeysidir. Overler, kan damarlarının, sinirlerin ve lenfatiklerin geçtiği mezovaryan (ön) sınır dışında tamamen peritonla kaplıdır. Overlerin önünde ligamentum umbilikale mediana bulunur. Mezovaryum olarak da adlandırılan uterusun broad ligamentinin arka uzantısı olan infundibulopelvik veya suspensor ligament, overlerin yukarısında yer alır. Over, ligamentum suspensorium ovarii ile vücut duvarına bağlanır. Overde; ovarian arter ve veni, ayrıca sempatik ve parasempatik pleksusları taşıyan ligamentum suspensorium ovarii ile, gubernakulum kalıntısı olan ve herhangi bir damar içermeyen ligamentum ovarii proprium olmak üzere iki bağ vardır [26]. Binlerce folikül içeren overde her ay bir folikül, ovulasyon sırasında oosit atmak için dominant folikül (Graaf folikülü) haline gelir [29]. Ultrasonda, over stromaya

karşılık gelen ekoik bir merkezi alana ve kortekse karşılık gelen bir periferik bölgeye sahiptir [27].

Abdominal aortun bir dalı olan ovarian arter, ligamentum suspensorium ovarii yoluyla overe ulaşır. Overler pelvik organ olmalarına rağmen, yerlerinin kökenini gösteren abdominal aortadan beslenirler. Ovarian venler overden kanı alırlar; sağ ovarian ven doğrudan vena kava inferiyora (IVC), sol ovarian ven ise sol vena renalise dökülür. Over ve fallop tüpündeki lenf damarları doğrudan paraaortik düğümlere dökülür [28]. Overin sempatik innervasyonun iki kaynağı vardır; biri ligamentum suspensorium ovarii yoluyla overe ulaşan, aynı zamanda uterusun fundusunu da innerve eden ve renal pleksustan köken alan overian pleksustur. İkinci sempatik innervasyon kaynağı ise ovarian ligament ile taşınan nervus ovarica superiorudur [30]. Parasempatik innervasyon, pelvik splanknik sinirlerden kaynaklanan uterin (pelvik) pleksustandır [26].

Over Embriyolojisi

Over ara mezodermden köken alır. Ovaryum, merkezi bölge olan medulla ve yüzeyin altında olan germinal epitelyum tabakası olmak üzere iki tabakaya farklılaşır. Yolk sac'ın dorsal endodermi, daha sonra olgunlaşmamış oositleri oluşturacak olan hücreleri üretir ve bu hücreler arka bağırsağa göç eder ve daha sonra da gelişimin 4. haftasında gonad sırtına göç eder. Bu göç sırasında mitozla olgunlaşmaya ve çoğalmaya devam eden hücreler, gonadlara ulaştıklarında oogonia olarak kabul edilirler. Oogonia hücreleri, granüloza hücrelerinden oluşacak olan bir bağ dokusu tabakası içinde olgunlaşmaya devam ederler. Bu oluşumun hepsi birlikte, ilkel over foliküllerinin temelini oluşturur [31].

Olgunlaşan overler zamanla aşağı inerler, ancak erkek gonadı olan testislerin aksine, iniş karında sona erer. Overler, bir mezoderm artığı olan gubernakulumla bağlanır. Gubernakulumun diğer yönü ise uterusu bağlanarak overlerin aşağıya inmesini engeller. Ligamentum ovarii proprium gubernakulum kalıntısından kaynaklanır [32].

Over Histolojisi

Ovaryum; korteks ve medulla olmak üzere iki ayrı bölgeden oluşur. Overin merkezi bölgesinde bulunan medulla ya da medullar bölge, nispeten büyük kan ve lenf damarları ayrıca sinirler içeren gevşek bağ dokusundan oluşmaktadır. Medullayı çevreleyen ve daha periferde bulunan bölgenin adı ise korteks ya da kortikal bölgedir. Medulla ile korteks arasındaki sınır belirsiz olup korteks, zengin selüler bağ dokusuna gömülü olan ovaryum foliküllerinden oluşur. Bu foliküllerin çevresindeki stromada dağınık yerleşimli düz kas lifleri bulunur.

Ovaryumun yüzeyi, tek katlı kübik ve yer yer yassı epitel ile döşelidir. Bu epitel germinal epitel olarak bilinir ve ovaryumu saran mezotelyum ile devamlılık gösterir. Germinal epitel ile korteksin arasında tunika albuginea denen sıkı bağ dokusu bulunur. Korteksin stromasında her biri tek oosit içeren çeşitli boyut ve yapıdaki over folikülleri bulunur. Oositin gelişim evresi folikül boyutundan anlaşılabilir.

Gelişim evresine göre ovaryumdaki foliküller primordial, primer, sekonder, olgun ya da graff folikül olarak tanımlanır. Primordial folikül; gelişimin en erken evresinde, oositin çapı 30 mikron ve çevresi tek sıralı yassı folikül hücreleri ile çevrili olan foliküldür. Fetal gelişimin 3. ayında oluşmaya başlar ve gelişimleri gonadotropinden bağımsızdır. Yetişkin overinde primordial foliküller, korteks stromasında tunika albugineanın hemen altında bulunurlar. Folikül hücreleri dış yüzeyde bazal lamina üzerine oturmuştur. Oosit ve folikül hücreleri bu aşamada birbirleriyle sıkıca temas halindedir.

Primer folikülde oosit çapı artar, oositi saran folikül hücreleri yassıdan kübik hale dönüşür. Oositten bu evrede özel proteinler salgılanır ve folikül ile oosit arasında zona pellusida denilen örtü oluşur. Zona pellusida oosit ile folikül hücreleri arasında bulunur ve asidofilik ve PAS reaktifi ile koyu boyanan bir tabaka olarak görünür. Zona pellusida ilk defa oosit çapı 50-80 mikron olduğunda ve folikül hücreleri kübik ya da prizmatikliğe dönüştüğünde görülür. Zamanla folikül hücreleri mitozla çoğalır, prizmatikleşip çok katlı hale gelir ve artık adları granuloza hücresi olur. Bazal lamina folikül ile bağ dokusu hücreleri arasındadır ve artık bağ dokusu da farklılaşarak teka interna ve teka externa olmak üzere iki tabakaya ayrılır. Teka interna; vasküleritesi yüksek, kübik, çok sayıda lüteinizan hormon (LH) reseptörüne

sahip salgı hücrelerinden oluşmuştur. LH uyarımına bağlı östrojen prekürsörü olan androjenleri sentezler ve salgırlar. Teka externa, en dışta yer alan temel olarak düz kas hücreleri ve kollojen fiberlerinden oluşun bağ dokusu tabakasıdır.

Sekonder folikül, granüloza hücre sayısı tabakası 6-12'ye ulaştığında, granüloza hücrelerinin arasında sıvı dolu kaviteler oluşmaya başlar ve bu boşluğa antrum denir. Oosit apı 125 mikron boyutundadır ve oosit bu aşamadan sonra granüloza hücreleri tarafından salınan oosit maturasyon inhibitörü (OMI) ile büyümesi durdurulur. Bu foliküle sekonder ya da antral folikül denir.

Graaf ya da olgun folikül; çapı 10 mm veya daha fazla olan, antrumun iyice genişlediği foliküldür. Bu folikülden oosit periferite itilmiş olup, granüloza hücrelerinin oosit ile ilişkili olduğu bölgede kumulus ooforus adı verilen bir tümsek oluşur. Oositin çevresini saran ve ovulasyonda birlikte atılan kumulus ooforus hücrelerine korona radiata denilir. Graf folikülünde teka tabakaları daha belirgin hale gelmiştir.

Ovaryumun gamet ve steroid hormon üretimi olmak üzere iki temel fonksiyonu vardır. Dişilerde gamet üretimine oogeneze, gelişmekte olan gametlere oosit, matür olgun gametlere ovum denir. Steroidogeneze; iki temel steroid hormon olan östrojen ve progesteron overden salgılanır. Östrojen iç ve dış genital organların büyüyüp olgunlaşmasını, duktal ve stromal büyüymeyi ve adipoz dokusunu artırarak meme gelişimini sağlar. Progestojenler internal genital organları, özellikle de endometriumu gebeliğe hazırlar, memede lobüler proliferasyonu artırarak memeyi laktasyon için hazır hale getirirler [33].

OVER KANSERLERİ

Dünya'nın birçok yerinde kanser, en sık ölüm nedeni ve istenilen yaşam süresine ulaşmak için önümüze çıkan en sık engeldir [34, 35]. Over kanseri, serviks ve rahim kanserinden sonra üçüncü en yaygın jinekolojik kanserdir [35]. Ayrıca prognozu çok kötü ve en yüksek ölüm oranına sahip kanser tipidir [36]. Meme kanserine göre over kanseri daha düşük prevalansa sahip olmasına rağmen, üç kat daha ölümcüldür [37] ve bu kanserden ölüm oranının 2040 yılına kadar önemli ölçüde artacağı düşünülüyor [35]. Tümörün asemptomatik ve sinsi büyümesi, semptomların gecikmeli başlangıcı ve uygun taramanın yapılmamasından tümörün

ileri aşamalarda teşhisi, over kanserinin ölüm oranının yüksek olmasına neden olur. Bu yüzden bu kansere sessiz katil ismi de verilir [37-39].

Epidemiyoloji

Dünya genelinde, nüfus artışı ve artan kanser risk faktörleri, azalmış gebelik ve emzirme süresi, aynı zamanda tüp ligasyonu, kanser insidansını da artırmıştır [35, 40, 41]. Over kanseri (OK), her yıl tahmini 239.000 yeni vaka ve 152.000 ölüme yol açmaktadır [42]. Doğu ve Orta Avrupa'da (sırasıyla 100.000'de 11,4 ve 100.000'de 6,0) en yüksek oranlar görülmektedir. Çin nispeten düşük bir insidans oranına sahip olmasına rağmen (100.000'de 4,1) geniş nüfusa vurduğumuzda 2015'te tahminen 52.100 yeni vaka ve 22.500 hasta ölümü anlamına gelir [43]. Karşılaştığımızda, aynı yıl içinde 21.290 vaka ve 14.180 ölümün ABD'de meydana geleceği tahmin edilmektedir [44].

Yaşam boyu bir kadının OK'ye yakalanma riski 75'te 1 ve bu hastalıktan ölme riski 100'de 1'dir [45]. Hastalık, tipik olarak 5 yıllık sağkalım oranı % 29 olduğunda geç evrededir. Birkaç vaka (% 15), 5 yıllık sağkalım oranı % 92 [45] olan lokalize tümör (evre 1) tanısı alır. Dünya genelinde çarpıcı bir şekilde, 5 yıllık genel göreceli sağkalım oranı % 30-40 arasında değişmektedir ve 1995'ten bu yana çok az artmıştır (% 2-% 4) [46].

Kadınlar arasında en yaygın yedinci kanser over kanseri olup, koruyucu faktörlerin yokluğunda yaşam boyu over kanseri olma riski yaklaşık % 2,7'dir [47]. Globocan'a göre, 2018 yılı over kanseri vakası 295.414 olup, kadınlarda bu sayı tüm kanser vakalarının % 3,4'ünü oluşturmaktadır [48]. Over kanseri için The Age Standardized Rate (ASR) oranı 2018 yılında 6,6 olacağı tahmin edilmektedir [48]. Epitelyal over kanseri görülme sıklığı yaş ve ırka göre değişir [49].

Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin % 4,4'ünü oluşturan over kanseri nedeniyle, 2018 yılında 184.799 ölüm meydana geldi. Globocan 2018'e göre, over kanseri mortalitesinin ASR'si 3,9'dur. İnsan gelişim indeksi (İGE) yüksek olan ülkeler arasında kanser insidansı daha yüksek olmasına rağmen, ölüm oranı tersine dönme eğilimindedir [48]. En yüksek ölüm oranı Asya'da, Hindistan'da görülürken, Avrupa ve Kuzey Amerika'da son yıllarda özellikle gençler arasında ölüm oranı

azalmıştır [50]. Afrikalı kadınlar arasında mortalite-insidans oranı uygun tedaviye erişim imkanları kısıtlı olduğundan yüksektir [51].

Risk Faktörleri

Demografik faktör

Yaşa bağlı bir hastalık olan epitelyal over kanseri, esas olarak menopoz sonrası bir hastalık olarak kabul edilir [51, 52]. 65 yaş üstü kadınlarda bu kanserin görülme sıklığı daha belirgindir [53]. Tanı anındaki ortalama yaş önceki çalışmalara göre, 50-79'dur [52]. İleri yaşla birlikte hastalıkta daha fazla ilerleme ve yüksek mortalite görülür [52, 54].

Üremeye ilgili faktörler

1. Menstrüel siklus

Araştırmacılar çok sayıda çalışmada, ovulasyon siklusu ile over kanseri riski arasında ilişki olduğunu belirtmişlerdir [55]. Bir vaka-kontrol çalışması sonucu, 8,7 yıldır ovulasyon olmayan kadınlarda over kanseri riskinin 4 kat azaldığını göstermiştir [56]. Bu bulgular “aralıksız yumurtlama” teorisini desteklemektedir. Bu teoriye göre sürekli ovulasyon, over kanseri oluşumuna overin epiteline zarar vererek neden olabilir; bu nedenle ovulasyon azalmasına neden olan herhangi bir faktör over kanserine karşı koruyucu bir etkiye sahip olabilir [57].

2. Menarş yaşı ve menopoz

Bazı çalışmalar erken menarş ile over kanseri riski arasında bir ilişki olduğunu gösterse de [58], diğer araştırmacılar over kanseri riski üzerinde menarş yaşı ve menopozun hiçbir etkisi olmadığını bildirdiler [59].

3. Parite

Birkaç çalışmanın sonuçları, gebeliğin yumurtalık kanserine karşı koruyucu bir rolü olduğunu göstermektedir [55, 60].

4. Doğum yaşı

Bir vaka-kontrol çalışmasında gebelik sayısına bağlı olarak, gebelikte ileri yaş ile over kanseri riskinde azalma arasında bir ilişkili olduğunu göstermiştir [61]. Adami ve arkadaşları, ilk doğum yaşındaki her 5 yıllık artış için epitelyal, stromal, germ hücreli ve borderline over kanseri riskinin % 10'a kadar azalacağını belirtmiştir [62].

Jinekolojik faktörler

1. Pelvik inflamatuvar hastalık

Over kanserinin ortaya çıkmasıyla inflamasyon ve pelvik inflamatuvar hastalık arasındaki ilişki uzmanlar arasında tartışmalıdır. Ness ve diğerleri tarafından yapılan bir vaka kontrol çalışması, over kanseri başlangıcına inflamasyonun katkıda bulunduğu hipotezini destekler niteliktedir [63]. Öte yandan, Jia ve arkadaşları, overdeki inflamasyonla ilişkili olayların (örneğin hasarlanmış overin onarılması) çevre over dokusundaki kanser hücrelerinin salınmasında artışa neden olduğu sonucuna varmıştır [64]. Böylece, over kanseri riskinin artmasına, ovulasyon ve overde inflamasyon ile ilişkili diğer olayların katkıda bulunduğunu belirtmişlerdir [65]. Merritt ve ark. 2008'de yaptıkları bir vaka kontrol çalışmasında buna zıt bir görüş sunmuş olup, kronik inflamasyonun over kanseri gelişiminde hiçbir rolü olmadığını belirtmişlerdir [66]. Yine bir başka çalışmada Lin ve arkadaşları, pelvik inflamatuvar hastalık ile over kanseri arasında bir bağlantı olduğunu bildirmişlerdir [67].

2. Endometriozis

Endometriozis ile over kanseri arasındaki ilişki, çeşitli mekanizmalarla birçok çalışmalarda gösterilmiştir [68]. 1925 yılında, Sampson endometriozis ve over kanseri arasında, endometriozisin maligniteye değişim teorisi temeline dayanan bir ilişki olduğunu önermiştir. Endometriozis ilişkili over kanseri oluşumunda, inflamasyon ve PTEN, CTNNB1 (β -catenin), KRAS ve ARID1A genleri ilişkilidir [69]. Endometriozise bağlı over kanseri diğer over kanseri türleriyle karşılaştırıldığında, daha genç yaşta ve daha erken evrede tespit edilir [69]. Bir kohort çalışmasında Stewart vd, endometriozisi olan nullipar kadınlarda over kanseri gelişme ihtimalinin 3 kat daha fazla olduğunu belirtmiştir [70].

3. Over kistleri

Bazı benign over kistleri, malign over tümörlerinin öncüsü olarak davranabilir. Bir vaka-kontrol çalışmasına göre, over kisti olup operasyon geçiren kadınlar arasında borderline over tümörü gelişim riski artmıştır [71]. Ek olarak, kompleks over kistleri, postmenopozal kadınlarda malignite riskini önemli ölçüde artırır [72].

4. Tüp ligasyonu

Over kanseri gelişme riski, tüp ligasyonu olan kadınlarda azalmıştır [73]. Bir kohort çalışmasında, tüp ligasyonu olan kişilerde high grade seröz karsinom riskinde % 20 azalma olduğu görülmüştür [74]. Tüp ligasyonu olan kadınlarda invazif seröz kanser (% 19), invazif müsinöz kanser (% 32), berrak hücreli kanser (% 42) ve endometrioid kanser (% 52) riski azalmıştır [75].

Hormonal faktörler

1. Kontraseptif yöntemler

Birçok çalışma sonucu, oral kontraseptif yöntemi kullanımının over kanserinin tüm histolojik türlerinin oluşum riskini azalttığını göstermektedir [76-78]. Kanada'da yapılan bir vaka kontrol çalışmasının sonucunda, hormonal doğum kontrol hap kullanan kadınlarda müsinöz tip over kanseri haricinde tüm histolojik epitel over kanseri tiplerinde önemli bir azalma olduğunu göstermiştir [79].

2. Hormon replasman tedavisi (HRT)

Yapılan bir vaka-kontrol çalışması menopozdan sonra kullanılan kombine östrojen-progesteron tedavisinin over kanseri riskini artırmadığını gösterdi [80]. Hempling ve arkadaşları, menopoz sonrası hormon tedavisi alan kadınlarda HRT'nin uzun süreli kullanımda bile over kanseri ile ilişkili olmadığını belirtmişlerdir [81]. Ancak, Glud vd oral hormon tedavisinin önceden histerektomi geçirmeyen kişilerde over kanseri riskini artırdığını belirtti [82]. Araştırmacılar, 10 yıl veya daha uzun süre östrojenik yöntemlerin kullanılmasının over kanseri riskini artırdığına inanıyor [83]. Rossing ve arkadaşları, bir vaka kontrol çalışmasında, kombine hormon tedavisinin progesteron bileşeninin over kanseri riskini azalttığını belirtti [80].

3. İnfertilite tedavileri

Nulliparitenin kendisi ve infertilite over kanserinin risk faktörleri olduğu için infertilite tedavisi ile over kanseri arasındaki ilişkiyi araştırmak zordur [84]. Aralıksız ovulasyon teorisine göre sürekli ovulasyon over epiteline zarar vererek over kanserinin gelişimine katkıda bulunabilir ve dolayısıyla ovulasyonu azaltan herhangi bir faktörün over kanserine karşı koruyucu bir etkisi olabileceğini ifade etmektedir [57]. Over kanseri riskinde artış ile klomifen sitrat ve gonadotropin kullanımı arasında bir ilişki olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [85].Yapılan bir kohort çalışmasında, klomifen sitrata maruz kalmanın over kanseri riskini artırdığını ve nullipar kadınlar arasında klomifen sitrat dozunun artmasının over kanseri riskini artırdığını gösterdi [85]. Bir başka vaka-kontrol çalışmasında, özellikle hMG olmak üzere ovulasyonu tetikleyen ilaç kullanımının epitelyal over tümörü riskini artırdığını göstermiştir [86].

Genetik faktörler

1. Aile öyküsü

Ailede meme veya over kanseri öyküsü, over kanseri için en önemli risk faktörüdür [49]. Kişisel meme kanseri öyküsü over kanseri riskini artırır [87]. Yapılan bir vaka kontrol çalışmasında, annelerinde veya kız kardeşlerinde meme, uterus veya over kanseri aile hikayesi olan kadınlarda, over kanseri riski artmıştır. (P <0.001) [88].

2. BRCA mutasyonları

Over kanserlerinin beşte birinden fazlası tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlardan [89] ve kalıtsal over tümörlerinin % 65-85'i BRCA genlerindeki germ hattı mutasyonlarından kaynaklanmaktadır [90]. Over kanseri riski, BRCA1 ve BRCA2 mutasyonu taşıyıcılarında 40 yaşında % 3'ten az olmasına rağmen, 50 yaşında bu risk % 10'a yükselir [91]. Meme kanseri olan kişilerde, 10 yıl içinde over kanseri gelişme riski % 12,7, BRCA1 ve BRCA2 mutasyonu taşıyıcılarında % 6,8'dir [91]. 80 yaşına kadar katlanmış over kanseri riski BRCA1 mutasyon taşıyıcılarında % 49 ve BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında % 21 dir [92].

3. Lynch sendromu

Lynch sendromu, otozomal dominant geçişli ve tüm kolorektal kanserlerin % 1-3'ünden sorumlu olan kanser yatkınlığı sendromudur [93]. Lynch sendromu kalıtsal over kanseri vakalarının % 10-15'inden sorumlu olup, ailesinde Lynch sendromu olan bireylerde bu kanserin yaşam boyu görülme riski % 6-8'dir [94]. Lynch sendromuyla ilişkili over kanserlerinin çoğu müsinöz değildir ve bunların % 82-84'ü evre I veya evre II'dir [95]. Lynch, dört uyuşmazlık onarım geninden (MHL1, MSH2, MSH6 ve PMS2) birinde olan kalıtsal mutasyon sonucu oluşur ve MSH2 ve MLH1 bu bireylerdeki en yaygın mutasyonlardır [91, 96]. Bu kişilerde en sık görülen over kanseri türleri, endometrioid ve berrak hücreli kanserlerdir [94].

Yaşam tarzı faktörleri

1. Beslenme ve diyet

Yapılan bir vaka-kontrol çalışmasına göre, günlük balık alımı ile over kanseri riski arasında pozitif bir korelasyon varken, günlük süt alımı için negatif bir korelasyon vardır [88]. Başka bir vaka kontrol çalışmasında, over kanseri riskinin daha yüksek kolesterol alımıyla ilişkili olduğunu ve bu riskin sebze, vitamin, beta-karoten ve B vitamin kompleksi takviyesiyle azaldığı gösterilmiştir [97]. Ong ve arkadaşları, plazmada artan D vitamini konsantrasyonunun over kanseri riskini azaltabileceğini ortaya koymuşlardır [98]. Bu risk azalması, kalsiyum ve laktoz tüketimi durumunda da görülmektedir [94].

2. Obezite ve fiziksel aktivite

Yapılan bir çalışmaya göre, obezite over kanserinde hayatta kalma oranını azaltıp, hastalığa bağlı ölüm riskini arttırmaktadır. Periferik dokularda androjen dönüşümünü gösteren santral obezite, artmış over kanseri riskiyle ilişkilidir [99]. Rodriguez ve arkadaşları postmenopozal dönemde hiç östrojen tedavisi kullanmamış obez insanlar arasında over kanseri riskinde % 36 artış olduğunu ve obezite ve uzun boyluluğun over kanserinde mortaliteyi artırdığını bildirmişlerdir [100]. Anderson ve arkadaşlarının yaptıkları bir kohort çalışmasında, bel-kalça oranının artmış over kanseri riski ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Ancak Kotsopoulos ve arkadaşları

boy ve kilonun over kanser prognozu ile ilişkili olmadığını bildirmişlerdir [101]. Yine yapılan bir vaka kontrol çalışmasında araştırmacılar, fiziksel aktivitenin over kanseri riskinde azalma ile ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır [102]. Bu sonuç diğer çalışmalarla desteklenmemiştir [103].

3. Alkol, kafein ve sigara

Dünya üzerinde birçok araştırmacı, alkolün over kanseri riskini artırmadığını düşünse de [104], Goodman ve Tung'a göre alkolle over kanseri arasındaki ilişki alkol tipiyle ilişkilidir [105]. Yapılan bir vaka kontrol çalışmasında, kafein ve kahve tüketiminin menopoz öncesi kadınlarda over kanseri riskini artırabileceğini göstermiştir [106]. Birçok araştırmacının, menopoz öncesi ve sonrasında sigara kullanımıyla over kanseri riski arasında bir ilişkinin olmadığını inanmasına rağmen [107], Jordan ve arkadaşları 20 yıl boyunca günde bir paket sigara içimiyle benign müsinöz, borderline ve malign tümör gelişim riskinin iki katına çıktığını belirtmişlerdir [108]. Gram ve arkadaşlarının yaptığı bir kohort çalışmasında, sigara içme süresi ve miktarının borderline tümör riskini artırdığını göstermişlerdir. Kim ve arkadaşları sigara içmenin over kanserine bağlı ölümleri %25 artırdığını göstermişlerdir.

Diğer

1. Emzirme

Yapılan araştırmalara göre, emzirme süresi, anne sütüyle beslenen çocukların sayısı ve over kanseri riski arasında ters bir ilişki vardır. Bir vaka kontrol çalışmasının sonucu, laktasyonun over kanseri riskini % 22 azalttığını ve bu riskin daha uzun laktasyon süresiyle azaldığını gösterdi. Bu çalışmada, en fazla risk azalması endometrioid ve berrak hücreli over kanserleriyle ilişkiliydi. Tung ve arkadaşları da bu konuda hemfikir olup emzirme süresinin müsinöz olmayan tümör riskini azalttığını belirttiler. Ancak, bu çalışmada müsinöz tümörlere karşı böyle bir koruyucu etki görülmemiştir.

2. Sosyo-ekonomik durum

Over kanserinin görülme sıklığı ve sağkalım oranını belirleyen önemli faktörlerden biri sosyo- ekonomik durumdur. Sağlık hizmetlerine zamanında erişim, over kanseri semptomları hakkında hasta farkındalığının artması, semptomlara yerinde ve zamanında yanıt, hastanın yaşam tarzı ve altta yatan hastalıklar, sosyoekonomik durum ile over kanseri arasındaki ilişkiyi destekler. Bir vaka-kontrol çalışmasına göre, eğitim düzeyi ile over kanseri riski arasında ters bir ilişki vardır [109].

Tablo 1. Over Kanseri Risk Faktörleri [110]

Yüksek risk	Düşük risk
Geç yaşta çocuk doğurma	18 ay veya daha uzun süre emzirme
Erken menarş, Geç menopoz	Geç menarş, Erken menopoz
Endometriozis	Multiparite (her ek gebelikte risk azalır)
Beş yıldan uzun süredir östrojen replasman tedavisi	Histerektomi*, Tüp ligasyonu*
Genetik yatkınlığı düşündüren aile öyküsü	Az yağlı diyet
Genetik sendromlar	Oral kontraseptif kullanımı
Yüksek yağlı diyet	Düşük parite

Over Kanseri Patogenezi

Over kanseri patogenezinde en yaygın öne sürülen hipotez ‘aralıksız ovulasyon teorisi’dir. Buna göre tekrarlayan ovulasyon over epitelinin tekrarlayan yıkım ve onarımına (veya hormon ve sitokinden zengin foliküler sıvıya tekrarlayan maruziyet) DNA hasarını ve karsinogenezi artırır. Böylece, bir kadın yaşamı boyunca ne kadar çok ovulasyona maruz kalırsa, over kanseri gelişme riski o kadar artar. Diğerleri gonadotropinin artan seviyelerinin inklüzyon kistleri içindeki (potansiyel olarak fallop tüpü epitelinden) epitelyal proliferasyonu ya direk olarak ya da büyük bir potansiyelle neoplastik transformasyon için steroidogenez vasıtasıyla uyardığını öne sürdüler. Bu teoriye işaret edenler tekrarlayan ovulasyonun pro-inflamatuar etkilerine ve retrograd menstrüasyon veya talk benzeri kontaminasyonun inflamatuvar etkilerine

benzer kronik inflamasyonun bir rol oynadığını öne sürdüler [9]. Over yüzey epiteli modeli, özellikle Tip I over kanseri ile ilişkili bir dizi önemli özelliği açıklayabilmesine rağmen, Tip II tümörlerin anlaşılmasında özellikle high-grade seröz karsinom (HGSC)'lerin anlaşılmasında zayıf kalır.

Piek ve arkadaşlarına göre over kanserinin gelişiminde fallop tüpü epiteli over yüzey epiteline göre daha fazla rol alır. Daha sonraki çalışmalarda erken over kanserinde, çoğu lezyonun fallop tüp epitelinde olduğunu doğruladı. SEE-FIM protokolü adı verilen bir patoloji protokolünün geliştirilmesi, BRCA mutasyon taşıyıcılarında fallop tüplerini sistematik olarak değerlendirmek için, fallop tüpünün distal ucundaki erken seröz karsinomların tekrarlanabilir şekilde taranmasını sağlamıştır. Bu protokole göre taranan vakaların çoğunda lezyon fimbriyada bulunuyordu ve seröz tubal intraepitelyal karsinom (STIC) içeriyorlardı. Bu vakaların overlerinde intraepitelyal veya invaziv seröz karsinom tanımlanmamıştır. Tıpkı HGSC'ler gibi STIC'lerde Ki67 ile immünohistokimyasal olarak boyanarak proliferatif olduğu gösterilmiş ve aynı zamanda STIC'lerin de yoğun p53 boyandığı izlenmiştir. Daha da önemlisi, STIC lezyonlarının çoğunluğunda DNA dizilimi, eşzamanlı HGSC ile aynı P53 mutasyonuna sahip olduğu gösterilmiştir [111].

Over Kanseri Sınıflaması ve Histopatolojisi

Over kanserinin epitelyal, germ hücreli ve seks-kord- stromal olmak üzere üç tipi vardır. Bunlardan epitelyal en sık görülen tip olup, son ikisi tüm over kanserleri içinde % 5'ten azdır. Epitelyal over kanserinin 4 tip histolojik subtipi olup; seröz, endometrioid, müsinöz ve berrak hücreli olarak adlandırılır. Seröz tümörler high-grade seröz karsinom ve low-grade seröz karsinom (LGSC) olarak iki şekilde sınıflandırılır. HGSC'ler epitelyal ovar kanserinin bütün tiplerinin 70% ile 80%'ini oluştururken, LGSCler %5' inden azını oluşturur. Endometrioid, müsinöz ve berrak hücreli subtipi sırasıyla %10, % 3 ve % 10'unu oluşturur.

Epitelyal Over Kanseri

Epitelyal kanserler tipik olarak over, tubal ve pelvisteki diğer epitelyal bölgelerden orjin alırlar. Epitelyal over kanserler tip I ve tip II olmak üzere iki kategoriye ayrılır. Tip II tümörler kadar öldürücü olmayan tip I tümörlere devamlı ovulasyonlar, inflamasyon ve endometriozisin sebep olduğu düşünülür [112]. Tip I

tümörler LGSC, müsinöz, endometrioid ve berrak hücreli karsinomları içerir ve öncü bir lezyondan daha yavaş büyüme eğiliminde olan tümörlerdir. Buna karşılık tip II tümörler yüksek grade ve hızlı progresiftir ve tip II tümörlerin en sık görülen tipi HGSC'dir [111]. Endometriozisin kadınlarda over kanserini özellikle epitelyal over kanserini % 5 ila % 15 arasında artırdığına inanılır. Ne yazık ki, tip II tümörler daha ölümcüldür. Bu kanserler genellikle daha geç tanı alır, BRCA VE p53 mutasyonlarıyla ilişkilidir. Bir teoriye göre bu kanserlerin orjin noktası fallop tüplerinden göçtüğüdür.

LGSC ve HGSC seröz karsinomlar

LGSC ve HGSC karşılaştırıldığında, HGSC seröz tip tümörlerin % 90'ını oluştururken LGSC'ler % 10'unu oluşturur. Bu iki tip seröz kanser moleküler profil, klinik prezentasyon ve hatta prognoz açısından farklıdır. LGSC'ler HGSC'lere göre beklenen yaşam süresinin daha uzun olmasından dolayı daha iyi prognozludur. Ek olarak, HGSC'lere kıyasla LGSC'ler daha erken yaşta teşhis edilir. LGSC'ler overden, HGSC'ler fallop tüplerinden kaynaklanma eğilimindedir ve over veya peritona yayılım gösterirler. HGSC'ler daha öldürücü bir prognozla ilişkilidir ve bu tipe sahip kadınların % 85'i ileri evrededir ve 10 yıllık ölüm oranı % 70 dir.

Endometrioid Karsinomlar

Endometrioid kanserlerin endometriozisten orjin alındığına inanılır ve sıklıkla erken evrede tanı konulur, bu histolojik tipten etkilenen kadınlar daha iyi bir prognozla sonuçlanır. Bunun bir sebebi bu histolojik tipin kemosensitif olması ve daha başarılı bir şekilde tedavi edilebilmesidir.

Berrak hücreli karsinom

Berrak hücreli karsinom, epitelyal over kanserlerinin % 10'unu oluşturur ve endometrioid kansere benzer şekilde iyi bir prognoza sahiptir. Bunun nedeni sıklıkla erken evrede tanı konulmasıdır. Eğer geç veya hastalık ilerledikten sonra tanı konulursa, prognoz endometrioid veya seröz kansere benzer olacaktır. Bunun kısmen nedeni bu tanıyla görülen komplikasyonlarla ilişkili olmasının yanı sıra hücrelerin platin bazlı kemoterapiye daha az hassas olmasıdır.

Müsinöz Karsinom

Epitelyal kanserin en az tipi olan müsinöz karsinom, sıklıkla evre I' de tanı konulur. Müsinöz histoloji gastrointestinal sistemden metastazla ilişkili olabilir.

Kadınlara, müsinöz karsinomu dışlamak için tüm gastrointestinal sistem değerlendirilmesi önemle önerilir.

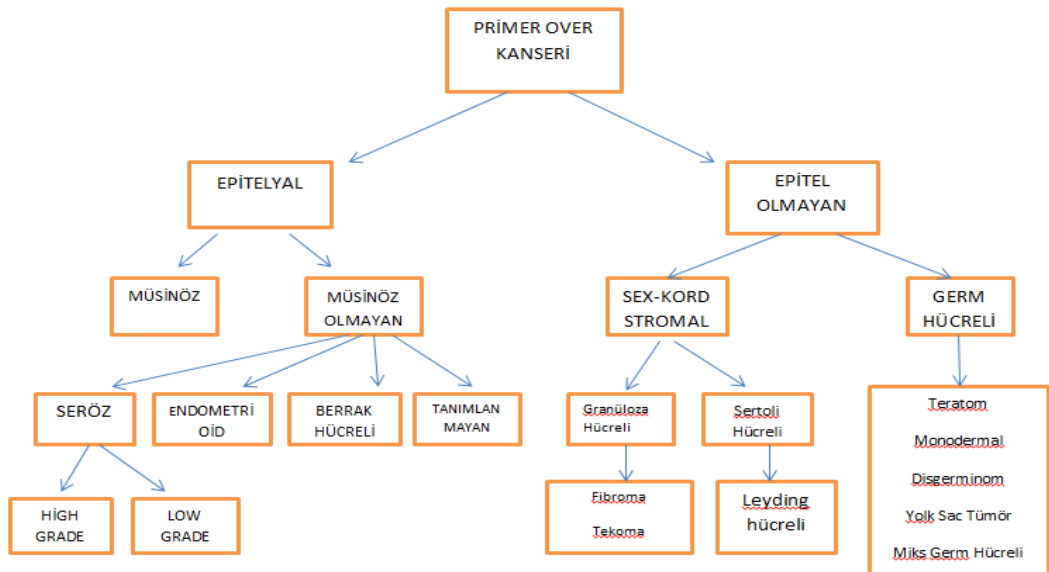
Germ hücreli karsinom

Germ hücreli tümörler nadirdir ve tüm over kanserlerinin sadece % 3'ünü oluşturur. Tipik olarak genç yaşta tanı alırlar ve ortalama tanı yaşı 10- 30 arasındır. Over germ hücreli tümörler tedavi planlamasında yararlı olabilen, bazı tümör belirteçlerini ürettiği bilinmektedir. Over kanserlerinin bu tipine sıklıkla daha genç yaşlarda tanı konulduğundan, hastanın fertilizasyon isteği ve potansiyeline odaklanmayı içeren bir tedavi planı geliştirmek önemlidir.

İlginç bir şekilde over germ hücreli tümörlerin histolojik tipleri, erkeklerde testislerde görülen germ hücreli tümörlerin histolojisiyle karşılaştırılabilir. Germ hücreli tümörler, abdominal şişlik ve düzensiz vajinal kanama gibi diğer over kanserlerine benzer spesifik olmayan belirtiler gösterirler.

Over Seks Kord Stromal Tümörleri

Seks kord stromal tümörler tüm over kanserleri içinde en az görülen ve tüm primer over kanserlerinin %2'sinden daha azını oluşturur. Çok çeşitli epitelyal over kanserlerinin aksine, seks kord stromal tümörler daha nadir görülen ve erken tanı konulan tümörlerdir. Bu tip over kanserleri, beyaz kadınların aksine Afrikalı Amerikalı kadınlarda daha yüksek oranda görülür ve ortalama tanı yaşı 50 civarındır. Dikkat çekici bir şekilde, sigaranın berrak hücreli karsinom gibi bu kanser tipinde de riski azalttığı gösterilmiştir [112].



Şekil 1. Over kanseri histopatolojik sınıflandırması

Tanı

Semptomlar

Erken evre hastalıkta, hasta tümör büyümesi sonucu düşük abdominal basınca ve ağrıya bağlı idrar sıkışıklığı veya kabızlıktan şikayet edebilirler. Ayrıca over kitlesinin rüptürü ya da torsiyonuna sekonder acil bir cerrahi durumlada karşımıza çıkabilir. İlerlemiş hastalıkta, karın şişliği, kabızlık, anoreksiya veya erken doyma gibi asit, omental veya bağırsak tutulumu ile ilgili belirtilerle gelebilir.

Bulgular

Over kanserinin en önemli bulgusu fizik muayenede ele gelen pelvik kitledir. Solid, düzensiz, sabit, nodüler, bilateral pelvik kitle yüksek oranda over kanserini düşündürür. İlerlemiş hastalıkta abdominal şişlik ve asit geniş tümörden dolayı oldukça yaygındır. Şişkinlik kısmi bağırsak tıkanıklığı, ileus, omentumun malign infiltrasyonu veya bunların kombinasyonlarına bağlı olabilir. İyi bir fizik muayene ile over kanseri için önemli pozitif bulgular elde edilebilir. Supraklavikuler, inguinal hatta aksiller nodlar metastaz sonrası büyüyebilir. Pulmoner muayenede asite eşlik eden plevral efüzyon görülebilir. Zayıflama, bacak ödemi, deri metastazları da ayrıca görülebilir.

Görüntüleme

Bir pelvik kitlenin tanısı için laparotomi yapılır. Over kanseri tanısında çeşitli görüntüleme yöntemleri ortaya çıkmıştır. Semptom veya bulgular pelviste lokalize olduğunda, over boyutunu ölçmek ve internal over yapısını göstermek için transvajinal ultrasonografi primer rol oynar. Birkaç araştırmacı, volüm, septum kalınlığı ve papiller yapıların varlığının malign histoloji için önemli belirteçler olduğunu gösterdiler. Postmenapozol hastalarda 5 cm den daha küçük çapta tek taraflı kist varlığı düşük malignite insidansını gösterir. Over tümöründe vaskülarite ve kan damarı değerlendirilmesinde renkli flow doppler transvajinal ultrasonun değerlendirmesinin sensitivitesini artırmıştır.

Belirteçler

Kanser antijeni (CA 125) pekçok epitelyal over tümörü tarafından eksprese edilmektedir. Bast ve arkadaşları yüksek CA 125 değerinin over kanserli kadınlarda (% 82), genel popülasyona göre (% 1), benign hastalıklı kadınlar (% 6) ya da jinekolojik kanseri olmayan kadınlara göre (% 28,5) daha sık olduğunu gösterdiler. CA 125 seviyesi cerrahi olarak belirlenen % 23-50 evre I ve % 90 evre II over kanserinde yüksek olarak belirlenir. Pelvik kitlesi olan postmenapozal bir kadında, yüksek CA 125 seviyesi over kanserini şüphesini doğrulayabilir. % 25 over kanserinde belirteç negatif olduğu için normal bir CA 125 seviyesi over kanserini dışlamak için garanti olmaz. Bunun yanında, özellikle premenapozal kadınlarda CA 125 seviyesi örneğin myom, endometriozis ve hamilelik gibi başka jinekolojik durumlarda, karaciğer veya akciğer ya da diğer malignensilerde yükselebilir. CA19.9 ve OVX1 halen değerlendirme aşamasında olup plazma lizofosfatidik asit seviyesi over kanseri için % 90 spesifiteye sahip olup, evre I ve II vakalarda % 90'dan fazla yükselmiştir.

Tanı Stratejisi

Over kanseri şüphesi olan kişide ilk önce pelvik muayene önerilir, postmenapozal kadınlarda adneksiyel bölgede ele gelen kitle varlığında tanı amaçlı laparotomi önerilir. Premenapozal kadınlarda, adneksiyal kitle klinik olarak şüpheli değilse (hareketli, çoğunlukla kistik ve çapı 8 cm'den küçük tek taraflı lezyon), 2 ayı geçmeyen sık takip önerilir. Bu süre zarfında hormon baskılama tedavisi uygulanabilir, kitle küçülmüyor ya da büyümeye devam ediyorsa ameliyat önerilir [113].

Evreleme

Eksra abdominal metastaz yoksa, over kanserinin kesin evrelemesi için laparotomi yapmak gerekir. Evre IV'de cerrahinin rolü henüz belirlenmemiştir. Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) ve Amerikan Ortak Kanser Komitesinin yaptığı evreleme aşağıdadır.

Evre I

- Evre IA: Bir over (over kapsülü sağlam) veya fallop tüpü ile sınırlı tümör; over veya fallop tüpü yüzeyinde tümör yok; asit veya peritoneal yıkamada malign hücre yok.
- Evre IB: Her iki overde (over kapsülleri sağlam) veya fallop tüplerinde sınırlı tümör; over veya fallop tüpü yüzeyinde tümör yok; asit veya peritoneal yıkamada malign hücre yok
- Evre IC: Aşağıdaki C alt evrelerinden herhangi biri ile bir veya her iki over veya fallop tüpü ile sınırlı tümör:
- IC1: intraoperatif cerrahi dökülme
- IC2: ameliyattan önce kapsülün yırtılması veya over veya fallop tüpü yüzeyinde tümör
- IC3: asit veya peritoneal yıkamada malign hücreler

Evre II

Tümör, bir veya her iki overi veya pelvik ağzın altında pelvik uzantılı fallop tüplerini veya birincil periton kanserini içerir (Tp)

- Evre IIA: uterus ve/veya fallop tüplerine uzanan ve/veya implant olan. Asit veya periton yıkama sıvısında malign hücre yoktur.
- Evre IIB: diğer pelvik dokulara uzanan ve/veya implant olan. Asit veya periton yıkama sıvısında malign hücre yoktur.
- Evre IIC: Evre IIA veya Evre IIB 'ye ilaveten asit veya periton yıkama sıvısında malign hücre vardır.

Evre III

Tümör, bir veya her iki overi veya fallop tüplerini veya pelvis dışında peritona yayılımı ve/veya retroperitoneal lenf düğümlerine metastazı olan sitolojik veya histolojik olarak doğrulanmış primer periton kanserini içerir. Evre III over kanseri, pelvisin dışında mikroskobik olarak peritoneal implantasyonla birlikte bir veya iki overde tümör vardır. Yüzeysel karaciğer metastazları evre III'e eşittir. Tümör gerçek pelvise sınırlıdır ancak histolojik olarak ince bağırsak veya omentuma uzanan malign uzantılar mevcuttur.

- Evre IIIA: Pelvisin arkasında mikroskobik peritoneal metastazlar

- Evre IIIB: Retroperitoneal lenf düğümlerine metastazlı veya metastazsız, en büyük boyutu 2 cm'ye kadar pelvisin ötesinde makroskopik peritoneal metastaz
- Evre IIIC: En büyük boyutu >2 cm olan, retroperitoneal lenf nodlarına metastazlı veya metastazsız makroskopik peritoneal metastaz (her iki organın parankimal tutulumu olmaksızın tümörün karaciğer kapsülüne ve dalağa uzanmasını içerir)

Evre IV

Evre IV Peritoneal metastazlar hariç uzak metastazlar

- IVA: pozitif sitoloji ile plevral efüzyon
- IVB: parankimal metastazlar ve ekstra-abdominal organlara metastazlar (kasık lenf düğümleri ve karın boşluğu dışındaki lenf düğümleri dahil) [114].

Prognosis

Over kanseri gelişen kadınlarda prognoz, direk olarak tanı anındaki evreyle ilişkilidir. Evre I'de 5 yıllık sağ kalım oranı % 90'dır. Bölgesel hastalığı olan yani hastalığın komşu dokulara yayıldığı kişilerde bu oran % 80, ve metastazlı olan hastalarda % 25'dir. Son 30 yılda over kanserinden ölüm oranı az da olsa düşmüştür.

Tablo 2. Over kanseri evreye göre 5 yıllık survey tablosu [114]

Evre	Yayılım yeri	5 yıllık survey
I	Overde sınırlı	% 90
II	Pelvis uzanan	% 60-80
III	Karaciğer, periton, ince bağırsak metastazı	% 20
IV	Uzak organ metastazı	<% 10''

Metastaz

Metastaz, kanser hücrelerinin birincil tümörden ayrılarak çevre dokulara ve uzak organlara yayılmasıyla devam eden bir süreçtir. Metastaza bağlı süreç, kansere bağlı morbidite ve mortalitenin birincil nedenidir ve kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %90'ından sorumludur. Geleneksel olarak over kanseri metastazının genellikle doğrudan yüzey yayılımı yoluyla meydana geldiği düşünülürken, hematogen

metastazın minimal bir rol oynadığı düşünülmüştür. Bu fikir, esas olarak, peritoneal ve abdominal metastazların prevalansının, ekstra-abdominal metastazlardan nispeten daha yüksek olduğu gözleminde kaynaklanmaktadır. Tarin ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, karın ağrısı ve asitle ilişkili şişkinliğin hafifletilmesi için peritoneovenöz şant uygulanan hastalarda, şantın sıvı ve malign hücreleri dolaşıma taşımaya rağmen, hastaların uzak metastazlarının artmadığını ve hastalığın karın içinde sınırlı kaldığını göstermişlerdir. Peritoneal veya hematojen olarak sınıflandırılmaksızın, omentum over kanseri metastazının en sık görülen bölgesidir. Over kanser hücrelerinin en sık omentuma metastaz yapmalarının nedeni, omentumun bazal membranının olmaması ve sütlü leke olarak tarif edilen mezotel hücrelerinin az olduğu alanları kanser hücrelerinin daha kolay istila etmesidir. Ayrıca, omentum, kanser hücrelerinin omentuma pasif göç ve tutunma şansını artıracak olan periton boşluğundan drenaja katılır. Daha da önemlisi, kanser hücre büyümesi için önemli bir enerji kaynağı olan serbest yağ asidi omentumun ana hücre tipi olan omental adipositlerinden bolca salgılanır [115].

EOK'nin transçöloomik metastazı

Over kanseri metastazı için en yaygın olarak kabul edilen yol transçöloomik metastazdır. Genellikle gastrointestinal ve genitoüriner sistemler içindeki hayati organları etkileyen bu yol metastazda sıklıkla kullanılır. Sonuç olarak, hastalıkla ilişkili majör morbiditeden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Overlerin periton boşluğuna yakın olması, bu metastatik yolun en sık görülmesinin akla gelen nedenidir. Omentumun mezotelyal yüzeyi ile over yüzey epitelinin ortak orijinden köken alması “tohum ve toprak hipotezi” için bir kanıt olabilir. Over kanserinin transçöloomik metastazı, kanser hücrelerinin birincil tümörden ayrılması, anoikise direnç kazanması, peritoneal kavite içine yayılması, yayılmış tümör hücrelerinin periton yüzeylerine tutunup mezotelyumu istila etmesi ve ardından kolonizasyonu içeren farklı aşamalara ayrılabilir ve son olarak ikincil bölgelerde istila edilen hücrelerin büyümesi olarak devam eder [115].

1. Hücre ayrılması ve göçü

İntraperitoneal yayılıma göre, EOK'nin transçöloomik metastazındaki ilk adım, tümör hücrelerinin over yüzeyinden ayrılmasıdır. Hücrelerin ayrılması için ön koşul, hücre-hücre yapışmalarının zayıflamasıdır. EOK'nin temel olarak over yüzey

epitelinden kaynaklandığı göz önüne alındığında, bu kanser tipinde en belirgin hücre yapışma molekülü epitelyal kaderindir. E-kadherin, sıkı bağlantıların ve zonula adherens bağlantılarının yapısında yer alan, kalsiyuma bağımlı, transmembran hücre-hücre adezyon molekülleri ailesinin bir üyesi olup transformasyonun ve hücre hareketliliğinin baskılanmasında çok önemli rolleri vardır. Tümör hücrelerinin tümör dokusundan ayrılmasında, EMT olarak adlandırılan evrimsel olarak korunan bir süreçle ilişkisi vardır. EMT, tümör hücrelerinin hücre polaritesi, hücre-hücre etkileşimi ve küboidal şekil dahil olmak üzere epitel özelliklerini kaybederek, mezenkimal yapıda daha yüksek motiliteye ve ilaç direnç potansiyeline sahip olan ve ikincil bölgelere daha iyi göç edebilen kanser kök hücrelerine (KKH) farklılaştığı morfolojik ve moleküler bir süreci içerir. Asitlerden izole edilen KKH'lerin, ksenograft fare modellerinde tümör oluşturma konusunda yüksek bir yeteneğe sahip olduğu bulunmuştur. KKH'lerin göç potansiyeli esas olarak epitelyal belirteçlerin, özellikle E-kadherin'in azalması, mezenkimal belirteçlerin, özellikle nöronal kaderinin (N-kadherin) artmasından kaynaklanır. Bu değişiklikler, hücreler arası sıkı bağlantıların zayıflamasına ve tümör hücrelerinin mikroçevredeki stromal hücrelerle etkileşim yeteneğinin artmasına neden olur. Over kanserinde, EMT sürecinde E-kadherin, ana transkripsiyonel faktörler olan Zeb1/2, Snail ve Slug tarafından düzenlenebilir. Bu transkripsiyon faktörleri TGF β , kemik morfojenik protein 4 (BMP-4), endotelin 1 (ET-1), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) gibi ilişkili yollar ile aktive edilebilir. miRNA'lardan microRNA-200 (miR-200) ailesi, Zeb1/2'yi hedefleyerek E-kadherini artırdığı gözlemlenmiştir. Tümör hücreleri ikincil bölgelerine ulaştıklarında MET adı verilen ters bir süreç girerler ve mezenkimal yapıdan tekrar epitele dönüşürler. Bu süreç, E-kadherin ekspresyonunun yeniden artmasıyla sonuçlanır. İntegrinler, hücre adezyonunda ve hücre hareketliliği ve proliferasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan başka bir transmembran protein grubunu temsil eder. İntegrinlerin miktarındaki değişiklikler, metastatik ilerleme ve çoğalma ile ilişkilidir. Tümör hücreleri birincil yerlerinden ayrıldıktan sonra periton boşluğundan periton sıvısı (asit) yoluyla omentuma ulaşırlar. Tümör hücrelerinin periton boşluğundan başarılı bir şekilde göç etmesi için bazı şartlar vardır. Birincisi, hücrelerin yayılabilmesi için peritonda fazla miktarda asit sıvısı olmalıdır. İkincisi, asit sıvısındaki tümör hücrelerinin bir kısmı tekli

hücreler olarak yüzerken, çoğu çok hücreli sferoidler olarak yüzer. Tümör hücrelerinin başarılı transçöloomik yayılımının üçüncü koşulu ise göç sırasında hayatta kalmaları ve anoikise dirençli hale gelmeleridir [115].

2. Mezotelyuma tutunma ve implantasyon

Mezotelyum, omentum ve periton dahil olmak üzere periton boşluğu içindeki tüm organları kaplayan tek sıra epitel hücrelerinden oluşan bir tabakadır. Bu tabaka tip I ve IV kollajen, laminin, fibronektin ve hyaluronandan oluşur ve ağırlıklı olarak tümör hücrelerinde bulunan adezyon proteinleri ile etkileşime girebilir. MET, periton içine yayılmış tümör hücrelerinde E-kadherin ekspresyonunun artmasına neden olur ve metastatik bölgelerde hücre yapışmasında çok önemli bir rol oynar. E-kadherinin hücre yüzeyinde azalmasını takiben over kanseri hücreleri EMT geçirerek mezenkimal karakter kazanırlar ve birincil tümörden ayrılırlar. Bu durum hücrelerin $\alpha 5\beta 1$ integrin ekspresyonunun desteklenmesi yoluyla mezotelyuma göçünü uyarır. Bu gözlem, E-kadherin ekspresyonundaki dinamik değişimin sadece birincil tümörlerden ayrılma ile sonuçlanmadığını, aynı zamanda tümör hücrelerini periton boşluğu ve omentumdaki metastatik bölgelere yeniden bağlanmaya hazırladığını göstermektedir. Peritoneal yüzeye bir kez bağlandıktan sonra, EOK hücreleri alttaki mezotelyuma invazyona başlar. Kanser hücrelerinin istilacı potansiyeli, çeşitli dış uyaranlardan ve içsel özelliklerinden gelir. Yeni mikro çevreye uyum, periton ve omentumda metastatik kanser hücrelerinin kolonizasyonu ve çoğalmasıyla sonuçlanır. Aslında, kanser hücrelerinin yeni mikro çevre ile karşılıklı etkileşimi, metastatik tümörün başarılı bir şekilde yerleştiği alanda koloni oluşturması için çok önemlidir. İlerlemiş EOK'li hastalardan alınan mezotelyal hücrelerin, sağlıklı insanlardan alınanlara kıyasla daha yüksek bir proliferasyon oranı sergilediği bulunmuştur [115].

EOK'nin hematojen metastazı

Over kanserinin doğrudan yüzey yayılımı ve tek tek dökülmüş kanser hücrelerinin periton boşluğuna maruz kalması yoluyla metastaz yaptığı yaygın olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte, metastatik süreç tamamen rastgele değildir ve metastatik odaklar, subdiyafragmatik yüzeyde ve omentum içinde sütlü lekelere eğilimlidir. Bu bölgelerdeki kanser hücreleri metastaz için lenfatik damarları kullanır. Aslında, Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO)

sınıflamasına göre evre III-IV'de EOK'nin % 70-75'inde pelvik ve para-aortik lenf nodu tutulumunun olması lenfatik yolla yayılımı kolaylaştırır. Buna bağılı olarak, nodal tutulum hastalığın tekrarlama riskini artırır ve kötü prognozla ilişkilidir. Çeşitli çalışmalarda over kanseri hastalarında kanda dolaşan tümör hücreleri (CTC) olduğunu göstermişlerdir. Önceden yapılan çalışmalara göre, peritoneovenöz şant yapılan hastalarda büyük miktarlarda CTC'lerin kanda ölçülmesine rağmen, hastalığın çoğunlukla karın içinde sınırlı kaldığını göstermişlerdir. Ancak son çalışmalar over kanseri hastalarında CTC'lerin ileri tümör evresi, rezidüel hastalık, kötü tedavi yanıtı ve düşük sağkalım oranı ile ilişkili olduğunu, CTC'lerin veya en azından bir kısmının, tümörün yayılmasında rol oynayabileceğini savunmuşlardır. Son olarak yapılan birkaç çalışmada, over kanseri hastalarının büyük bir kısmında, ilk tanı anında retroperitoneal veya uzak (örneğin, karaciğer ve akciğer) metastaz olduğu tespit edilmiştir. Bu gözlemler doğrultusunda over kanserinde hematojen yoldan yayılımın da önemli olduğu düşünülmektedir [115].

Epitelyal Over Kanserinde kanda dolaşan tümör hücrelerinin önemi

CTC'ler, birincil tümörlerden, nükslerden ve metastazlardan dolaşıma dökülen tümör hücreleri olup bunların kana salınması kanserin metastazında erken bir olaydır. CTC'lerin çoğu bağışıklık sistemi tarafından temizlenir ancak bazıları hayatta kalarak uzak organ metastazı oluşturabilir. Bu nedenle kanser hastalarının kanındaki CTC'lerin tespiti asemptomatik tümörlerin erken teşhisine olanak sağladığı için ve hastalık nüksünün güçlü bir göstergesi olduğu için değerlidir. Bununla birlikte, CTC'lerin önemine ilişkin bilgi eksikliği, over kanserinin yayılmasında hematojen yolun anlaşılmasının ana nedeni olabilir. CTC'lerin over kanserinin erken evrelerinde kanda bulunması ve EOK hastalarında tümör yayılmasının büyük bir bölümünü oluşturduğunu düşünmelerinden dolayı, bu tümör hücrelerinin kan içinde izlenmesi, yaklaşmakta olan metastazların tahmini ve ilaç yanıtlarının değerlendirilmesi için umut verici olabilir [115].

Tedavi

Over kanserinde cerrahinin amacı çıkarılan kitleye histopatolojik tanı koymak, mümkün olduğu kadar kanser dokusunu çıkarmak ve FIGO evresini belirleyebilmektir [115]. Over kanseri için geleneksel tedavi, tümör cerrahisini takiben sırasıyla platin ve taksan bazlı kemoterapi kombinasyonudur [110, 116]. Cerrahi evrelemede, total abdominal histerektomi, bilateral salpingo-ooferektomi ve pelvik-paraaortik lenf nodları ile omentum çıkarılır ve ayrıca endike olduğunda apendektomi gibi diğer ek prosedürler yapılır. Apendektomi, yüksek metastaz olasılığı nedeniyle müsinöz over kanseri için tipik bir ek prosedürdür [110]. Evre I hastalığı olan hastalar için birincil tedavi; cerrahi rezeksiyon, tümör derecesi, histoloji ve komşu yapılara yaygınlık tarafından belirlenen adjuvan tedavidir. Kemoterapi ile tedavi, cerrahi evrelemeye göre ve hastalığın derecesine bağlı olacaktır [117]. Evrelendirilmesi cerrahi olarak doğru yapılmış, iyi diferansiye hastalar adjuvan kemoterapi almaksızın gözlemlenirken, evre II ve evre III hastalar genellikle 3 ila 6 kür ek adjuvan platin/taksan bazlı tedavi alırlar [117]. Pratikte standart öneri, altı kür platin adjuvan tedavisidir. 3 haftada bir intravenöz (IV) karboplatin ve paklitaksel tedavisi, ileri evre epiyelyal over kanseri için standart birinci basamak kemoterapi ilaç tedavisidir [118]. İlerlemiş over kanseri tedavisinde cerrahi rezeksiyon merkezi bir rol oynar ve rezidüel hastalığın yaygınlığı, prognoz ve sağkalımda önemli belirleyicilerden biridir [119]. Cerrahi sonrası rezidü tümör olmaması sağkalım için en önemli prognostik faktördür [118]. Özetlersek; evre II-IV EOK'nin tedavi seçenekleri, çıkarılabiliyorsa tam cerrahi rezeksiyon, ardından platin bazlı kemoterapi veya neoadjuvan kemoterapi sonrasında aralıklı sitoredüktif cerrahi ve ardından ek platin/taksan kemoterapisinden oluşur [117]. Tümörlerinin tamamen gros rezidüel hastalık (R0) olmayacak şekilde sitoredüksiyona uğramasının mümkün olmadığı veya cerrahi adaylığı zayıf olan evre III veya IV olan hastalarda neoadjuvan kemoterapi düşünülmektedir [120].

Şu anda ileri evre over kanseri için standart ve kabul edilebilir 5 tedavi seçeneği bulunmaktadır

1. Sitoredüktif cerrahiyi takiben IV platin/taksan bazlı kemoterapi
2. Sitoredüktif cerrahiyi 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, kemoterapiyi takiben batin 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 [117]

Over kanserinde bu tedavilere ek olarak yeni ilaçlar geliştirilmeye başlanmıştır. Bir antianjiyogenik tedavi olan ve vasküler endotelial büyüme faktörüne (VEGF) karşı bir monoklonal antikor olan bevacizumab, tekrarlayan ve platine dirençli over kanserinde kullanım için onaylanmıştır. Over kanserinde DNA hasar yanıtı yolları aktif terapötik hedeflerdir. Özellikle BRCA mutasyonları olanlar için yeni bir tedavi modeli olan Poli ADP-riboz polimeraz inhibitörü (PARPi) olan olaparib, BRCA mutasyonları ve tekrarlayan hastalığı olanlarda kullanım için 2014 yılında onaylanmıştır [121].

EPİTELYAL MEZENKİMAL TRANSİTOZ (EMT)

EMT'yi daha iyi anlayabilmek için epitel ve mezenkimal hücre özelliklerini bilmek gerekir. Epitel dokusu, tek veya çoklu hücre tabakaları halinde birbirlerine tek tek ve sıkıca bağlı epitel hücrelerinden oluşur. Bu hücre tabakaları belirli ortak özelliklerle tanımlanabilir, ancak tüm özellikler her epitel yapısında bulunmayabilir.

Epitelyal hücre morfolojisi

1. Epitel hücrelerinde apikal ve bazal polarite vardır. Epitel hücreleri, apikobazal polarite sergiler ve hayatta kalmaları için hayati öneme sahip hücre-hücre ve hücre-matriks bağlantılarına sahiptir. Hücre polaritesi, apikal ve bazal alanların ayrılmasını düzenlemek için etkileşime giren üç multiprotein kompleksinden oluşur.

-SCRIB kompleksi (Scrib-Lgl-Dgl): üç sitoplazmik proteinden oluşan ve tümör süpresör olduğu düşünülen bu kompleks, bazal alanda yerleşmiştir ve bazolateral polariteden sorumludur.

-Crumbs kompleksi (Crumbs-PATJ-PALS1): apikal polariteden sorumludur.

-PAR kompleksi (Par3-aPKC- PAR6): apikal ve bazal alan arasında bulunur.

PAR kompleksi Crumb kompleksinin aktivitesini pekiştirirken, SCRIB kompleksinin antagonistidir.

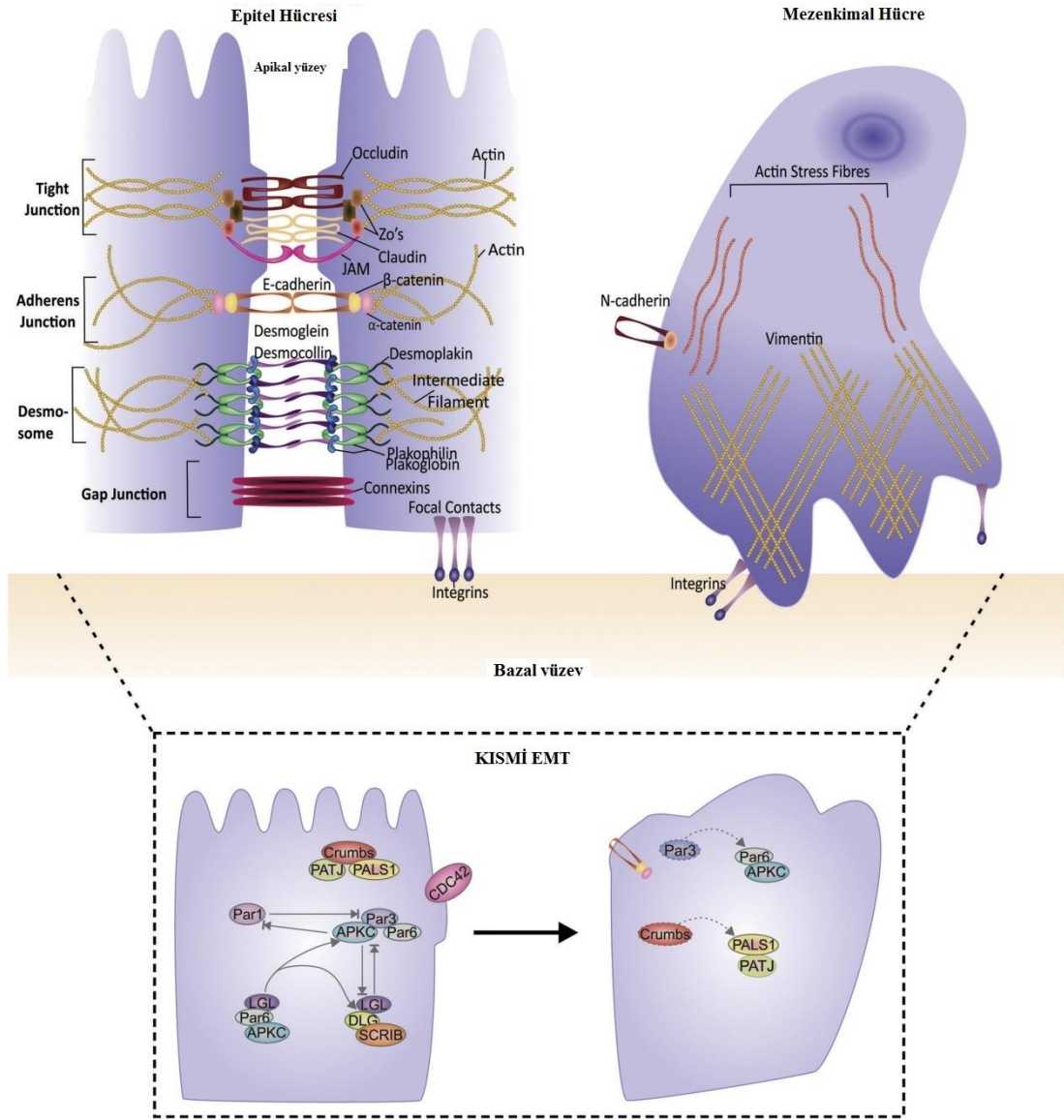
2. Bu bağlantılar, doku stabilitesini ve bütünlüğünü koruyarak hücreler arasında yapışma ve iletişim sağlar. Sıkı bağlantı veya zonula okludensler: apikal yüzeye en yakın bulunan, hücreler arasında çok az bir boşluk bırakarak epitel hücrelerini tek tek birbirine sıkı bir şekilde bağlayan, epitel tabakalarının bütünlüğünü koruyarak iyon ve moleküllerin hücreler arası difüzyonunu kontrol eden yan yüz bağlantılarıdır. Bu yapılar integral transmembran proteinler (occludin, claudin, junctional adezyon molekülleri, kolera toksin proteinleri), periferal proteinler (zonula occludens1,2,3,PAR) ve düzenleyici proteinler (alfa catenin, cinuulin, symplekin)'den oluşur. Zonula Adherens (ZA): sıkı bağlantıların altında bulunan ve zonula okludense benzer şekilde hücreyi çevreleyerek hücreler arası yapışmayı sağlayan aynı zamanda hücre gerilimini ve şeklini düzenleyen bağlantılardır ancak sıkı bağlantılara nispeten daha geçirgendirler. ZA'ler, hücre iskeletini oluşturan aktin ve miyozin filamentlerine, catenin (α, β, γ) ve kadherinlerin sitoplazmik alan etkileşimi üzerinden bağlantılıdır. Bir transmembran proteini olan E-kadherin en önemli epitelyal gen olarak kabul edilir ve sitoplazmik tarafta α ve β katenine, onlarda hücre iskeleti proteinleri olan aktine bağlanırlar. Desmozomlar: kadherin ailesi üyesi olan desmocollin ve desmogelin transmembran proteinleri üzerinden iki hücreyi birbirine bağlayan plazma membranının sitozolik yüzeyinde kümelenmiş moleküler komplekslerdir. Bitişik iki hücre arasında bulunan desmocollin ve desmogelin, plazma membranının sitozolik yüzeyinde plakoglobin ve plakophilin içeren dış yoğun plak ve desmoplakin üzerinden keratin ve vimentin içeren ara filamentlere bağlanırlar. Desmozomlar epitel hücrelerine mekanik destek verdikleri için mekanik stres altındaki hücrelerde sıklıkla bulunurlar. Hemi-desmozomlar bazal hücre yüzeyinde bulunur ve hücreyi alttaki bazal laminaya bağlar. Gap junctions: Gap junctionlar, bitişik hücrelerin sitoplazmik alanları arasında konneksin proteinleri tarafından oluşturulan por şeklinde köprülerdir. Bu porlar hücreler arasında hücrelerarası sinyal, küçük metabolit ve iyonların transportuna izin veren su dolu porlardır.

3. Epitel hücreleri bir bazal membran üzerine oturur. Bazal membran mekanik güç verir, çekme kuvvetlerine karşı koyar ve kandan geçen küçük moleküllerin ve gazların geçişini desteklemek için bir difüzyon bariyeri görevi görür. Transmembran bir protein olan integrinler bazal membranda bulunur, epitel hücrelerindeki actin filamentlerini, ECM de olan fibronectin, vitronectin, laminin ve kollogen IV e bağlar. Bu bağlantılar hücreleri bazal membrana sıkı bir şekilde bağlayarak alt tabakadaki hücrelerden ayırır ve hücrelerin diğer tabakalara invazyonunu önler.

4. Epitel hücrelerinin genel şekli düz ve poligonaldır. Hücresel yapı, bir mikrotübül ağı, aktinden oluşan mikrofilamentler ve hücre şeklini oluşturmak için destek veren ara filamentlerden oluşur. Mikrotübüller, hücre içi taşıma ve hareketi desteklemek için içi boş bir tüp şeklinde düzenlenmiş alfa ve beta tubulinlerden oluşurlar. Küresel aktin monomerlerinden oluşan mikrofilamentler, hücreye hem mekanik güç vermek hem de kasılma sağlamak için transmembran proteinlere bağlantılar sağlayan uzun ve ince lifler halinde düzenlenmişlerdir. Ara filamentler hücresel sertlik sağlayan keratin, nükleer zarfın stabilizasyonunu sağlayan nükleer lamininler ve mekanik gücü sağlayan vimentinlerden oluşur. Bu lifler birlikte hücrenin şeklini korumak ve hücrenin yapısal çerçevesine sertlik kazandırmak için, iç hücresel yapıyı ve organelleri organize ederler. Epitel hücrelerinin hareketi, hem şekil hem de yan yüz bağlantılarından dolayı kısıtlıdır.

Mezenkimal hücre morfolojisi

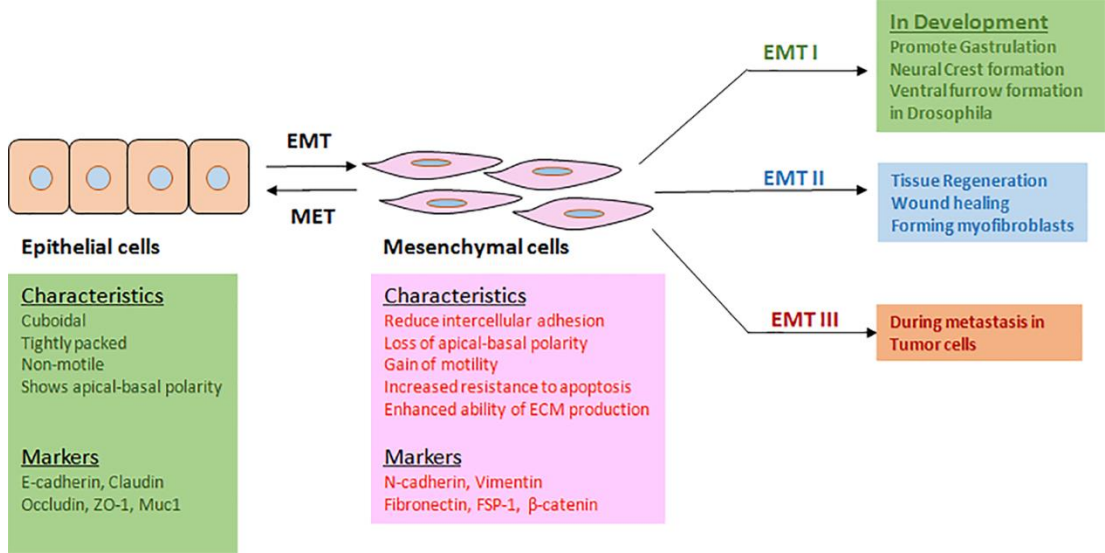
Mezenkimal hücreler, epitel hücrelerinin aksine hücrelerin, doku içine göç ve invazyonuna imkan veren özelliklere sahiptir. Ne tek tip bir bileşime, ne de hücresel yapışmaya sahiptirler ve epitel hücrelerindeki gibi apikal bazal polariteden ziyade ön-arka polariteye sahiptirler. Mezenkimal hücreler morfolojik olarak daha düzensiz olan iğsi yapıdadır. Aktin filamentleri demetler halinde düzenlenir ve çeşitli hareket türlerini sağlayan, aktin açısından zengin yeni membran çıkıntıları oluşturur. Ek olarak, mezenkimal hücrelerde keratinler azalır ve vimentinler hücre iskeletinin gücünü artırmak için artar, bu da onu daha esnek hale getirir ve göç sırasında daha az hasara uğramasını sağlar [122].



Şekil 2. Epitelyal ve mezenkimal hücrelerin morfolojik özellikleri [122]

EMT (Epitelyal Mezenkimal Transizyon), epitel hücrelerinin apikal-bazal polaritesini ve hücre-hücre yapışmasını kaybederek, artan migrasyon kapasitesine sahip daha iğ şeklindeki mezenkimal hücreler haline geldiği ve mezenkimal yapıdan tekrar epitelyal yapıya dönebildiği yani tersine çevrilebilen bir süreçtir. Bu süreçte ZA'ların önemli bir komponenti olan E-kadherin ve ocludin, claudin, Epcam, $\alpha\beta4$ gibi komponentler ile desmozom stabilizasyonu için önemli çeşitli sitokeratinler bastırılır. Eşzamanlı olarak, vimentin, fibronektin, N-kaderin, $\beta1$ ve $\beta3$ integrinler ve MMP'ler artar. Bu mezenkimal benzeri hücreler, mezenkimalden epitelyale geçiş

(MET) adı verilen bir süreç olan epitel durumlarına geri dönebilirler. Dahası, son kanıtlar kanser hücrelerinin hem epitelyal hem de mezenkimal hücrelerin özelliklerine sahip bir ara "kısmi EMT" durumunda olabileceğini göstermektedir [123].

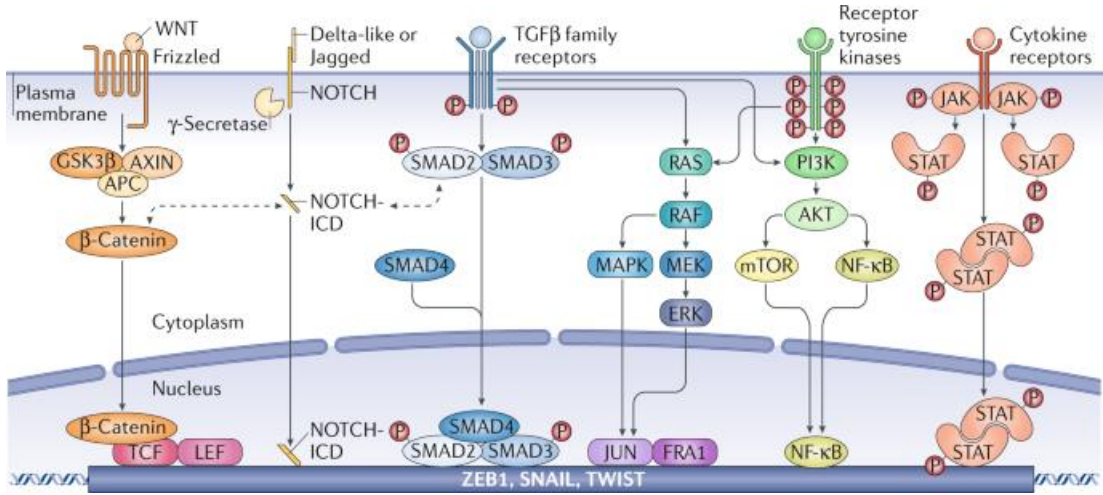


Şekil 3. Ana hatlarıyla tipik bir EMT [124]

EMT'nin üç türü vardır. Tip I EMT, embriyogenez sırasında önemlidir, tip II yara iyileşmesi ve fibroz sırasında gözlenir ve tip III kanser ile ilişkilidir. Tip III EMT, kanser hücrelerinin tümör başlatma ve metastaz yapma kapasitesini ve ayrıca kemo ve immünoterapiye artan direnci yönlendirir. Dahası, kanser hücrelerini anoikise karşı daha dirençli hale getirir [123].

EMT'yi Aktifleştiren Sinyal Yolakları

EMT, epitel hücreleri kendi stromal mikroçevrelerini oluşturan hücreler tarafından salınan spesifik sinyaller ile karşılaştıklarında aktive edilen birkaç hücre içi sinyal yolağı tarafından uyarılabilir. Normal gelişim sırasında, yara iyileşmesi ve kanser ilerlemesinde çeşitli EMT-TF ekspresyonunu uyararak EMT yi aktive ettiği bilinen sinyal yolları aşağıda şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 4. EMT'yi aktive eden sinyal yolları [125]

TGF β yolu, birkaç farklı doku tipinde EMT'nin uyarılmasında merkezi bir role sahiptir. Bu sinyal yolu, üç farklı TGF β izoformu, iki aktivin ve birkaç kemik morfojenik proteini içeren alternatif ligandların geniş bir grubu tarafından aktifleştirilir. Karsinogenez boyunca TGF β 'nin çift yönlü bir rolü vardır; başlangıçta büyümeyi durdurarak ve apoptozu aktive ederek tümör oluşumunu engeller ancak TGF β 'nin aşırı ekspresyona edildiği ileri kanserlerde EMT'yi uyararak tümör oluşumunu teşvik eder, böylece tümör hücreleri daha invaziv hale gelir ve metastaza olan yatkınlıkları artar [126]. TGF β yolu, bir kaç farklı mekanizmayla EMT'nin aktivasyonuna öncülük eder. TGF β sinyali, TGF β reseptörlerinin uyarılması üzerine, SMAD'a bağımlı ve SMAD'dan bağımsız iki yola ayrılır. SMAD bağımlı yolda, TGF β reseptörünün aktivasyonu üzerinden SMAD kompleksi sayesinde vimentin gibi mezenkimal genlerin ekspresyonu uyarılabilir. Bu sinyal yolları devamında EMT-TF aktivasyonuna yol açar. TGF β 'lar SMAD4 ile kompleks oluşturmaya devam eden SMAD2 ve SMAD3'ün fosforilasyonuna öncülük eden TGFBR1 (reseptör 1) ve TGFBR2 kompleksine bağlanır. Benzer şekilde BMP (kemik morfojenik protein)'ler tarafından TGF β reseptörlerinin bir araya getirilmesi SMAD4'le kompleks yapabilen SMAD1 ve SMAD5'in aktivasyonuna öncülük eder. Birkez oluşturulduktan sonra bu üçlü yapıdaki SMAD kompleksleri (SMAD2-SMAD3-SMAD4 ve SMAD1-SMAD5-SMAD4) mezenkimal bir yapının kazanılması, invazyon, motilite, hücre büyümesi, proliferasyon, anjiogenezis, apoptoz ve yaşlanmayla ilgili genlerin büyük bileşenlerinin ekspresyonunun

düzenlenmesinde transkripsiyonel faktör gibi fonksiyon gördükleri nükleusa geç ederler. Bu standart sinyal yolu, EMT programlarının çeşitli yollarında katkıda bulunan ERK, p38 MAPK, PI3K-AKT ve RHO-like GTPaz gibi çeşitli diğer sinyal yollarıyla işbirliği yapar. Gelişim boyunca TGF β bağımlı EMT, palatal birleşme ve endokardial yastıkların oluşumu için gereklidir. İlâveten TGF β sinyali yara iyileşmesi ve fibrosisde önemli bir rol oynar. Yüksek TGF β düzeyleri böbrek karaciğer ve akciğerde fibrosis ile sonuçlanan EMT benzeri değişiklikleri destekler. Karsinomlara gelince TGF β , mezenkimal fenotip kazanılmasını, invazyon ve metastazı destekler. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, in vitro çeşitli karsinom hücre hatlarında EMT'nin aktivasyonu için iki SMAD (SMAD2-SMAD3 ve SMAD1-SMAD5) yolu kombinasyonunun gerekli olduğu gösterilmiştir. TGF β bağımlı SMAD kompleksleri E- kadherini azaltan Snail, Slug, Zeb 1, ve Twist transkripsiyonel faktörleri ve mezenkimal genleri (vimentin, fibronektin) transkripsiyonel olarak aktive eder [125]. EMT'nin ana düzenleyicileri olarak çeşitli transkripsiyon faktörleri tanımlanmıştır. Bunlar; Snail faktörleri (SNAI1 aynı zamanda Snail olarak bilinir, SNAI2 ise aynı zamanda Slug olarak bilinir), bHLH faktörleri (E12 ve E47, Twist1 ve Twist2) ve Zeb faktörleri (Zeb1 ve Zeb2)'dir [19]. Aynı zamanda, Snail apikal-bazal polariteyi ve sıkı bağlantı oluşumunu düzenleyen genlerin ekspresyonunu baskılamada iyi bilinen bir göreve sahiptir. Ek olarak, mezenkimal genleri direk olarak uyarmak için Snail, bir transkripsiyon aktivatörü olarak işlev görebilir [20]. Basic helix-loop-helix (bHLH) transkripsiyon ailesine ait Twist1 ve Twist2, geniş bir gelişimsel ve patolojik süreçler dizisinin ana düzenleyicileri olarak işlev görürler. Twist, epitel genlerinden E-kaderini azaltırken, N-kaderin ve vimentin gibi mezenkimal genlerin ekspresyonunu aktive eder. Zeb1 ve Zeb2, Zeb transkripsiyon faktör ailesinin iki üyesidir, doğrudan E-box elemanlarına bağlanır ve E-kadherin ekspresyonunu baskılar. Zeb proteinleri E-kadherine ek olarak, sıkı bağlantı genlerinin ve hücre polarite komponentlerinin ekspresyonunu doğrudan baskılayarak EMT'yi harekete geçirir [20]. Böylece Snail, Slug ve Twist'i artırır, Snail ve Twist, Zeb1 ve Slug'ı uyarır ve Snail'de Zeb2'yi uyarır [126]. EMT-TF'leri pozitif bir feedback döngü oluşturan otokrin sinyallerin oluşumunu etkinleştirerek TGF β ligandların ekspresyonunu artış yönünde düzenleyebilir, böylece birkez aktive edilen EMT programlarının ekspresyonunun sürdürülmesinde

hücrelere yardım eder. Bu TGF β yolu üyelerinin ve EMT transkripsiyon faktörleri arasındaki çift yönlü varoluşun önemini gösterir. Örneğin Snail transkripsiyon faktörleri renal epitel hücrelerinde TGF β 'in ekspresyonunu uyarır. Ek olarak Snail ve Slug'ın birlikte ekspresyonu TGF β yolu genlerinin ekspresyonunu artırır, meme kanserinde ve TGFBR2 bölgesinde histon asetilasyonu artışına öncülük eder [125].

Kanser ve EMT

Diğer EMT tiplerinin aksine kanserde görülen EMT agresif ve kontrolsüzdür. Hem EMT hem de bunu tersi olan MET, kanser metastaz ve ilerlemede merkezi rol oynar. Metastaz kanser hücrelerinin primer bölgelerinden ayrılıp birkaç aşamayla ikincil bir bölgeye yerleşmesidir. Kanser hücrelerinden dökülen hücrelerin çok az bir kısmının ikinci bir bölgede metastatik odaklar oluşturma potansiyeli vardır. Bu hücrelerin kanser kök hücrelerinin bir alt grubu olduğu düşünülmektedir. KKH'ler diğer kanser hücrelerinden farklı olup ölümsüz tümör başlatıcı hücrelerdir. Tümör büyümesini ve ilerlemesini sağlarlar ve asimetric bölünmeler geçirerek ve farklılaşarak kanser içindeki tüm farklı hücre fenotiplerini oluştururlar. Birçok kanser tipinde KKH'leri için spesifik belirteçler olduğu için tanımlanabilirler ve sabit ve hareketli olmak üzere iki tipi vardır. Sabit KKH'leri primer tümörün ilerlemesinden hareketli olanlar metastazından sorumludur.

EMT'nin uyarılması, metastatik kanser kök hücrelerinin (MKKH) primer bölgeden ayrılarak vücutta yayılmasını sağlamak için sayısız özellik kazandığı bir süreçtir. İkincil bölgeye yerleşen bu hücreler MET geçirerek orada kolonize olurlar. EMT sırasında hücre yüzeyi değişir ve hücreler arası bağlantılar bozulur, komşu hücreler arasındaki temas zayıflar ve bu durum hücrenin epitelden salınmasına neden olur. EMT sırasında protein kinaz C (PKC) yolağının aktivasyonu veya bazı onkojenik mutasyonlar, okludin ve claudin ekspresyonunda azalmaya, bunun sonucunda "sızıntılı" ve geçirgen sıkı bağlantılara desmozom ve diğer yan yüz bağlantıların bozularak hücrelerin birbirinden ayrılmasına yol açar. Dahası, E-kadherinin azalması, nöral spesifik bir kaderin olan N-kadherinin artışı, KKH'lerinin mezenkimal dönüşmesine neden olarak hücre metastaz ve invazyonunu kolaylaştırır. MKKH'ler birincil dokudan ayrıldıktan sonra çevresindeki dokuya invaze olmaya başlarlar. Dokuya lokal invazyon, EMT'ye giren hücrelerin metastatik

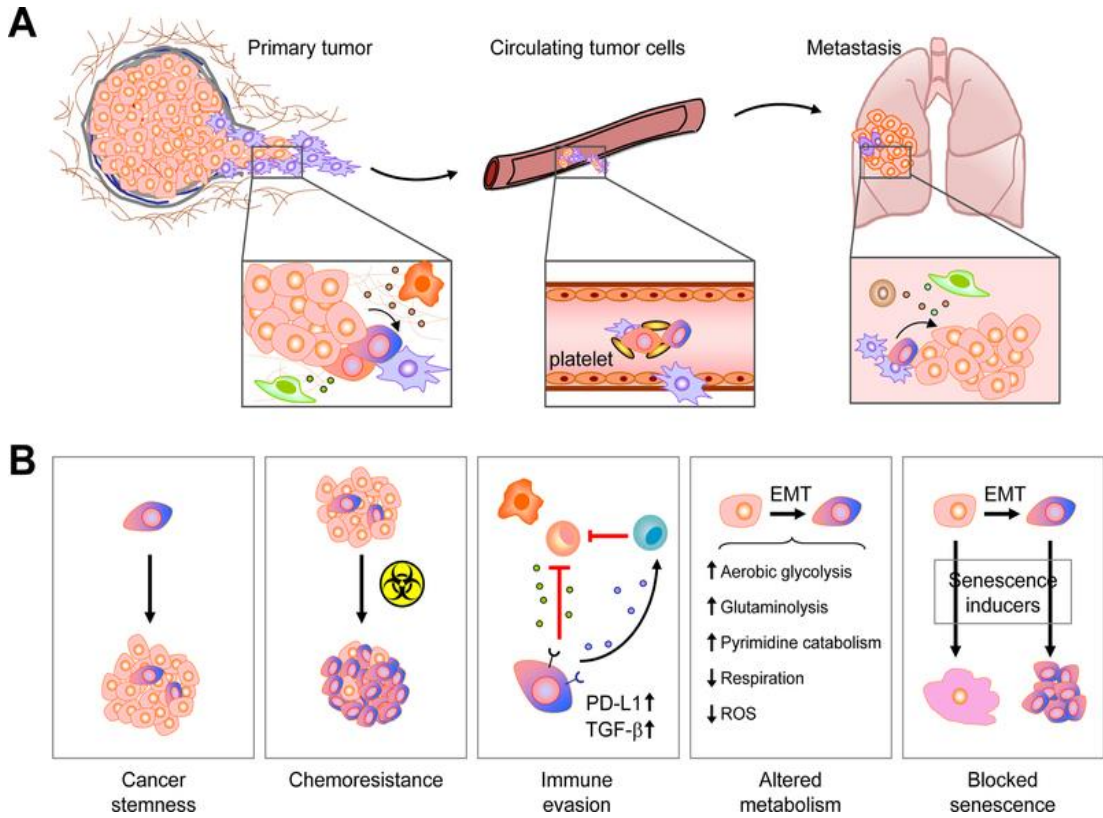
potansiyelini şekillendirmede erken bir adımdır. Bitişik bariyerleri geçmek için tümör hücreleri farklı stratejiler uygularlar. Ya tek tek ya da bir lider hücre öncülüğünde toplu göç edebilirler. Toplu göçte öncü hücre daha mezenkimal karakterdedir onu takip eden hücreler kısmi EMT geçiren ya da epitelooid yapıda hücrelerdir. MKKH'ler tipik olarak tümörün ön kısmında bulunur bu durum onların çevredeki dokuyu daha kolay istila etmelerini ve daha hızlı kan veya lenfatik damarlara girmelerini sağlar. Çevreleyen stromayı istila ettikten sonra, MKKH'ler, endotel bariyerini geçmek ve dolaşıma girmek için endotel bağlantılarını bozma işlemi olan transendotelial göç (TEM) geçirirler. Bunun için, MKKH'ler, mevcut vaskülariteye bağlanmak için yeni kan damarlarının oluşumunu başlatırlar. MKKH'ler dolaşıma girdiklerinde birçok ölümcül engelle karşılaşılır ve birçok tümör hücresi bu engellere yenik düşerken, MKKH'lerin benzersiz savunmaları vardır.

MKKH'ler trombin eksprese ederler ve trombositler üzerindeki koagülasyon faktörlerini bağlayarak kendilerini koruyan emboli agregatları oluştururlar, bu durum metastatik hücreyi hem immün sistemden korur hem de hemodinamik kuvvetlerinden kaynaklanan hücresel stresi azaltır. Aynı zamanda MKKH'ler tümör hücresi kaynaklı trombosit agregasyonu (TCIPA) salarak trombositleri uyarırlar. Trombositler de TGF β ve PDGF içeren a-granülleri salgırlar ve TGF β daha sonra SMAD sinyal yollarını etkinleştirirken, PDGF Notch yolunu etkinleştirecektir ve her ikisi de mezenkimal özelliklerin korunmasını devam ettirirler. Metastatik hücreler, toplu olarak göç eden hücreler veya dolaşım içinde biriken tek tek hücreler tarafından oluşturulan kümeler halinde de seyahat edebilir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmaya göre bu kümelerin, tek hücrelerden daha üstün hayatta kalma ve daha fazla metastatik potansiyeli olduğunu göstermişlerdir. Dolaşımdaki metastatik hücreler, kendilerine yakın boyuttaki kılcal damarlarda yavaşlarlar ve genellikle yakalanmadan önce endotel boyunca yuvarlanırlar. Kanser kök hücrelerinin endotele bağlanmasına metastatik hücrelerden eksprese edilen CD44 ve MUC1 ve integrinler, endotel hücrelerinden eksprese edilen selektinler, hücreler arası yapışma molekülü (ICAM-1) ve galektin 3 ile bağlanması aracılık eder. MKKH'ler daha sonra, endotel hücre bağlantılarının açıklıklarını indüklemek için sinyal yollarını aktive eden faktörleri salgılayarak endotel arası göçü başlatacaktır. Örneğin, erken

EMT'de kanser hücresi ayrılmasında görüldüğü gibi, metastatik hücre tarafından VEGF veya TGF β 1'in salgılanması, endotel hücreleri arasındaki E-kaderin, β katenin kompleksini bozar, ekstrasellüler matriksi invaze etmek için intravazasyona benzer şekilde hücre iskeleti yeniden düzenlemesine izin verir. MET, EMT sırasında meydana gelen değişiklikleri tersine çevirme işlemidir, burada metastatik hücre epitel hücre özelliklerini geri kazanır ve ikinci yerleştiği ortama uyum sağlamasını ve orada çoğalmasını sağlar. Doku kolonizasyonunu destekleyen MET süreci hakkında nispeten az şey bilinmektedir, ancak dahil olan mekanizmaların çoğunun EMT'ye bağlı olduğu açıktır. Twist, Snail1 ve Snail2 gibi birkaç EMT transkripsiyon faktörünün azalması hücrelerin epitel özelliklerini yeniden kazanmasını ve hücre büyümesini ve kolonizasyonunu artırır. MKKH'leri kolonizasyon oluşturmak ve primer tümöre benzeyen ikinci bir tümör oluşturmak için mezenkimal özelliklerini kaybeder yani MET geçirir. Dolaşan tümör hücreleri (CTC) kanda bulunan, mezenkimal özellikte ama henüz ikinci bir tümör oluşturmamış öncü hücre oldukları düşünülür. Bu hücreler tek başına damar dışına göç ettiklerinde monoklonal metastazlar yaparken, toplu göçte ya da tekli bir alana tekli hücre göçünde poliklonal metastazlar görülür. CTC'lerin ölçüm ve karakterizasyonu yüksek prognostik öneme sahiptir. CTC'ler kanserin ilerleyişi, prognoz, nüks ve olası ilaç direnci hakkında bilgi verir ve kişiselleştirilmiş terapötik bir tedaviye olanak sağlar. Henüz metastaz gelişmemiş kanserlerde CTC'lerin belirlenmesi kötü prognozu gösterir. Bu yüzden şuan da birçok klinik çalışmada kanser ilerlemesi ve hayatta kalma göstergesi olarak kullanılmaktadır. CTC'ler sitometrik veya nükleik asit tekniklerle karakterize edilebildiği için izole edilen CTC'lerin EMT özellikleri incelenmiş ve EMT'nin hematojen yayılımı ve metastatik potansiyeli teşvik ettiği gözlemlenmiştir. Kanser tedavisi sırasında gelişen kemorezistans MKKH ve CTC'lerin tedaviden kaçmalarına ve tedavi sonrası tekrarlayan tümör büyümelerine yol açar. Ortaya çıkan kanıtlar, EMT'nin birden fazla kanser türünde kemorezistansa katkıda bulunduğunu ve kemorezistansın üstesinden gelmek için potansiyel bir hedef olarak hizmet edebileceğini göstermektedir. Genetik olarak tasarlanmış fare modellerini kullanan iki ayrı çalışma, primer ve metastatik tümör hücrelerinin hem göğüs hem de pankreas kanserlerinde EMT'ye bağlı bir şekilde kemoterapötik ilaçlara daha dirençli hale geldiğini

göstermektedir. Bu çalışmalar, kemorezistansla EMT'nin ilişkisini gösteren kanıtlar sağlar ve kanser tedavisinde EMT'yi hedefleme potansiyelini vurgular.

CD8 + ve NK hücreleri gibi immünsistem hücreleri güçlü antitümör işlevlerine sahiptir. tümör hücreleri genellikle immün sistemden kaçmak ve immünosupresif bir tümör mikro çevresi oluşturmak için bir mekanizma geliştirirler. Birkaç çalışma, EMT geçiren tümör hücrelerinin immünsistemin antitümör etkisine daha fazla direnç gösterdiğini bildirmiştir. EMT ve immündirenç arasındaki ilişki bilinmesine rağmen antitümör direnci sağlayan kesin mekanizmalar hala daha fazla araştırma gerektirmektedir [122].

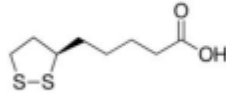


Şekil 5. EMT ve MET'in kanser ilerlemesi ve metastazındaki çeşitli işlevleri [127]

ALFA LİPOİK ASİT (ALA)

Tioktik asit olarak bilinen ALA, yapısında kükürt içeren doğal olarak oluşan kısa zincirli bir yağ asitidir [128]. ALA tüm prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde

bulunan doğal bir antioksidan bileşiktir. İnsanlar, hayvanlar ve bitkiler tarafından az miktarda sentezlenir. ALA, insanlarda pirüvat dehidrojenaz (PDG) ve α -keto gluterat dehidrojenaz (KGDG) kompleksi gibi enerji metabolizmasında yer alan birkaç mitokondriyal multi enzim kompleksi için esansiyel bir ko-faktör olarak davranır [129]. Diyabet, hipertansiyon gibi bir çok hastalıkta, Down sendromu, Alzheimer hastalığı gibi bilişsel hastalıklarda ve meme kanserini içeren bazı kanser tiplerinin yönetiminde kullanılır. ALA'nın terapötik bir ajan ve besin takviyesi gibi alternatif bir ilaç olarak kullanımı hızla büyüyor. ALA'nın antioksidan etkisi, ROS'u temizleme ve endojen antioksidanları yenileme kabiliyetinden dolayı hücresel büyümede büyük bir rol oynar. ALA serbest radikal temizleyicisi olarak eşsiz bir karakter gösteren ve pek çok oksidatif stres ve inflamatuvar yolağı düzenleyen dihidrolipoik asit (DHLA)'e indirgenir. Önceki çalışmalar hücre içi redoks dengesinin hücresel büyümeyle bağlantılı olduğunu ve karsinogeneze kritik bir rol oynadığını gösterdi. ALA'nın hücre proliferasyon inhibisyonu ve apoptoza öncülük eden, kanser hücreleri tarafından biriktirilmiş yüksek oksidatif stresi azalttığı öne sürüldü.



Şekil 6. Alfa Lipoik Asit kimyasal yapısı [128]

Proliferasyon ve Apoptozda Lipoik Asitin Etkileri

Yapılan çalışmalar dışardan ALA uygulamasının çeşitli kanser tiplerinde proliferasyonu inhibe ettiğini göstermiştir. Tümör proliferasyonunun PI3K/Akt, ERK ve mTOR gibi onkogenik sinyal yollarının aktivasyonuna öncülük eden, epidermal büyüme faktör reseptörünü (EGFR) içeren farklı tirozin kinaz reseptörlerinin (TKRs) aşırı ekspresyonundan dolayı olduğu iyi bilinmektedir. İlginç bir şekilde bu proliferatif yolların aşağı doğru efektörleri kanser hücre proliferasyonunun kısıtlanması tarafından antitümör aktivitelere katkıda bulunan çeşitli kanser tiplerinde ALA tedavisi tarafından inhibe edilir. Birlikte alındıklarında ALA, EGFR sinyal yolunu hedef alarak kritik bir antiproliferatif olarak rol oynar. İnsülin benzeri büyüme faktör

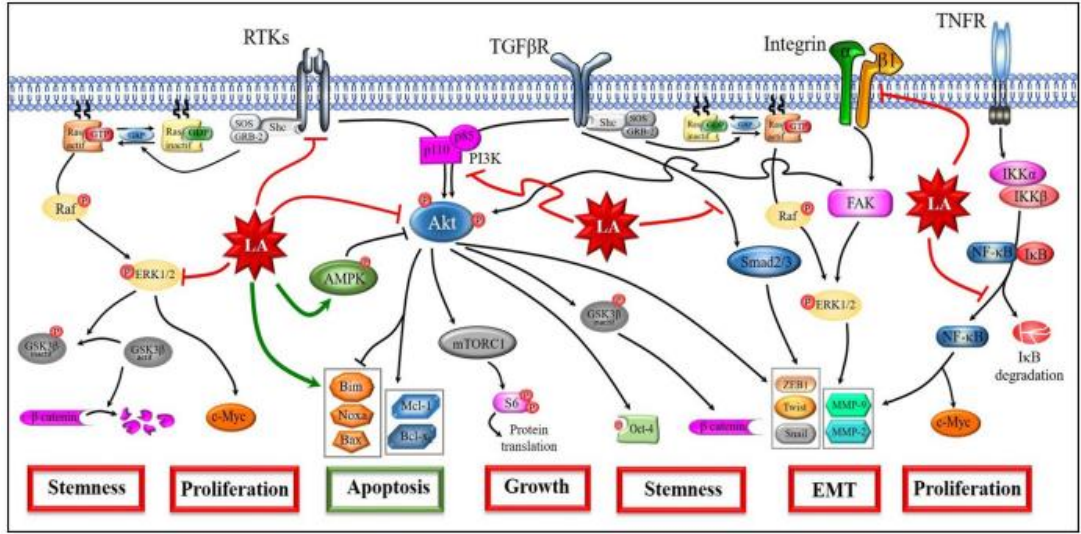
reseptör 1 gibi, ALA tarafından etkilenen diğer TKR'lerini ortaya çıkarmak için ileriki çalışmalar gereklidir. Ayrıca, ALA'nın tümör oluşturduğu iddia edilen bazı protein tirozin fosfatazları hedeflediği gösterilmiştir. Gerçekten, meme kanseri hücrelerinde ALA'nın antikanser tedavisi için potansiyel hedef sunan ve meme kanseri hücrelerinde sıklıkla aşırı eksprese olan PTP1B ve SHP2 aktivitesini azaltarak canlılıklarını azalttığı gösterildi. Ayrıca, ALA hücre siklus durmasına öncülük eden pek çok kanser türünde siklin bağımlı kinaz inhibitörleri p27kip1 ve p21Cip1'i artırarak düzenlenmesini teşvik eder. AMPK enerji dengesini koruyan enerji seviyesinin büyük bir sensörüdür. Fosforilasyonla aktivasyonu azalan bir Akt efektörü olan mTOR protein kompleks inhibisyonu tarafından tümör progresyonunu engellediği bildirilmiştir. İnhibitör rolüne ek olarak ALA, AMPK aktivasyonunun güçlendirilmesine yol açar ve ardından Akt yolunun inhibisyonunu güçlendirir, böylece kanser hücresi proliferasyonunu azaltır.

Antiproliferatif rolüne ek olarak, ALA doza bağımlı olarak farklı tip kanser hücrelerinin apoptozunu teşvik eder. Önceki bilgiler ALA'nın anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler arasındaki dengeyi düzenleyerek çeşitli kanser hücrelerinde apoptozu destekleyen ROS'u oluşturabildiğini gösterdi. Gerçekten mitokondriyal anti-apoptotik proteinler Mcl-1, bcl-2 ve bcl-XL, birkaç over, akciğer ve meme kanseri hücre hattında ALA tedavisini takiben, konsantrasyona bağlı bir şekilde düzenlenmesi azaldı. Tersine ALA tedavisine cevap olarak pro-apoptotik proteinler Bim ve Noxa'nın ekspresyonu artar. Bütün bu olaylar hücre ölümüne yol açar. Lösemi ve meme kanserinde artan kaspaz-3 aktivitesiyle ALA tedavisinden sonra Bax/bcl2 oranı belirgin şekilde artar. Hepatoma kanser hücrelerinde yapılan bir başka çalışma, ALA'nın kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivasyonu ile intrinsik apoptotik yolu tetiklediğini gösterdi. Bu bulgular doğrultusunda kolon kanserinde yapılan önceki çalışma, ALA'nın NF- κ B sinyalini inhibe ederek WT p53 proteinini stabilize ettiğini meydana çıkardı. WT p53 pro-apoptotik gen transkripsiyonunu uyararak böylece intrinsik apoptozu tetikleyen bir apoptoz aktivatörüdür. Ancak, Dörsam ve arkadaşları ALA'nın kolorektal kanserde P53 stabilizasyonundan bağımsız hücre ölümünü tetiklediğini gösterdi. Aynı zamanda, akciğer kanseri hücrelerinde yapılan bir önceki çalışma ALA tedavisinin nekroz ve otofaji bağımlı hücre ölümüne

öncülük eden Apoptoz-indükleyici Faktör (AIF) tarafından kaspaz bağımsız mekanizmalar aracılığıyla diğer hücre ölüm yollarını provake ettiğini önerdi.

Metastaz, İnvazyon, Migrasyon ve EMT’de Alfa Lipoik Asitin Etkisi

Metastaz kaskadı çok basamaklı kompleks bir süreçtir, ilk kritik basamak ekstrasellüler bariyer boyunca hücre invazyonu ve bazal membran penetrasyonudur, bunu vasküler infiltrasyon, damar dışına çıkış ve uzak organ kolonizasyonu takip eder. Bu olaylar TGF β ve the fokal adezyon kinase (FAK) isimli iki hayati yolak tarafından düzenlenir. Bir kez bu yollar aktive olduğunda, vimentin, Slug, Twist ve Snail gibi EMT-TF’ler uyarılır. Bu transkripsiyon faktörleri, E-kadherini azaltarak ve birkaç EMT belirteçlerinin aşırı ekspresyonunu tetikleyerek EMT’ye yol açar. Son bir çalışmada MDA-MB-231 ve 4T1 isimli iki meme kanseri hücre hattında, ALA’nın Snail, vimentin ve Zeb gibi TGF β bağımlı EMT belirteçlerini bastırarak hücre migrasyonunu azalttığı göstermiştir. Bu belirteçlerin ekspresyonu diğer kanser tiplerinde ALA tedavisi üzerinden azaltılır. Ayrıca, TGF β 1 sinyali Smad aktivasyonuna yol açtıktan sonra EMT sürecinde olduğu bilinen Smad yolu, ALA tarafından inhibe edilir. Topluca, bu sonuçlar EMT yi inhibe ederek ALA’in invazyon ve migrasyonu bastırdığını göstermiştir. Ek olarak, kanser hücre invazyonu boyunca invadopodia olarak adlandırılan küçük çıkıntılar integrin bağımlı bir şekilde ekstrasellüler matrikse hücre yapışmasını kolaylaştırır. Bu hücre yüzey proteinlerinin FAK yolunu aktive ettiği bilinir. ALA tedavisi, kanser hücre invazyon ve migrasyon inhibisyonuna öncülük eden β 1-integrin ekspresyonunu aşağı yönde düzenlenmesinden dolayı bu çıkıntılarının oluşumunu bozar. İnvazyon, tip IV kollojeni azaltan ve tümör hücre invazyonu ve malignitede kritik rol oynayan özellikle MMP-2 ve MMP-9 adlı iki metalloproteinazdan destek alır ve bir kez daha ALA meme kanseri hücre hatlarında MMP-2 ve MMP-9 MRNA ekspresyonunu doza bağımlı olarak azaltarak invazyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu bulgulara bağlı olarak, ALA ayrıca E-kadherini artırıp, N-cadherin, vimentin ve aktifleşmiş β -catenini azaltarak EMT sürecini inhibe eder [129].



Şekil 7. Tümör oluşumunda yer alan bazı sinyal yollarında lipoik asitin etkileri [129]

MATERYAL VE METOT

ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİMYASALLAR VE SARF MALZEMELER

RPMI Medium 1640 (Capricorn), Fetal Bovin Serum (Bio.ind LOT: 1954370), Penicillin-streptomisin (Capricorn LOT: CP-214079), Phosphate buffered saline (PBS) (Capricorn), Trypsin-EDTA (Bio.ind), Trizol (Ambion), İsoopropanol (Sigma) , Etanol (Isolab), Metanol (Isolab) , Primerler (Sentebiolab), Dimetil sülfoksit (DMSO) (Roche), DNAaz/RNAse free su (Invitrogen), Steril kültür kapları (Petri), 6 kuyucuklu hücre kültür kabı (Jetbiofil), 96 kuyucuklu hücre kültür kabı (Greiner), 96- Kuyucuklu PCR Array Plak (Thermo), T25 flask ve T75 Flask (LLG), Falcon Tüpü (VWR), RIPA (Milipor), E-cadherin, anti-vimentin, Snail monoclonal, SLUG, Twist ,Zeb1, Beta catenin antikör (Santa- Cruz), alfa Lipoic acid (Sigma LOT: WXBD2325V), 12 well chamber,removable (Ibidi), Recombinant Human TGF-beta-1 (RayBiotech LOT: 230-00653)

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

ÇALIŞMALARDA KULLANILAN CİHAZLAR

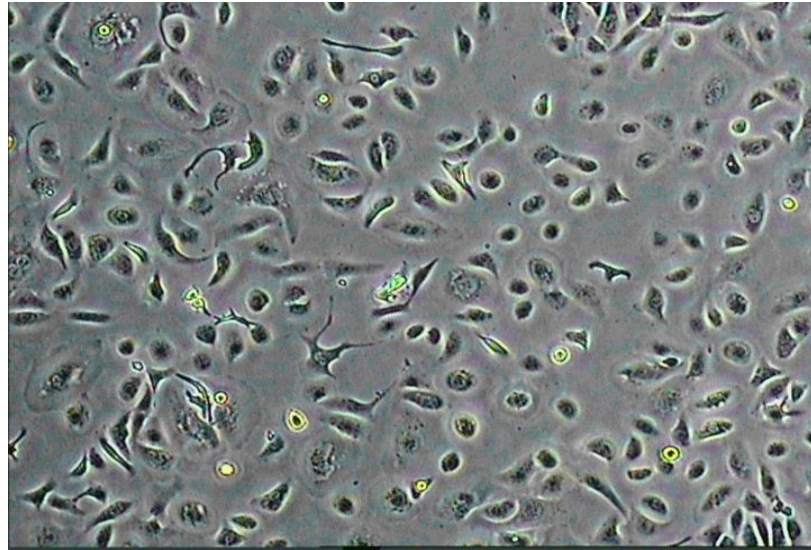
Biological Safety Cabinets Class II Laminar Flow (Nuair), CO₂'li inkübatör (Nuair), Otomatik mikropipetler (10, 20, 100, 200, 1000 µl'lik) (Biohit), inverted Mikroskop (Olympus), Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 (Thermo), , -20 Derin Dondurucu (BEKO), -80°C Dondurucu (Nuair), No Frost Buzdolabı (BEKO), Santrifüj (Hettich Zentrifugen), Mikro Santrifüj (Hettich Zentrifugen), Soğutmalı Santrifüj (Hettich Zentrifugen), Hassas Terazî (Denver Instrument), RT- PCR (Thermo Scientific PikoReal 96 Otoklav (Nuve), Vorteks (IKA Yellow Line), Güç Kaynağı(Bio-Rad),

ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİTLER

Cell Proliferation Kit (XTT) (Sciencell, LOT: 2046899), Matrigel Invasion Chamber (Corning, LOT:7338003) ,cDNA Synthesis Kit (High Capacity) with Rnase Inhibitor (A.B.T LOT: W4F0121-C4), 2X qPCR SYBR-Green MasterMix (without ROX) (A.B.T LOT: W2C0221-Q7), DAB Chromogenic, Substrate Kit (Thermo LOT: HD57664), Anti-Polyvalent,HRP Sekonder Kit(Thermo LOT: PHL945)

SKOV-3 HATTININ TEMİNİ VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

SKOV-3 hücreleri iyi diferansiye olmuş insan over adenokarsinom hücreleridir. Çalışmamızda kullanılan hücreler daha önce ATCC'den alınan ve çoğaltılıp dondurularak saklanan kendi hücre stoklarımızdan kullanılmış olup, deneyler Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvarında yapılmıştır.



Şekil 8. Çalışmamızda kullandığımız SKOV-3 hücrelerinin 4X inverted mikroskopik görüntüsü.

SKOV-3 hücrelerinin rutin kültür basamakları; hücrelerin flask içinde kültür ortamına ekilip çoğaltılması ve belli bir yoğunluğa erişince pasajlanması, ekim için

sayılması ve deneyde kullanılacak uygun kültür plakalarına ekilmesi, dondurulması ve çözülmesini kapsamaktadır.

In vitro koşullarda yapılan hücre kültürü için kullanılan besiyeri, hücrelerin in vitro koşullarda yaşamaları, büyüme ve çoğalmaları için ihtiyaç duydukları maddeleri içermelidir. Çalışmamızda kullanılan besi ortamı %10 fetal bovin serum (FBS), %1 L-glutamin, penisilin (100 U/ml) + streptomisin (100 µg/ml) içeren RPMI 1640 besi yeridir. Hücrelerin canlılığı, çoğalması, 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 inkübe edildi, % 80-90 yoğunluğa eriştiklerinde deneylere başlandı.

Hücreler ilk önce T25 flaskta üretildi, çoğaltılma ve pasajlanma işleminde; RPMI 1640 besi yeri ile T75 flaska ekildi ve 37°C de % 95 nem ve % 5 CO₂'li etüvde iki günde bir besi ortamları değiştirilerek inkübe edildi. Monolayer olup, tutunarak üreyen hücrelerin pasajlanması için ilk olarak yapıştıkları yüzeyden kaldırılmaları gerekir. % 80-90 yoğunluktaki flasklar öncelikle PBS ile yıkanıp ölü hücrelerden ve hücre atıklarından iyice arındırılıp aspire edildi, sonrasında tripsin ilave edilerek hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlandı. Flask içerisindeki hücre-ortam karışımı 15 ml'lik falkonlara aktarılıp, 1500g'de 4 dakika santrifüj edilip üzerindeki süpernatant alındı, dipte pellet oluşturan hücreler 5 ml besiyerinde karıştırılarak uygun miktarda flasklara ekimi gerçekleştirildi, yeniden flaska yapışıp çoğalmalarının sağlanması için inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin kaldırılıp flaska ekilmeden önce hücre sayımı gerçekleştirildi. Hücre sayımı için tripan mavisi boyası kullanıldı. Tripan mavisi mavi renk veren bir boya olup, ölü hücrelerdeki membran hasarına bağlı ölü hücrelerin membranlarından geçebilir ve ölü hücreler tripan mavisi ile mavi (boya almış) renk alırken, canlı hücreler boya almamış olarak yani beyaz görülür. Ependorfta, 5 µl hücre süspansiyonunun içine 45 µl tripan mavisi eklenerek hücreler 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 yapıldı, çalışmaya göre çeşitli sayılarda ekim gerçekleştirildi.

Hücreler DMSO kullanılarak, kriyotüpler içerisinde dondurularak saklandı. Hücreler dondurulmak için, buldukları flasktan tripsin ile kaldırıldı ve santrifüj

işlemlerinden geçtikten sonra, 2 ml hacimli kriyotüplere besiyeri ile süspanse hücre karışımından 950 mikrolitre, DMSO'dan (%10 DMSO) 50 mikrolitre konularak ilk önce +4°C'de on dakika, daha sonra – 20°C'de bir saat bekletildi, daha sonraki çalışmalar için -80°C'de saklandı.

Dondurulmuş hücrelerin yeniden çözülüp ekilmesinde, kriyotüpteki hücreler hızlı bir şekilde 37°C de su banyosunda çözülüp biraz taze besi yeri eklenerek önce santrifüj edildi, DMSO içeren besi yeri uzaklaştırıldı. Ardından yeni besi yeri eklenip, kültür kaplarına ekilip, uygun kültür ortamında inkübe edildi.

HÜCRE CANLILIĞI TESTİ (XTT TESTİ)

ALA'nın değişen dozlarda SKOV-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 ALA % 98 saflıkta temin edildi.

XTT (2,3-bis (2-methoxy-4 nitro-5- sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) suda eriyebilen bir madde olup, canlı hücrelerde formazon bileşenlerine indirgenerek turuncu renk alır. Oluşan boyanın yoğunluğu bir spektrometrede okutulmakta ve metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılı olan formazon oluşumu sayesinde hücre canlılığı testi sonuçları hızlı bir şekilde değerlendirilebilmektedir.

Kullandığımız maddenin sitotoksitesi ve doz ile zamana bağlı etkisi “BI (Biological Industries) Cell Proliferation Kit XTT based Colourimetric Assay (REF: 20-300-1000, LOT: 2046899)” ile yapıldı. Toz halinde bulunan ALA çeşitli dozlarda %10 serumlu tam besi ortamında 1/1000 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 plak içine her kuyucukta 10.000 SKOV-3 hücresi olacak şekilde 100 µl büyüme medyumu olan RPMI içinde ekildi. Hücreler 37 C°de % 5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. 24. saatin sonunda medyum aspire edildi. Ardından ALA için; 25 µM, 50 µM, 100 µM, 125 µM, 250 µM, 500 µM, 750 µM, 1000 µM çalışma konsantrasyonları %10 FBS içeren tam besi ortamı içinde

hazırlandı. Hazırlanan dozlar 100 µl besi yeri ortamı içinde kontrol kuyucukları dışındaki kuyucuklara uygulandı. Aynı zamanda zamana bağlı etkiyi de araştırmak için 24, 48 ve 72. saatler için aynı dozlar 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 150 µl ilave edildi (Kit kullanımına göre). Ardından hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 4 saat inkübe edilip çalışılan grupların absorbans değerleri ELİSA 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 sonuçlar AAT Bioquest programı kullanılarak IC₅₀ değerleri hesaplandı.

TRİZOL REAGENT İLE TOTAL RNA İZOLASYONU

Çalışmamızda, SKOV-3 hücrelerinde E- kadherini düşürüp vimentin düzeyini artırarak EMT modelini kurmamızı sağlayan uygun TGF β1 dozunu bulabilmek amacıyla 10 ng/ml, 50 ng/ml ve 100 ng/ml dozlarında ve 24, 48, 72 ssat süreyle TGF β1 uygulanan SKOV-3 hücrelerinde gen düzeyinde ekspresyon değerlendirmesi yapabilmek amacıyla, RNA izolasyonu yapıldı. RNA izolasyonu sonrası her bir TGF β grubu için ayrı ayrı cDNA üretildi ve RT-PCR yapıldı. RT-PCR sonuçlarına göre en uygun doz olarak 72 saat 100 ng/ml, bulundu. Daha sonra. ALA için XTT ile tespit edilen IC₅₀ dozu, TGF β için de 100 ng/ml 72. Saat dozu alınarak, dört farklı deney grubu oluşturuldu. Hem TGF β dozu belirlerken hemde uygun TGF β dozu bulunduktan sonra oluşturulan deney gruplarında, gen düzeyinde ekspresyon değerlendirmesi yapabilmek amacıyla RNA izolasyonu aşağıda anlatıldığı şekilde yapıldı.

1. 6 kuyucuklu plaklara, her kuyucuk başına 3×10^5 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. SKOV-3 hücrelerine 10 ng/ml, 50 ng/ml ve 100 ng/ml olmak üzere üç farklı dozda ve 24, 48 ve 72 saat olmak üzere üç farklı zamanda olacak şekilde TGF β uygulanan gruplar oluşturuldu. Asıl deney grubu için de başta kontrol olmak üzere, ALA'nın XTT ile tespit edilen IC_{50} dozu, RT-PCR ile belirlenen TGF β dozu ve bunların kombine dozlarından oluşan dört farklı deney grubu oluşturuldu ve ALA'nın IC_{50} süresi kadar inkübe edildi. Dozlar aşağıdaki gibi seçildi.

- a. Kontrol
- b. Alfa lipoik asit 219 μ M (IC_{50})
- c. TGF beta 100 ng/ml
- d. Alfa lipoik asit 219 μ M (IC_{50}) +TGF beta (100 ng/ml)

2. Hücreler 6'lık kültür kaplarından, bir plaka başına 500 μ l olacak şekilde Trizol ilavesi sonrası scraper kazıyıcı ile tamamen kaldırıldı ve ependorf tüplere (1 ml'lik) aktarıldı. Bu aşamada hücreler ependorf tüplerde -20° C de muhafaza edilebilir.

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

4. Soğutmalı santrifüj ile $+4^{\circ}$ C' de 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilip renksiz olan üst faz toplandı, ependorf tüplere alındı.

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

6. Soğutmalı santrifüjde $+4^{\circ}$ C'de 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi.

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

8. Soğutmalı santrifüjde $+4^{\circ}$ C'de 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj yapıldı.

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

10. Pelletin 40 μ l RNase-DNase free water ile çözüldü.

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazı (Thermo) yardımı ile tespit edildi. Nanodrop ile RNA örneklerinin ölçülmesinde öncelikle uygun konsantrasyonlarda (cihazın ölçebileceği RNA konsantrasyon aralığı 2-3000 ng/ μ l'dir) RNA örnekleri olmalıdır. Ardından 1 μ l RNase free water ile Nanodrop cihaz kadesi üzerine bir damla bırakıldı ve bilgisayardaki program analizi (ND1000

V3.6.0) ile kör alındı. Sonrasında RNA örneklerinden 1µl olacak şekilde pipetlenip 260-280 nm'de okuma yapıldı. Elde edilen RNA lar ependorf içinde -20 veya -80 de saklanabilir. Nanodrop cihazında 260-280 dalga boyunda ve konsantrasyon için ng/µl olarak bakıldı.

cDNA SENTEZİ

İzole edilen RNA'lardan, cDNA sentezi için cDNA Synthesis Kit (High Capacity) with Rnase Inhibitor, 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/µl)
- 4.20X dNTP mix (2.5mM each)
- 5.Random hexamer (50pM)
6. RNase free water

Total RNA: 10ng-5µg

Poly(A)+ RNA:1ng-500ng

Protokol:

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

10X Reaction Buffer---→2 µl

20X dNTP mix 1 µl

Random hexamer. 2 µl

RTase. 1 µl

RNase Inhibitor. 0,5 µl

RNase free water. 3,5 µl

(İşlemlerin hepsi buz üstünde yapıldı)

- 2.10 µl 2X RT master mix den mikrosantrifüj tüpe alındı.

- 3.10 µl RNA örneği eklendi ve 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

Bitince 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, çok sayıda örnek çalışılabilmektedir. Gerçek zamanlı RT-PCR’da ürünlerin analizi reaksiyon esnasında yapılmaktadır. Bu yüzden elektroforez, PCR ürününün mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlere gerek kalmamaktadır. Çalışmamızda 96 kuyucuklu mikropilaya okuyabilen RT-PCR sistemi kullanıldı. ALA ve TGF β muamelesi sonrasında ilgili hücre dizini kullanılarak, EMT’de rol alan genlerin (E-kadherin, vimentin, Snail, Slug, Twist, Zeb) RNA düzeyindeki ekspresyonları belirlendi. Hücre dizininden total RNA izolasyonu yapıldı ve takiben elde edilen RNA’ların miktar ve kalitesi tespit edildi. Sonrasında, total RNA’lardan cDNA Synthesis Kit (High Capacity) with Rnase Inhibitor ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bu yöntemle aynı anda ve kantitatif olarak RT-PCR (Thermo Scientific PikoReal 96) ile analiz yapılabilmektedir. Her panelde referans–housekeeping genler PCR kontrol grubunda yer alarak hedef genlerdeki rölatif değişikliği analiz etme imkanımız olmaktadır. PCR sırasında elde edilen amplikonlar, doğrudan logaritmik artışa geçtikleri döngü sayısına göre değerlendirildi. Önce konsantrasyonları bilinen GAPDH ve diğer housekeeping genlerin bir standart amplifikasyon eğrisi oluşturuldu ardından çalışılan örnekteki geçiş noktasına göre cDNA’nın rölatif miktarı kantitasyon software tarafından belirlendi. Elde edilen veriler Cq olarak kaydedildi. Analizi gerçekleştirilen EMT ile ilişkili genlerin ve referans gen olarak normalizasyonda kullanılan housekeeping genin (GAPDH) primer dizileri Tablo 3’te gösterimiştir.

Tablo 3. RT-PCR’da analiz edilen genlerin primer listesi

Genler	Primer Dizisi
E-Cadherin	F:GCCTCCTGAAAAGAGAGTGGAAG R:TGGCAGTGTCTCTCCAAATCCG
Vimentin	F:AGGCAAAGCAGGAGTCCACTGA R:ATCTGGCGTTCCAGGGACTCAT
Snail	F:TGCCCTCAAGATGCACATCCGA R:GGGACAGGAGAAGGGCTTCTC
Slug	F:ATCTGCGGCAAGGCGTTTTCCA R:GAGCCCTCAGATTTGACCTGTC
Twist	F:GCCAGGTACATCGACTTCCTCT R:TCCATCCTCCAGACCGAGAAGG
ZEB-1	F:GGCATAACCTACTCAACTACGG R:TGGGCGGTGTAGAATCAGAGTC
GAPDH	F:GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG R:ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

Gerçek zamanlı RT-PCR ile kontrol grubu ve dozların uygulanmış olduğu gruplar arasındaki hücre döngüsünde rol alan 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 4)

Tablo 4. Gerçek zamanlı polimeraz zincir 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 100 pmol luk reverse ve forward ana stokları oluşturuldu. Sonrasında 10 pmol'luk PCR stokları hazırlandı. Bunun için; 10 µl Forward, 10 µl Reverse, 80 µl Nüklease Free Water'dan alınıp 100 µl lik 10 pmol'luk PCR için hazırlanmış stok elde edildi. Hepsi deney zamanına kadar -20 °C de muhafaza edildi.

İNVAZYON KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ (MATRİGEL-İNVAZYON TESTİ)

Deney gruplarındaki hücrelerin invazyon kapasitesi 'matrigel invasion chamber' invazyon kapları (Corning) kullanılarak 24 kuyucuklu kültür plaklarında araştırıldı. Bu deney sayesinde hücrelerin in vitro şartlar altında invaziv özellikleri saptanabilmektedir. İnvazyon odacıkları 8 mikron çaplı porlar içeren matrigel matrix kaplı bir membran ile örtülüdür. Bu membran invaziv özelliği olmayan hücrelerin membranın diğer yüzeyine geçmesini engellemekte, invaziv özelliği olan hücreler ise membranın diğer yüzeyine geçebilmektedir. Bu sayede matrijel kaplı membran invaziv ve invaziv olmayan hücreleri birbirinden ayırabilmektedir.

Deneyde kısaca, 12 kuyucuklu plakaya matrigel chamber'ı yerleştirmeden önce 750 µl completed besi yeri eklendi. Dozlar completed olmayan yani içinde penicilin-streptomisin olan ama FBS olmayan besi yerinde hazırlandı. Her kuyucukta 25 bin hücre olacak şekilde FBS içermeyen besi yerinde dozlar hazırlandı. Her kuyucukta 500 µl olacak şekilde kuyucuklara dozlu hücreler uygulandı. Hücreler 48 saat 37°C'de CO₂'li inkübatörde inkübe edildi.

48 Saat sonra

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

KOLONİ OLUŞUM DENEYİ

Deney gruplarımız için dozların uygulanmasından sonra SKOV-3 hücrelerinde koloni oluşumunun nasıl etkilediğini belirlemek için, koloni oluşum deneyi yapıldı. 6 kuyucuklu plakalara kontrol ve doz grupları için kuyucuk başına 1×10^3 hücre olmak üzere triplicate hücre ekimi yapıldı. 14 gün boyunca hücrelerin 2 günde bir besiyerlerini değiştirerek 37°C 'de, % 5 CO_2 '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 5 dakika boyandı. Boyanan koloniler kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak sayılıp değerlendirildi.

WOUND HEALING (YARA İYİLEŞME) DENEYİ

Hücre migrasyonunu ve hücre-hücre etkileşimini incelemek için yapılan bir deney olan yara iyileşme deneyi, SKOV-3 hücrelerinde ALA ve TGF β maddelerinin tekli ve kombine dozlarının etkisini belirlemek için yapıldı. Wound healing deneyi için 6 kuyucuklu plakaya %100 confluent 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 yıkayıp doz grupları besiyeri içinde uygulandı. 0, 16 ve 24 saatte 4X büyütme ile resimler çekilip kontrol grubu ile karşılaştırılıp analizi yapıldı.

İMMUNOSİTOKİMYA

İmmünohistokimya herhangi bir doku veya hücre üzerinde belirli bir proteinin lokalizasyonunun gösterilmesi tekniğidir. Antijene spesifik antikorlar kullanılarak gerçekleştirilir. Aranılan proteinin miktarı hakkında bilgi vermez, sadece lokalizasyonu belirler. Horseradish peroxidase (HRP) yönteminde DAB (3,3-diaminobenzidine) substratı kullanılarak boyama yapılır. DAB tipik olarak HRP ile katalize edilen bir reaksiyonda hidrojen peroksit ile oksitlenir. Oksitlenmiş DAB, HRP'nin yerinde ışık mikroskopu kullanılarak görselleştirilebilen kahverengi bir çökelti oluşturur. Boyama işlemine başlamadan önce endojen HRP enzim aktivitesinin tüketilmesi gerekir. Deney gruplarında yedi farklı antijeni göstermek için immünohistokimya boyama yapıldı.

1. Hücreler 8 kuyucuklu chamber slide içine her bir kuyucuğa 40.000 (200 mikrolitre içinde) hücre olacak şekilde damlacık formunda ekildi.
2. Damlacık 4 saat boyunca hücrelerin çökmelerine izin vermek için inkübatör içerisinde bekletildi.
3. Daha sonra her kuyucuk içine 200 mikrolitre besiyeri eklendi ve gece boyu inkübasyona bırakıldı.
4. Ertesi gün konfluent olmuş hücrelerin üzerindeki medium aspire edildi.
5. 2 kere PBS ile yıkandı.
6. Fiksasyon için hücrelerin üzerine her bir kuyucuk için 400 mikrolitre metanol eklendi ve 10 dakika – 20' de bekletildi.
7. Sonrasında metanol aspire edilerek chamber slideler kurutuldu.
8. Hücrelerin üzerine yeterli miktarda % 3 hidrojen peroksit eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

9. Anti-Polyvalent, HRP Sekonder Kit içeriğindeki protein blocking solüsyonu örnek üzerine yeterli miktarda damlatıldı ve 5-10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

10. 1 kere PBS ile yıkandı.

11. Primer antikorlar E-cadherin, vimentin, SNAİL, SLUG, TWİST, ZEB, β catenin datasheetde yazıldığı üzere 1:100 oranında distile su ile sulandırıldı.

12. Ertesi gün 4 kere PBS ile yıkandı.

13. Anti Goat biotinlenmiş sekonder antikor örnek üzerine yeterli miktarda damlatıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

14. 4 kere PBS ile yıkandı.

15. Örnekler üzerine streptavidin peroxidase (HRP) ilave edilip 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

16. 4 kere PBS ile yıkandı.

17. DAB sustrate chromojen kitine göre, her 1 ml DAB substrate içine 2 damla DAB chromojen damlatıldı, iyice karıştırıldıktan sonra her kuyucuğa 400 mikrolitre damlatılıp karanlık ortamda yarım saat inkübe edildi.

18. 4 kere PBS ile yıkandı.

19. Karşıt çekirdek boyası olarak hematoksilen kullanıldı.10 sn hematoksilenle inkübe edildikten sonra çeşme suyunda 3-4 kere yıkandı.

20. Chamberslide forceps yardımıyla kaldırıldı ve lam üzeri lamelle entellan yardımıyla kapatıldı.

21. Işık mikroskobunda, her bir deney grubu için yedi farklı antikor triplike olmak üzere rastgele belirlenen beş alanda 200X büyütmede 300 hücre içerecek şekilde sayıldı.

VERİLERİN İSTATİSTİKSEL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

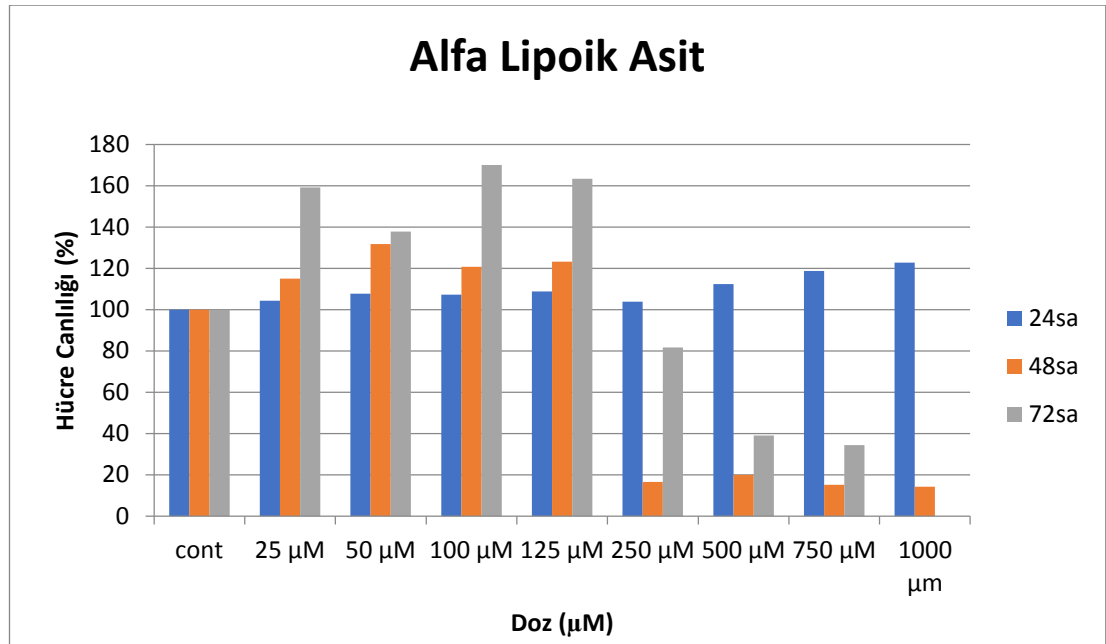
Veriler SPSS 24.0 paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma, ortanca(en küçük -- en büyük değerler) ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğunun incelenmesinde Shapiro Wilk testi kullanıldı. Bağımsız grup farklılıkların

karşılaştırılmasında tek yönlü ve çift yönlü Varyans Analizi (ANOVA, F), Post-hoc olarak Tukey kullanıldı.

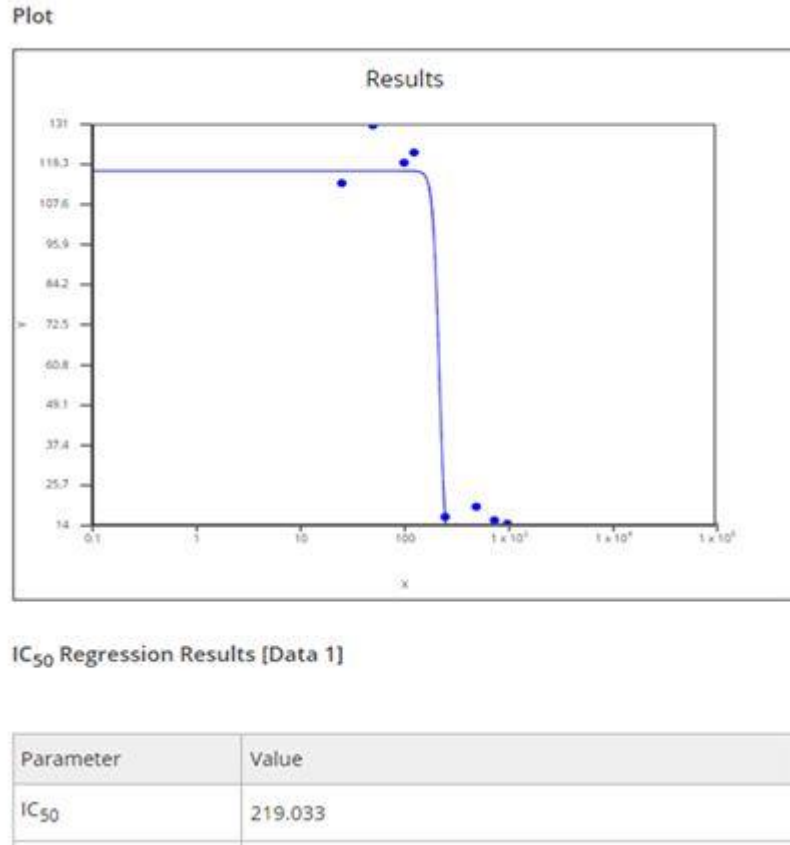
BULGULAR

XTT TESTİ SONUÇLARI

SKOV-3 hücrelerinde farklı dozlarda ALA verilerek yapılan XTT testinde, ALA'nın IC₅₀ değeri 48. saate 219,033 μ M olarak saptandı. 24 saatlik hücre canlılığı testi sonuçlarında, hücre proliferasyonunun % 50' lerin altına düşmemesi sebebiyle, 48. saatteki doz oranı IC₅₀ olarak kabul edildi. Alfa lipoik asitin değişen doz aralıkları ve zamana göre etkisi Şekil 9'da görülmektedir.



Şekil 9. Alfa lipoik asit'in çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi



Şekil 10. Alfa lipoik asit IC 50 dozunu gösteren grafik

TRİZOL REAGENT İLE TOTAL RNA İZOLASYONU SONUÇLARI

Trizol Reagent yardımı ile SKOV- 3 hücrelerinde EMT modelini kurmak için uygun TGF β dozunu bulabilmek için RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen total RNA'ların konsantrasyon ve saflık oranları Nanodrop ile saptanmıştır. Sonuçlar Tablo 5' deki gibidir.

Tablo 5. TGF β dozunu belirlemek için izole edilen RNA'lara ait konsantrasyon ve saflık değerleri

Grup	Konsantrasyon (ng/ μ l)	260/280 nm (OD)
Kontrol	179,8	1,72
TGF β 10 ng/ml	196,2	1,74

TGF β 50 ng/ml	216,9	1,76
TGF β 100 ng/ml	300,2	1,89

Daha sonra SKOV- 3 hücrelerinde EMT modeli kurmak için uygun TGF β dozu olan 100 ng/ml bulunduktan sonra, trizol reagent yardımı ile kontrol grubu, TGF β , ALA ve kombine dozları içeren SKOV-3 hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen total RNA'ların konsantrasyon ve saflık oranları Nanodrop ile saptandı. (Tablo 6)

Tablo 6. Deney grubuna ait izole edilen RNA'lara ait konsantrasyon ve saflık değerleri

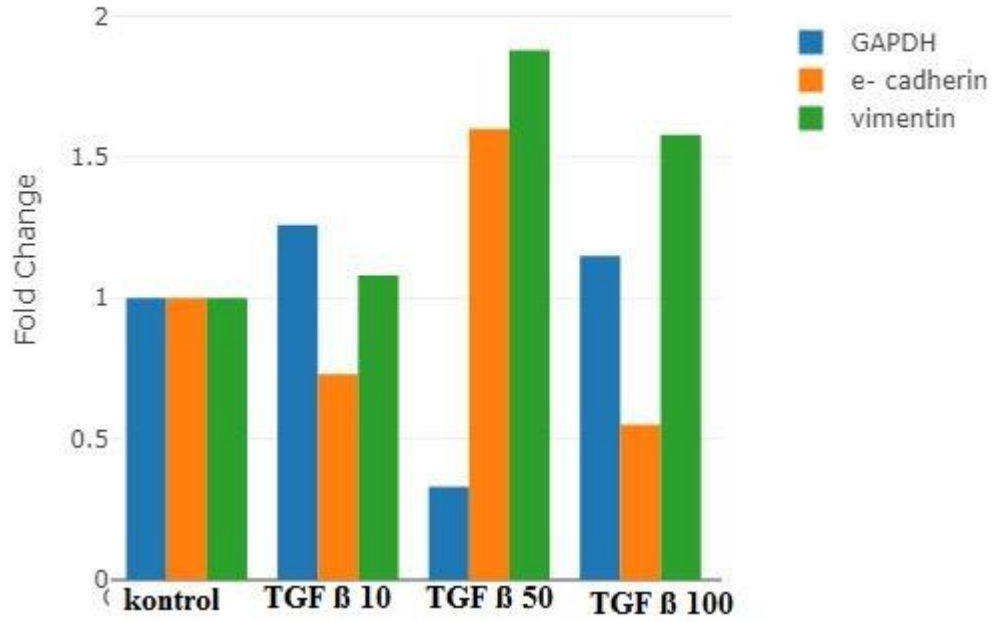
Grup	Konsantrasyon (ng/ μ l)	260/280 nm (OD)
Kontrol	637,8	1,66
TGF β 100 ng/ml	550	1,69
ALA IC 50	957,1	1,81
ALA IC50 + TGF β 100 ng/ml	243,5	1,71

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

1. Reaksiyon sonucunda elde edilen Cq değeri dikkate alınarak değişik konsantrasyonlardaki TGF β gruplarındaki gen ifadelerindeki değişim hesaplandı. Çalışmamız sonucunda araştırmamızda incelediğimiz E-kadherin ve vimentin genlerinden istatistiksel olarak anlamlı değişim görülen genler ve değişim durumları Şekil 11'de verildi.

Position	Gene Symbol	Fold Regulation (comparing to control group)					
		TGF β 10 ng/ml		TGF β 50 ng/ml		TGF β 100 ng/ml	
		Fold Regulation	p-Value	Fold Regulation	p-Value	Fold Regulation	p-Value
1	GAPDH	1.00	nan	1.00	nan	1.00	nan
2	e-cadherin	-1.73	0.285768	4.82	0.256707	-2.08	0.174974
3	vimentin	-1.17	0.334686	5.68	0.086712	1.38	0.419957

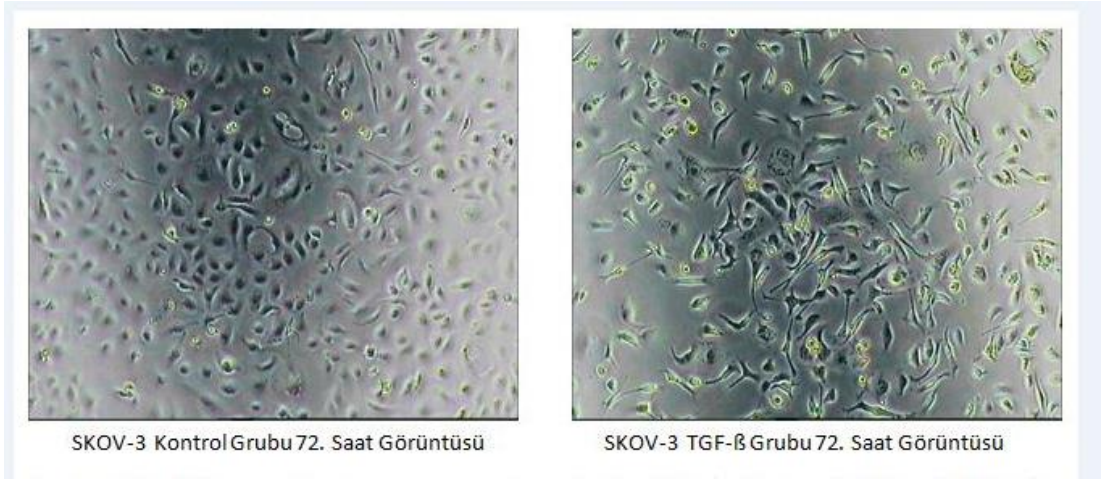
Şekil 11. RT-PCR sonucuna göre kontrol ve farklı doz TGF β uygulanan gruplar arasında değişiklik gösteren genler



Şekil 12. RT-PCR sonuçlarına göre kontrol ve farklı doz TGF β uygulanan gruplar arasındaki değişimin grafiksel olarak gösterimi

RT-PCR sonucuna göre;

72 saat TGF β 100 ng/ml dozu uygulanan grupta; E-kadherin'de belirgin azalma (fold regulation değeri -2,08), vimentin değerinde ise artış (fold regulation değeri 1,38) tespit edilmiş olup, SKOV-3 hücrelerinde EMT modeli kurmak için uygun TGF β dozu 72 saat 100 ng/ml olarak kabul edildi. Bu dozun uygulanması sonrasında SKOV-3 hücrelerinin epiteloid olan yapısının 72 saat sonra mezenkimale dönüştüğü görüldü. (Şekil 13)

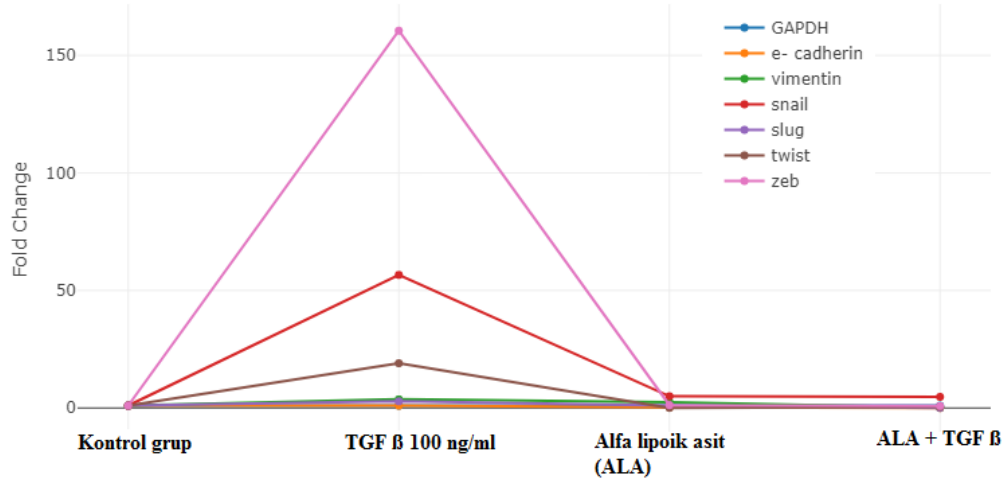


Şekil 13. SKOV-3 hücrelerine 72 saat 100 ng/ml TGF β uygulaması sonrası SKOV-3 hücrelerinin epiteloid yapıdan mezenkimale dönüşümünün morfolojik olarak gösterilmesi

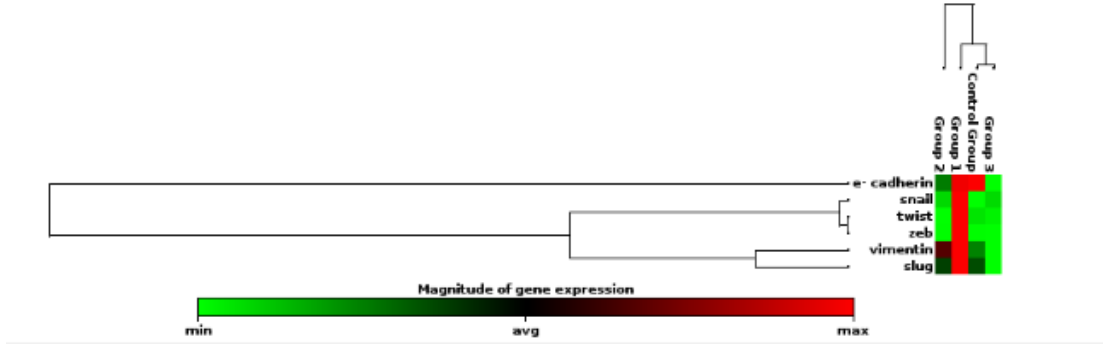
2. Reaksiyon sonucunda elde edilen Cq değeri dikkate alınarak kontrol, TGF β 100 ng/ml, ALA IC 50 ve TGF β 100 ng/ml + ALA IC 50 kombinasyon gruplarındaki gen ifadelerindeki değişim hesaplandı. Çalışmamız sonucunda araştırmamızda incelediğimiz E-kadherin, vimentin, Snail, Slug, Twist, Zeb genlerinden istatistiksel olarak anlamlı değişim görülen genler ve değişim durumları Şekil 14'de, çizgi grafiği Şekil 15'de, küme grafiği ise Şekil 16'da gösterildi.

Position	Gene Symbol	Fold Regulation (comparing to control group)					
		TGF β 100 ng/ml		Alfa lipoik asit (ALA)		TGF β + ALA	
		Fold Regulation	p-Value	Fold Regulation	p-Value	Fold Regulation	p-Value
1	GAPDH	1.00	nan	1.00	nan	1.00	nan
2	e-cadherin	-1.03	0.452371	-3.77	0.346963	-87.83	0.337422
3	vimentin	3.66	0.366571	2.48	0.320981	-6.41	0.018379
4	snail	56.62	0.093320	4.98	0.130888	4.73	0.368021
5	slug	2.82	0.440002	1.06	0.798650	-130.09	0.298523
6	twist	19.03	0.371232	-19.34	0.108517	-2.30	0.559005
7	zeb	160.53	0.357951	1.19	0.375793	-1.22	0.554097

Şekil 14. RT-PCR sonucuna göre kontrol grubuna göre değişiklik gösteren genler



Şekil 15. RT-PCR sonucuna göre kontrol grubuna göre deney grupları arasında değişiklik gösteren genlerin çizgi grafiği gösterimi



Şekil 16. RT-PCR sonucuna göre kontrol grubuna göre deney grupları arasında değişiklik gösteren genlerin küme grafiği gösterimi

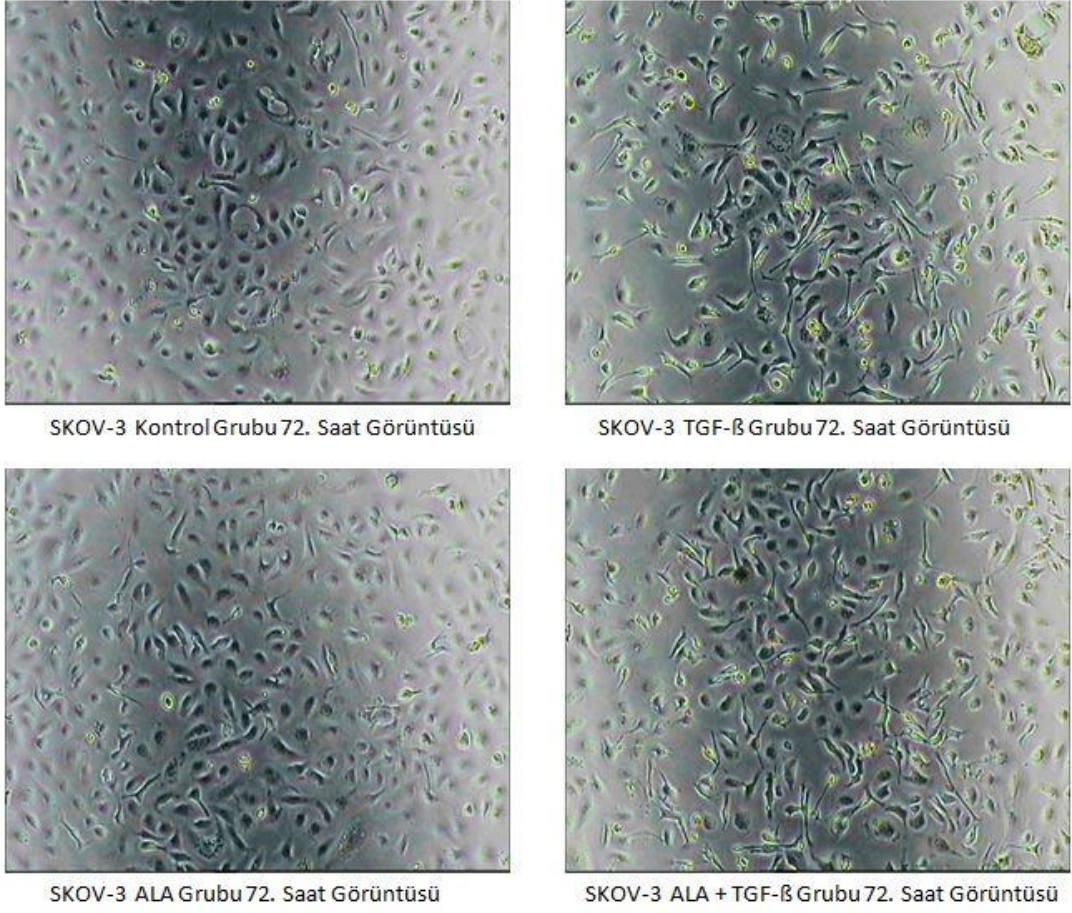
RT-PCR sonucuna göre;

72 saat TGF β 100 ng/ml dozu uygulanan grupta; E-kadherin’de belirgin azalma, vimentin, SNAİL, SLUG, TWİST ve ZEB’ de belirgin artış tespit edildi.

48 saat ALA IC 50 dozu verilen grupta; E- kadherin belirgin azalma, vimentin ve SNAİL gen ekspresyonunda belirgin artış bulundu. SLUG ve ZEB kontrol grubuyla aynıken TWİST gen ekspresyonunda belirgin düşme tespit edildi.

TGF β ve ALA kombine verildiği grupta ise E-cadherin, vimentin, SNAİL, TWİST ve ZEB’de belirgin düşme tespit edildi.

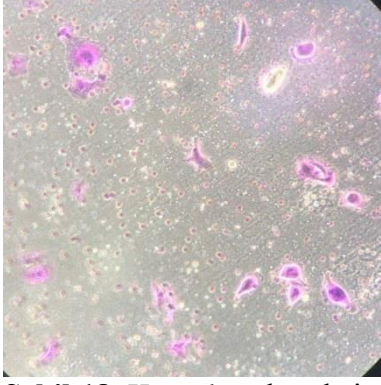
SKOV-3 hücrelerine 72 saat 100 ng/ml TGF β verilen grupta kontrol grubuna göre morfolojik olarak epiteloid yapıdan mezenkimale dönüş görülürken, ALA IC 50 dozunda 48 saat tutulan grupta normal SKOV-3 morfolojisinde bir değişim gözlenmedi ve yine bu ikisinin kombine olarak verildiği grupta epitelden mezenkimale dönüş TGF β grubuna göre daha az gözlemlendi. Morfolojik olarak değişim durumları Şekil 17’de gösterildi.



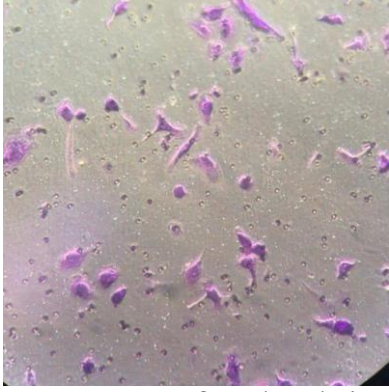
Şekil 17. SKOV-3 hücrelerinde kontrol, TGF β, ALA ve kombinasyonlarının uygulandığı deney gruplarında 72 saat sonra hücrelerin morfolojik olarak gösterimi

MATRİGEL İNVAZYON TESTİ SONUÇLARI

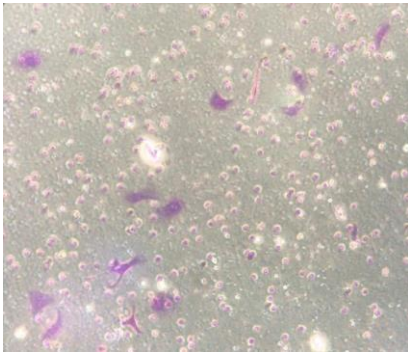
Triplike yapılan matrigel invazyon deneyi sonucunda, TGF β uygulanan SKOV-3 hücrelerinin ortalama invaze olan hücre sayısının (1850) kontrol grubuna (1057) göre arttığı, ALA uygulanan grubun invaze olan hücre sayısının (836) kontrol grubuna göre azaldığı, TGF β + ALA' nın kombine uygulandığı grupta ise invaze olan hücre sayısının (1440) kontrol grubuna göre azaldığı tespit edildi. (Şekil 18,19,20,21,22) (Tablo 7,8)



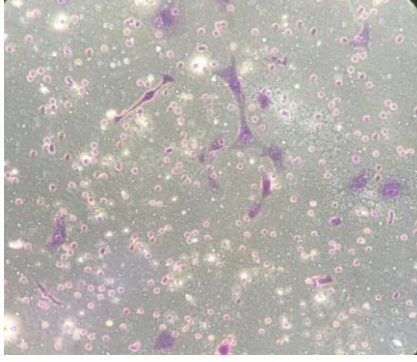
Şekil 18. Kontrol grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (100X)



Şekil 19. TGF β grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (100X)



Şekil 20. ALA grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (100 X)



Şekil 21. TGF β + ALA grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (100X)

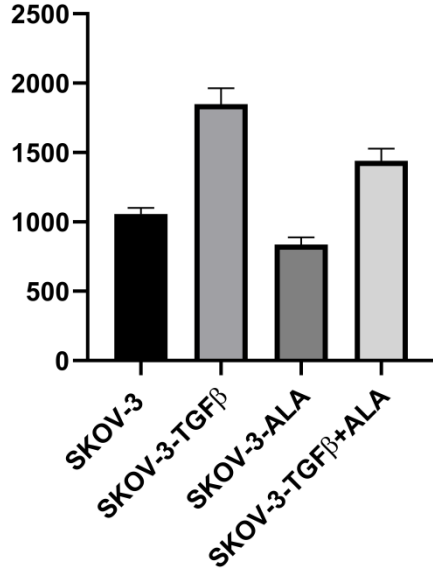
Tablo 7. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve doz gruplarında invazyona uğrayan hücre sayısı, ortalama ve standart sapmaları

	Grup1	Grup2	Grup3	Ortalama	Std sp
Kontrol	1106	1044	1021	1057	43,966
TGF β 100 ng/ml	1720	1905	1925	1850	113,027
ALA IC 50	845	780	883	836	52,086
TGF β 100 ng/ml + ALA IC 50	1505	1476	1339	1440	88,662

Tablo 8. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında invazyon deneyi istatistik sonuç tablosu

Tukey's multiple comparisons test		p değeri
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β	****	<0,0001
SKOV-3 ve SKOV-3-ALA	*	0,0377
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β +ALA	**	0,0016
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-ALA	****	<0,0001
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-TGF β +ALA	**	0,001
SKOV-3-ALA ve SKOV-3-TGF β +ALA	****	<0,0001

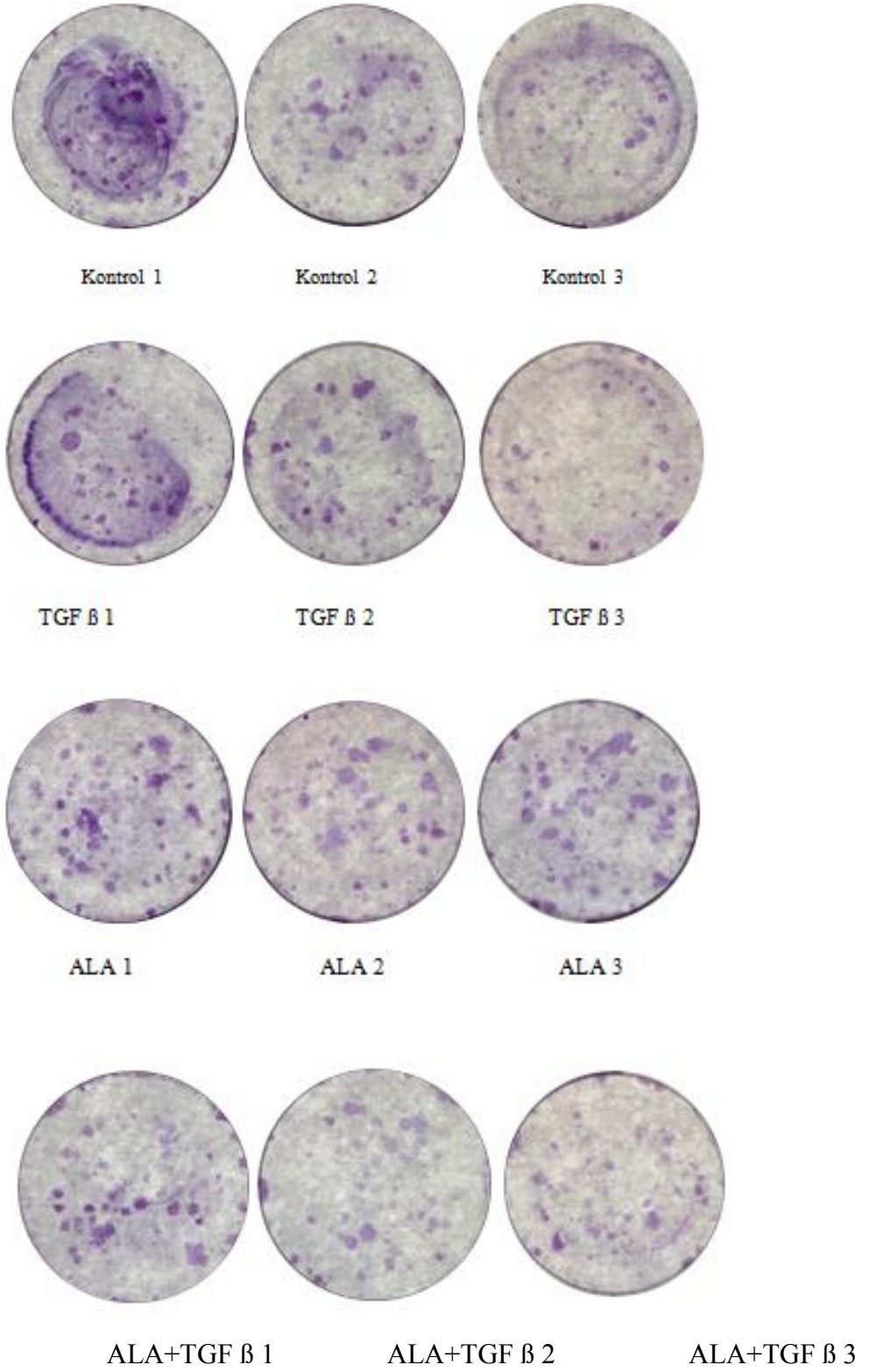
İnvazyona Uğrayan Hücre Sayısı



Şekil 22. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında invazyon deneyi sonuç grafiği

KOLONİ DENEYİ SONUÇLARI

Kontrol grubu hücrelerde koloni ortalaması 63 iken, TGF β 100 ng/ml grubunda koloni sayısı 48, ALA IC₅₀ grubunda 61, ALA IC₅₀ + TGF β 100 ng/ml grubunda 48 olarak bulundu (Tablo 9, 10). Şekil 23’de kontrol ve doz gruplarının görüntüsü gösterildi.



Şekil 23. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve doz gruplarında koloni görüntüsü

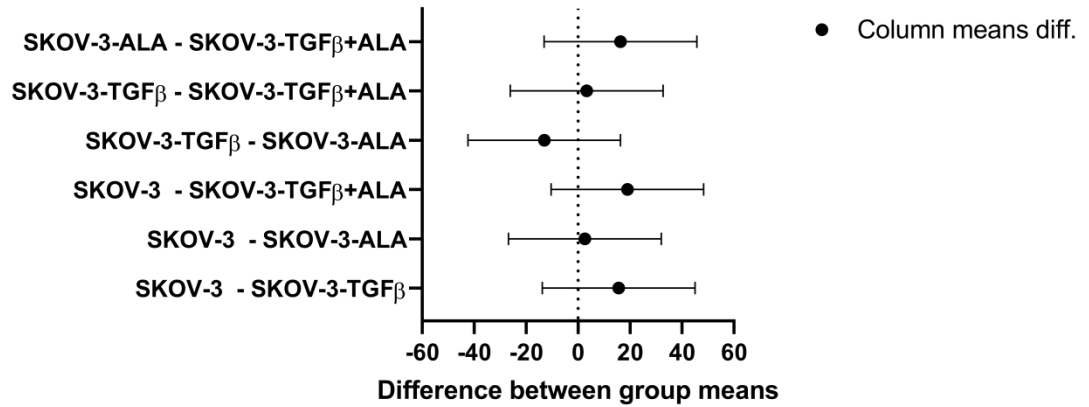
Tablo 9. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında koloni sayıları, ortalama, standart sapma sonuçları

	Grup1	Grup2	Grup3	Ortalama	Std sp
Kontrol	75	61	55	63	10,263
TGF β 100 ng/ml	66	36	42	48	15,875
ALA IC 50	62	50	71	61	10,536
TGF β 100 ng/ml + ALA IC 50	60	40	45	48	6,028

Tablo 10. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında koloni deneyi istatistik sonuçları

Tukey's multiple comparisons test		p değeri
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β	ns	0,3793
SKOV-3 ve SKOV-3-ALA	ns	0,9908
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β +ALA	ns	0,2405
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-ALA	ns	0,5235
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-TGF β +ALA	ns	0,9824
SKOV-3-ALA ve SKOV-3-TGF β +ALA	ns	0,3477

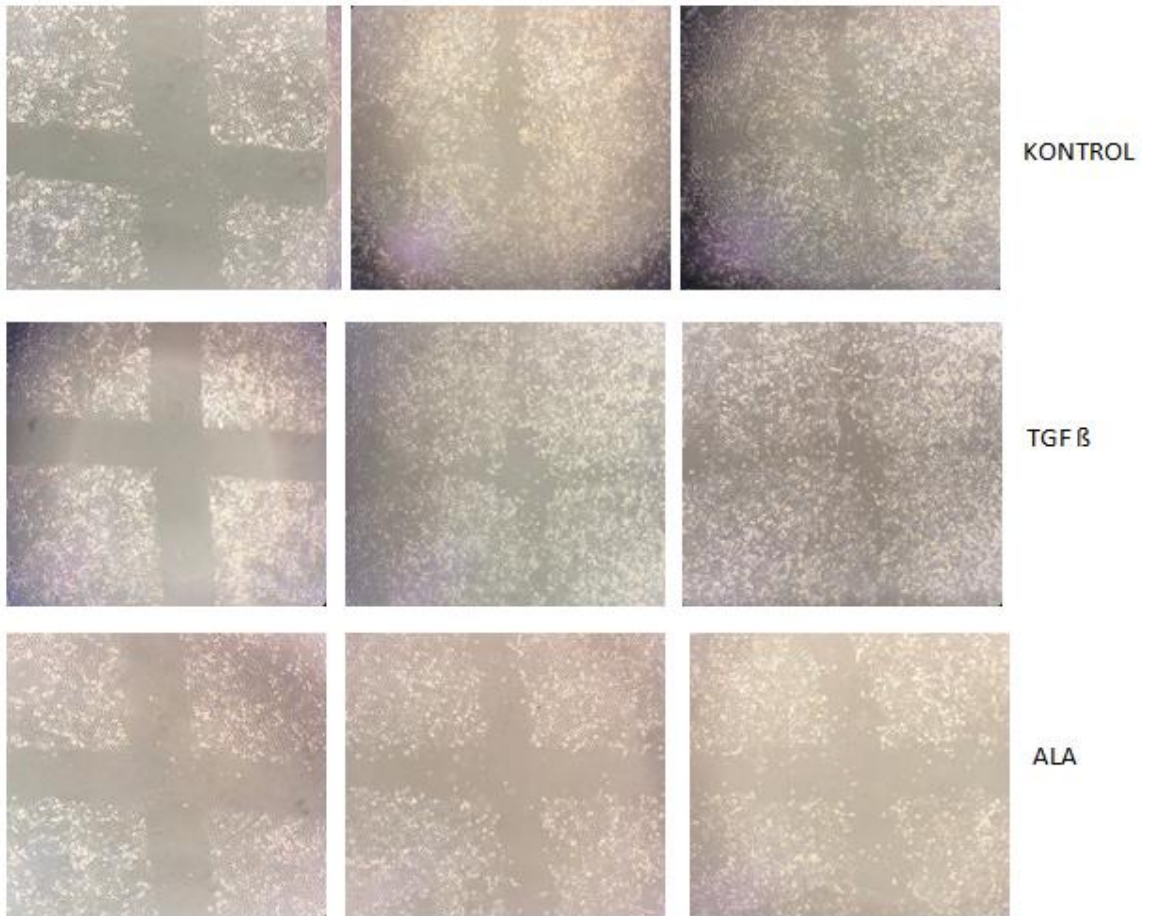
95% Confidence Intervals (Tukey)



Şekil 24. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında koloni deneyi istatistik sonuç grafiği

WOUND HEALING DENEYİ SONUÇLARI

Wound healing deneyi sonuçlarının 0, 16 ve 24 saatte 4X büyütme ile çekilen resimleri Şekil 25'te, deney gruplarımızın, wound healing deneyi sonrası 0, 16 ve 24 saatte yara kapatma yüzdeleri Tablo 11'de, istatistiksel sonuçları Tablo 12 ve 13'te gösterildi.





Şekil 25. Kontrol, TGF β , ALA ve kombine gruplarına ait 0. 16. ve 24. saat wound healing deneyi sonuçları

Tablo 11. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında yüzdeler olarak wound healig sonuçları

	0. Saat ortalama	16. Saat ortalama	24. Saat ortalama
Kontrol	% 100	% 40	% 25
TGF β 100 ng/ml	% 100	% 25	% 14
ALA IC 50	% 100	% 80	% 71
TGF β 100 ng/ml + ALA IC 50	% 100	% 78	% 69

Tablo 12. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında yüzdeler olarak wound healig deneyi 16. saat istatik sonuçları

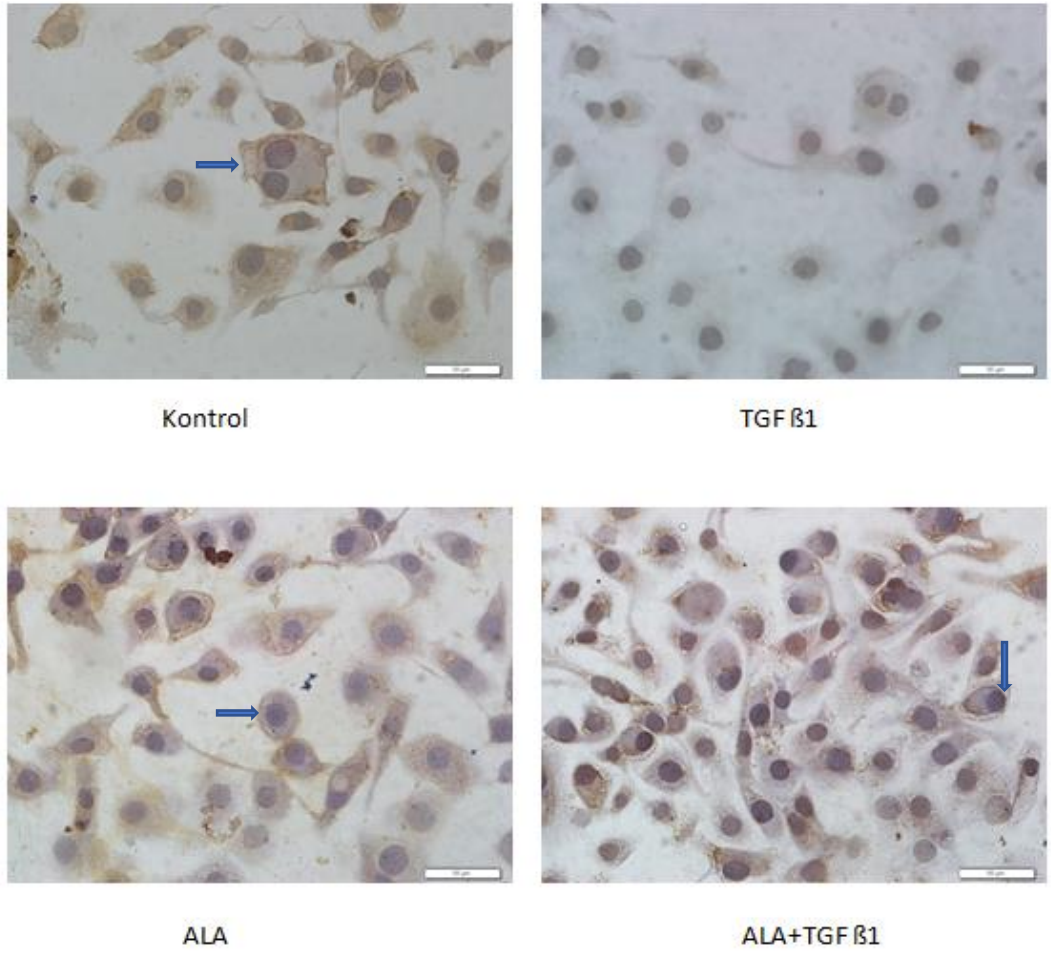
Tukey's multiple comparisons test		p değeri
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β	****	<0,0001
SKOV-3 ve SKOV-3-ALA	****	<0,0001
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β +ALA	****	<0,0001
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-ALA	****	<0,0001
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-TGF β +ALA	****	<0,0001
SKOV-3-ALA ve SKOV-3-TGF β +ALA	****	<0,0001

Tablo 13. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında yüzdeler olarak wound healig deneyi 24. saat istatik sonuçları

Tukey's multiple comparisons test		p değeri
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β	****	<0,0001
SKOV-3 ve SKOV-3-ALA	****	<0,0001
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β +ALA	****	<0,0001
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-ALA	****	<0,0001
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-TGF β +ALA	****	<0,0001
SKOV-3-ALA ve SKOV-3-TGF β +ALA	****	<0,0001

İMMÜNSİTOKİMYA SONUÇLARI

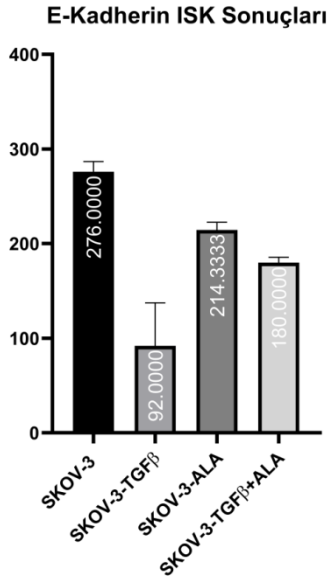
Bir transmembran proteini olan E-kadherin en önemli epitelyal gen olarak kabul edilir ve sitoplazmik tarafta α ve β katenine, onlarda hücre iskeleti proteinleri olan aktine bağlanırlar. Buna göre kontrol, ALA, ALA+TGF β gruplarında E-kadherin pozitif boyanan hücre sayısı, TGF β grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksekti ($p<0.05$) (Tablo 14). Şekil 26'da; kontrol, ALA ve ALA+TGF β grubunda hücre zarında mavi okla işaretli E-kadherin boyanması görülmektedir.



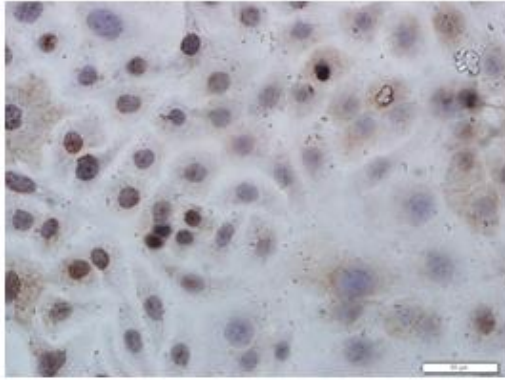
Şekil 26. E- Kadherin antikoru immünsitokimya boyama, zıt boyama olarak H&E, 400 \times büyütme, mavi ok ile hücre zarında E- kadherin gösterilmekte

Tablo 14. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında E- kadherin proteininin immünsitokimya istatik sonuçları

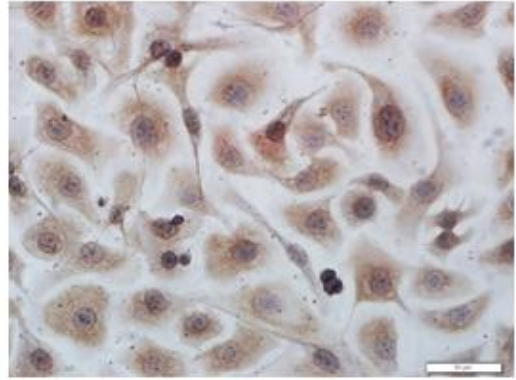
Tukey's multiple comparisons test		p değeri
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β	****	<0,0001
SKOV-3 ve SKOV-3-ALA	***	0,0009
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β +ALA	****	<0,0001
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-ALA	****	<0,0001
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-TGF β +ALA	****	<0,0001
SKOV-3-ALA ve SKOV-3-TGF β +ALA	*	0,0297



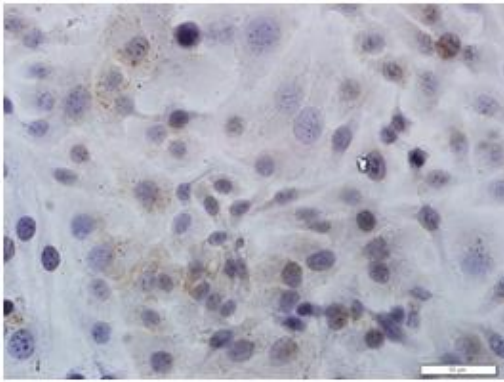
Şekil 27. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında E- kadherin proteininin immünsitokimya istatik sonuç grafiği



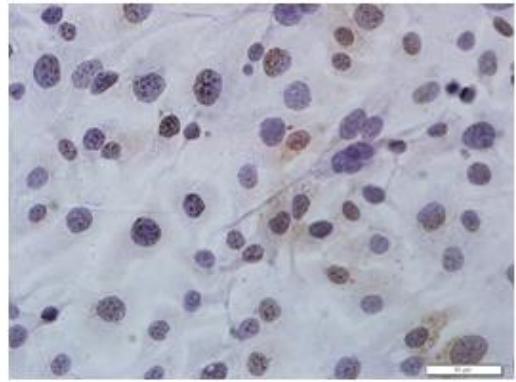
Kontrol



TGF β



ALA



ALA+TGF β

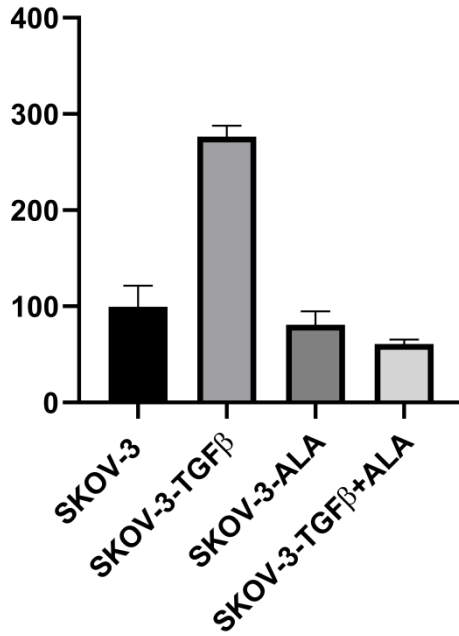
Şekil 28. Vimentin antikoru immünsitokimya boyama, zıt boyama olarak H&E, 400^x büyütme

Vimentin sitoplazmik bir protein olup hücre mezenkimal yapıya dönüştükçe sitoplazmik olarak miktarı artar. Buna göre vimentin pozitif sitoplazmik boyanan hücre sayısı kontrol, ALA, ALA+TGF β gruplarında TGF β grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşüktü ($p<0,05$) (Tablo 15). Şekil 28’de; TGF β grubunda hücre sitoplazmasında vimentin boyanması görülmektedir.

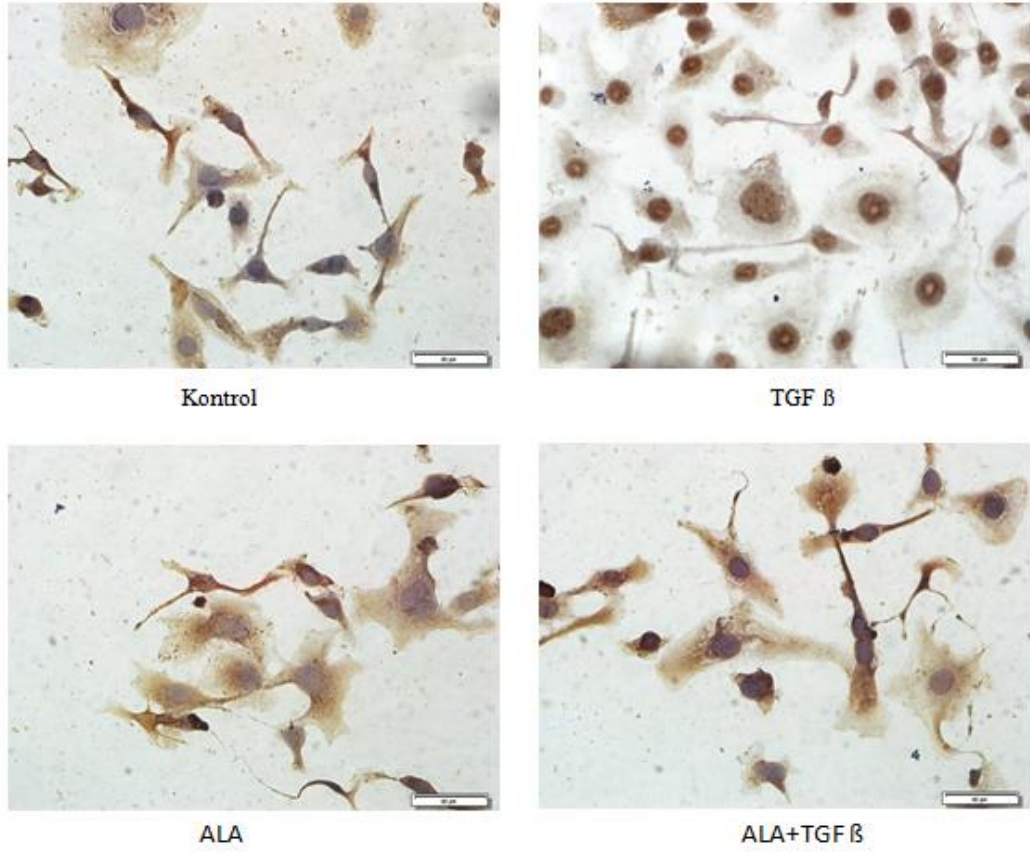
Tablo 15. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında vimentin proteininin immüsitokimya istatistik sonuçları

Tukey's multiple comparisons test		p değeri
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β	****	<0,0001
SKOV-3 ve SKOV-3-ALA	ns	0,4424
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β +ALA	*	0,046
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-ALA	****	<0,0001
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-TGF β +ALA	****	<0,0001
SKOV-3-ALA ve SKOV-3-TGF β +ALA	ns	0,389

Vimentin ISK Sonuçları



Şekil 29. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında vimentin proteininin immüsitokimya istatistik sonuç grafiği

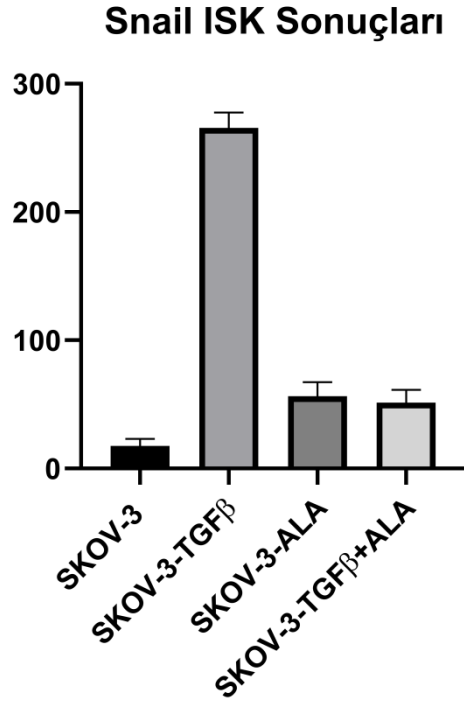


Şekil 30. Snail antikoruna immünohistokimya boyama, zıt boyama olarak H&E, 400 \times büyütme

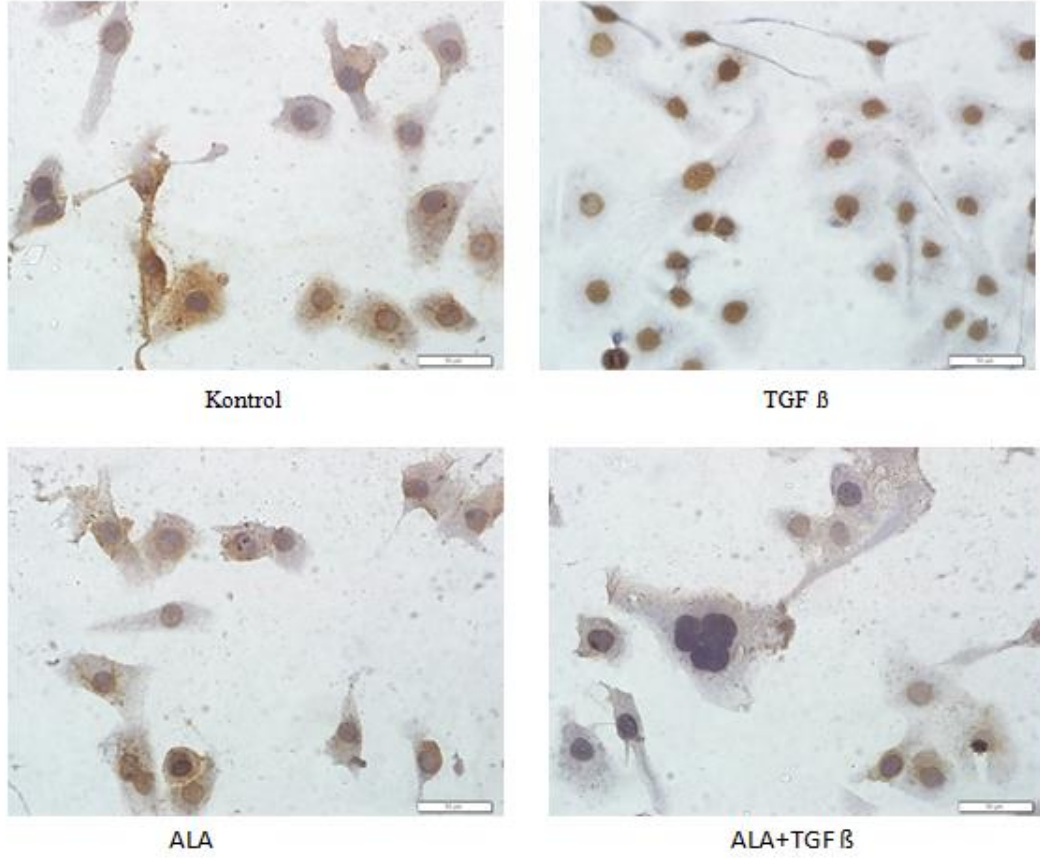
Snail bir EMT transkripsiyonel faktörü olup normal kanser hücrelerinde sitoplazmada, EMT geliştiğinde ise çekirdekte yerleşir. Buna göre kontrol, ALA, ALA+TGF β gruplarında sitoplazmada Snail pozitif boyanan hücre sayısı, TGF β grubunda çekirdekte boyanan Snail pozitif hücre sayısı fazlaydı ($p < 0.05$) (Tablo 16). Şekil 30'da; kontrol, ALA ve ALA+TGF β grubunda hücre sitoplazmasında, TGF β grubunda çekirdekte Snail boyanması görülmektedir.

Tablo 16. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında Snail proteininin immünitokimya istatistik sonuçları

Tukey's multiple comparisons test		p değeri
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β	****	<0,0001
SKOV-3 ve SKOV-3-ALA	**	0,0063
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β +ALA	*	0,014
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-ALA	****	<0,0001
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-TGF β +ALA	****	<0,0001
SKOV-3-ALA ve SKOV-3-TGF β +ALA	ns	0,9249



Şekil 31. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında Snail proteininin immünitokimya istatistik sonuç grafiği



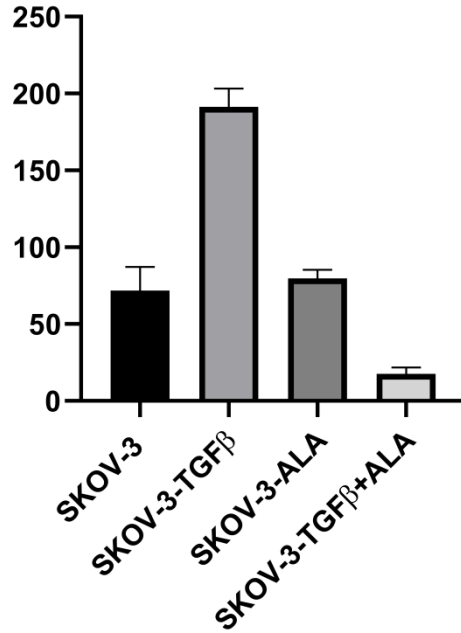
Şekil 32. Slug antikoruna immünohistokimya boyama, zıt boyama olarak H&E, 400^x büyütme

Slug bir EMT transkripsiyonel faktörü olup normal kanser hücrelerinde protein olarak sitoplazmada, EMT geliştiğinde ise çekirdekte yerleşir. Buna göre kontrol, ALA, ALA+TGF beta gruplarında sitoplazmada Slug pozitif boyanan hücre sayısı, TGF beta grubunda çekirdekte pozitif hücre sayısı fazlaydı ve sonuçlarımız istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$) (Tablo 17). Şekil 32’de; kontrol, ALA ve ALA+TGF beta grubunda hücre sitoplazmasında, TGF beta grubunda çekirdekte Slug boyanması görülmektedir.

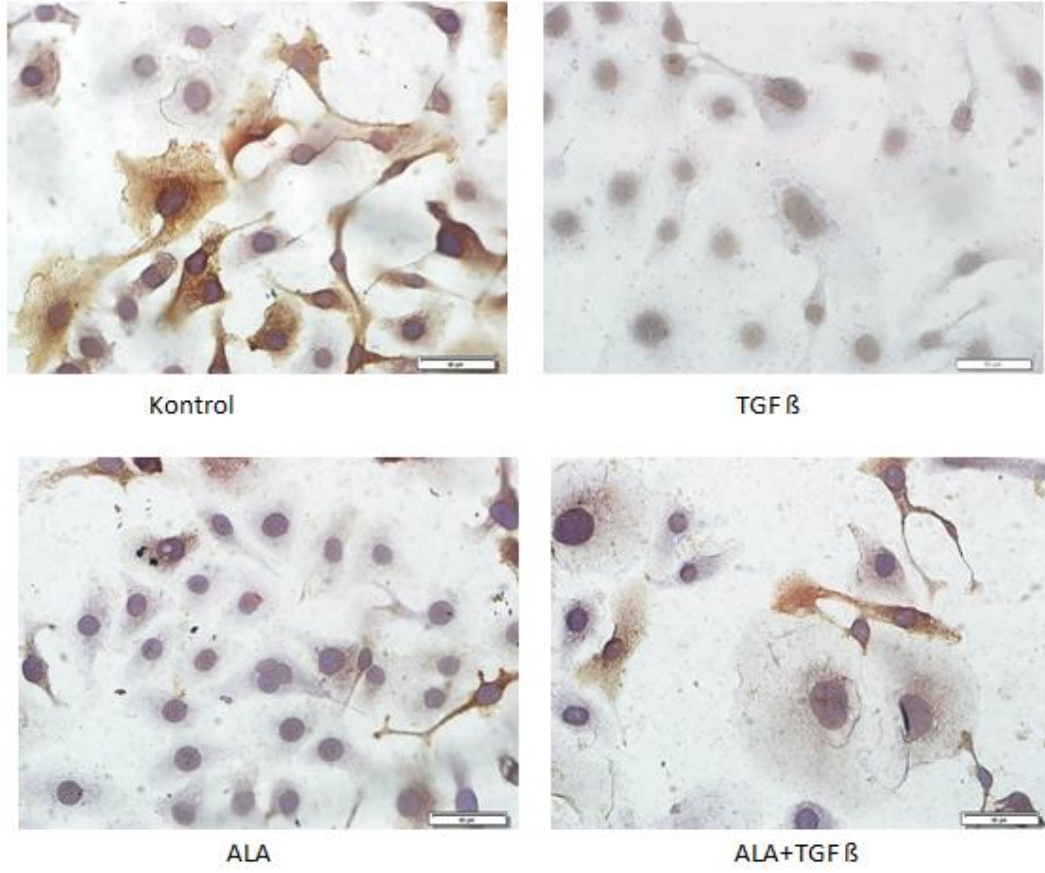
Tablo 17. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında Slug proteininin immünohistokimya istatistik sonuçları

Tukey's multiple comparisons test		p değeri
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β	****	<0,0001
SKOV-3 ve SKOV-3-ALA	ns	0,7834
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β +ALA	***	0,001
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-ALA	****	<0,0001
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-TGF β +ALA	****	<0,0001
SKOV-3-ALA ve SKOV-3-TGF β +ALA	***	0,0004

Slug ISK Sonuçları



Şekil 33. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında Slug proteininin immünohistokimya istatistik sonuç grafiği

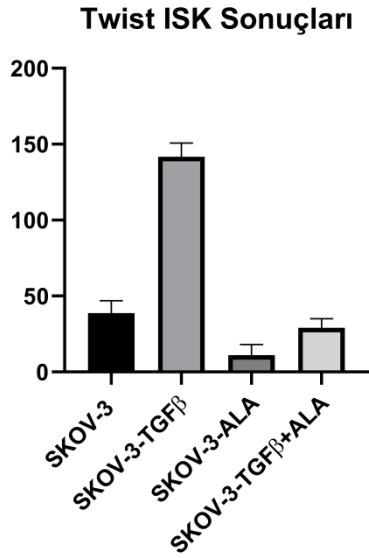


Şekil 34. Twist antikoru immünohistokimya boyama, zıt boyama olarak H&E, 400× büyütme

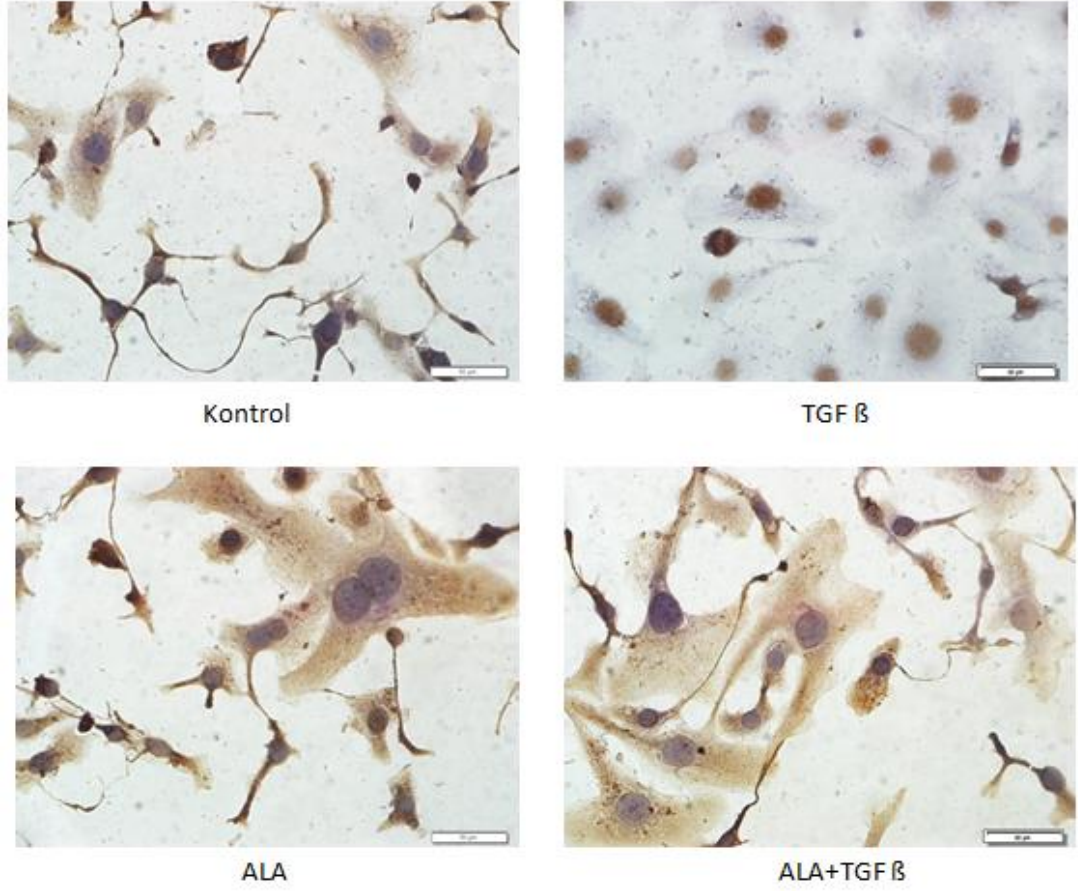
Twist bir EMT transkripsiyonel faktörü olup protein olarak normal zamanda sitoplazmada, EMT geliştiğinde ise çekirdekte yerleşir. Buna göre kontrol, ALA, ALA+TGF β gruplarında sitoplazmada Twist boyanan hücre sayısı, TGF β grubunda çekirdekte pozitif boyanan hücre sayısı fazlaydı ve sonuçlarımız istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$) (Tablo 18). Şekil 34’de; kontrol, ALA ve ALA+TGF β grubunda hücre sitoplazmasında, TGF β grubunda çekirdekte Twist boyanması görülmektedir.

Tablo 18. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında Twist proteininin immüsitokimya istatik sonuçları

Tukey's multiple comparisons test		p değeri
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β	****	<0,0001
SKOV-3 ve SKOV-3-ALA	**	0,0098
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β +ALA	ns	0,4601
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-ALA	****	<0,0001
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-TGF β +ALA	****	<0,0001
SKOV-3-ALA ve SKOV-3-TGF β +ALA	ns	0,0804



Şekil 35. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında Twist proteininin immüsitokimya istatik sonuç grafiği

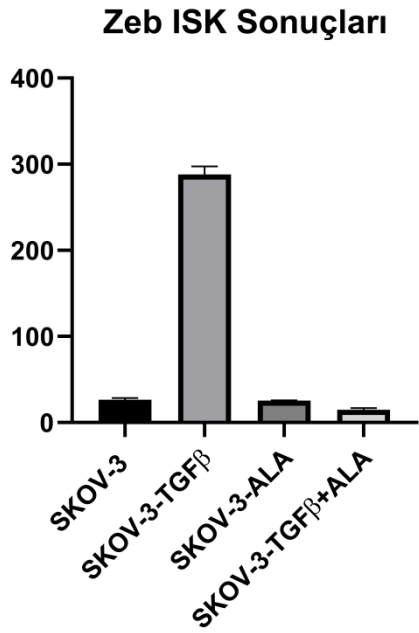


Şekil 36. Zeb antikoruna immünohistokimya boyama, zıt boyama olarak H&E, 400 \times büyütme

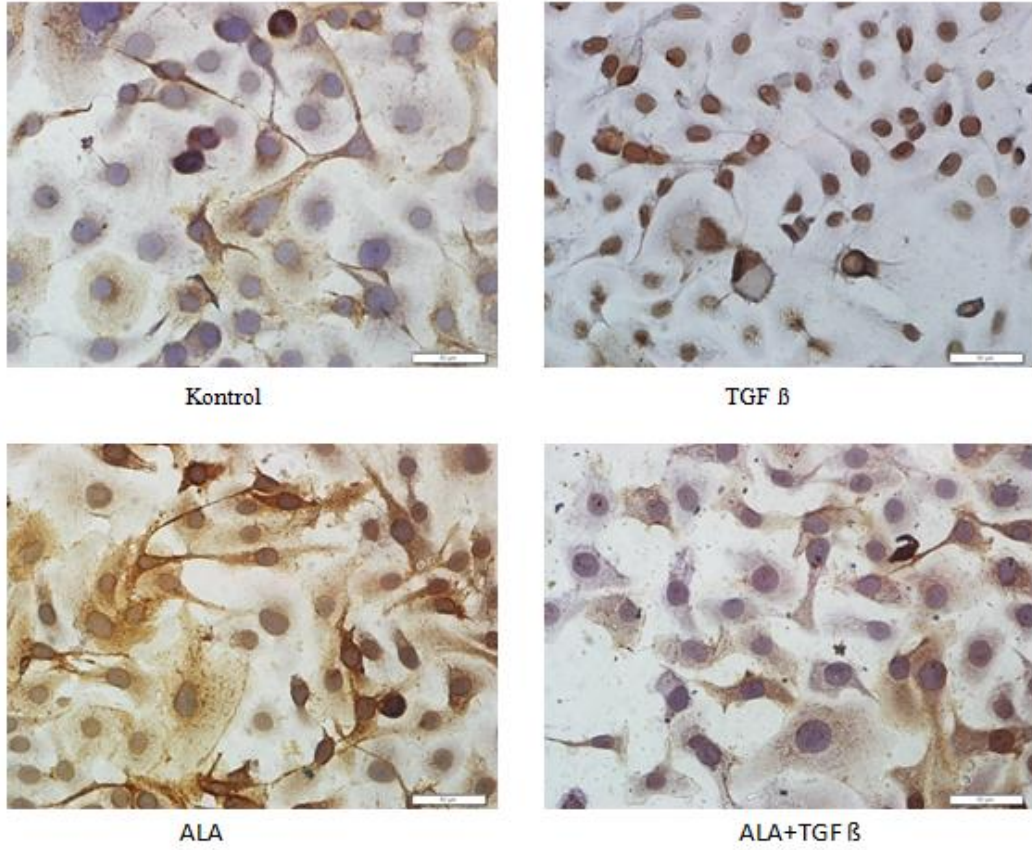
Zeb bir EMT transkripsiyonel faktörü olup normal zamanda protein olarak sitoplazmada, EMT geliştiğinde ise çekirdekte yerleşir. Buna göre kontrol, ALA, ALA+TGF β gruplarında sitoplazmada Zeb pozitif boyanan hücre sayısı, TGF β grubunda çekirdekte pozitif boyanan hücre sayısı fazlaydı ve sonuçlarımız istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$) (Tablo 19). Şekil 36'da; kontrol, ALA ve ALA+TGF β grubunda hücre sitoplazmasında, TGF β grubunda çekirdekte Zeb boyanması görülmektedir

Tablo 19. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında Zeb proteininin immünitokimya istatistik sonuçları

Tukey's multiple comparisons test		p değeri
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β	****	<0,0001
SKOV-3 ve SKOV-3-ALA	ns	0,9947
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β +ALA	ns	0,0863
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-ALA	****	<0,0001
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-TGF β +ALA	****	<0,0001
SKOV-3-ALA ve SKOV-3-TGF β +ALA	ns	0,1212



Şekil 37. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında Zeb proteininin immünitokimya istatistik sonuç grafiği



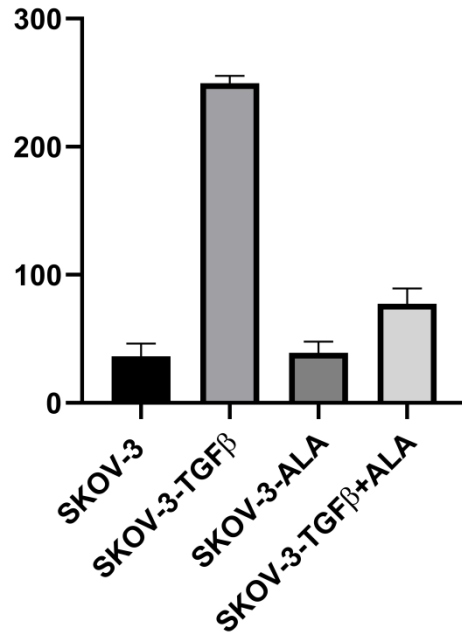
Şekil 38. Beta katenin antikoru immünsitokimya boyama, zıt boyama olarak H&E, 400^x büyütme

Son olarak çekirdeğe doğru toplanan bir protein olan β -katenin de EMT'nin bir işareti olarak kabul edilir. E-cadherin, β -katenin'in çekirdekten sitoplazmaya göçüne aracılık edebilir. Buna göre kontrol, ALA, ALA+TGF β gruplarında E- kadherin, TGF β grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksekti ($p < 0.05$) (Tablo 20). Şekil 38'de; kontrol, ALA ve ALA+TGF β grubunda hücre sitoplazmasında, TGF β grubunda çekirdekte Beta- katenin boyanması görülmektedir

Tablo 20. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında β -katenin proteininin immünitokimya istatistik sonuçları

Tukey's multiple comparisons test		p değeri
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β	****	<0,0001
SKOV-3 ve SKOV-3-ALA	ns	0,9947
SKOV-3 ve SKOV-3-TGF β +ALA	ns	0,0863
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-ALA	****	<0,0001
SKOV-3-TGF β ve SKOV-3-TGF β +ALA	****	<0,0001
SKOV-3-ALA ve SKOV-3-TGF β +ALA	ns	0,1212

β -katenin ISK Sonuçları



Şekil 39. SKOV-3 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarında β -katenin proteininin immünitokimya istatistik sonuç grafiği

TARTIŞMA

Kanser tedavisinde antikanser ilaçların yanı sıra antioksidanlarda kullanılmaktadır. Bunlardan alfa lipoik asitin over kanserinde etkili olduğunu gösteren bir çalışmaya rastlanmıştır [130]. Over kanseri en öldürücü jinekolojik kanser olup, metastaz ve invazyonu EMT ile ilişkilendirilmiştir [131]. ALA, meme [132, 133] ve tiroid [134] kanserlerini içeren diğer kanser tiplerinde anti-metastaz potansiyelini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Ancak yapılan literatür taramasında alfa lipoik asitin over kanserlerinde EMT'ye etkisini araştıran çalışmaya rastlanmamıştır. Biz ilk kez bu çalışmayla insan over adenokarsinom hücre hattı SKOV-3'te alfa lipoik asitin TGF β 1 bağımlı EMT'yi inhibe ederek migrasyon ve invazyonu inhibe ettiğini gösterdik.

Normal over yüzey epiteli hem keratin hem de vimentin ekspresyonuyla epitelyal ve mezenkimal karakter sergiler [135]. Over yüzey epitel hücrelerinin hem foliküler rüptür hem de epitel yenilenmesi boyunca epitelyal ve mezenkimal hücre morfolojisi arasında geçiş yaparak bu değişikliklere adapte olduğuna inanılır. Aynı zamanda, bu plastisite over kanseri kökeninde metastaza öncülük eden tümör hücre yayılımının teşvikinde önemli bir başlatıcı olay olabilir [136]. Çalışmamızda insan over kanseri hücresi olan SKOV-3'te hem E-kaderin hem de vimentin ekspresyonunun gözlemlendiğini bulduk, bu durum Yong-Feng Hou ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmayla uyumluydu [137].

EMT, normal fizyolojik durumda kortikal yerleşimli artmış E-kadherin ve azalmış vimentin ekspresyonunun tam tersine döndüğü epitel hücreleriyle ilişkili bir durumdur. Buna karşın, normal over yüzey epiteli mezodermal kaynaklıdır ve kortikal E-kaderin olmaksızın yüksek vimentin seviyesi eksprese eder. EMT'nin hücresel özellikleri epitel benzeri poligonal morfolojinin, apikobazal hücre polaritesi ve yan yüz bağlantılarının kaybı, fibroblast benzeri şeklin gelişimi, hücre iskelet filamentlerinin yeniden organizasyonu, artmış hücre hareketliliği ve migrasyon ve invazyon için ön koşul olan ekstrasellüler matriks bozulması için proteazların uyarılmasıdır [136].

Tümör mikroçevresindeki sitokinler ve büyüme faktörleriyle ilişkili çeşitli sinyal yolları EMT sürecini uyarır. Bu, çeşitli sinyal yolları ve onların hedef

genlerinin aktivasyonu ile olur. Örneğin TGF β , hepatosit büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörü gibi faktörler, spesifik hücre tiplerinde reseptörlerini in vitro aktive ettikten sonra EMT'yi uyarabilirler. TGF β ailesi kanser patogeneğinde EMT'yi en iyi uyarılardan biridir. TGF β meme kanseri kök hücresinde EMT'nin potent bir düzenleyicisi olup [138], tiroid kanserinde TGF β bağımlı bir EMT çalışmasında [139] ve yine SKOV-3 hücrelerinde EMT modeli kurmak için başka bir çalışmada kullanılmıştır [137]. Yong-Feng, Hou ve arkadaşlarının SKOV-3 hücrelerine TGF- β vererek EMT modeli kurdukları bir çalışmada TGF β dozunu 10 ng/ml olarak belirlemişlerdir. Biz de çalışmamızda SKOV-3 hücrelerine 10 ng/ml, 50 ng/ml ve 100 ng/ml olarak üç farklı dozda 24, 48 ve 72 saat olmak üzere üç farklı sürede TGF β 1 dozu uyguladık, hem RT-PCR sonuçlarına göre hem de morfolojik olarak 100 ng/ml 72 saat süreyle TGF β 1 uygulanan grup EMT ile en uyumlu olduğu için doz grubumuz bu şekilde belirledik.

TGF- β çok fonksiyonlu bir sitokin olup kanserin erken evresinde proliferasyonu durdurma, farklılaşmayı uyarma veya apoptozu teşvik etme gibi tümör baskılayıcı bir sitokin gibi davranır. Fakat ileri evre kanserde EMT'yi uyarma gibi çoklu mekanizmalarla tümör gelişimini teşvik eder [140]. Ek olarak, TGF β deneysel çalışmalarda EMT'nin anahtar bir uyarıcısı olarak sıklıkla kullanılır. EMT, epitelyal ve mezankimal değişikliklerden başka, β -katenin, Slug, Snail, Twist ve Sox gibi transkripsiyonel faktörlerin lokalizasyon değişikliğiyle karakterizedir [141]. Bir çalışmada TGF β 1'in Slug, Snail ve β -kateninin hem ekspresyonunu hem de over kanseri hücrelerinde lokalizasyonlarını artırdığı gösterilmiştir [137]. Bir başka çalışmada TGF β 1 bağımlı EMT, CCR7 aktivasyonu ile meme kanseri hücrelerinin lenfatik endotel hücrelerine doğru göçünü teşvik etmiştir [142]. Snail, TGF- β bağımlı EMT boyunca SMAD3/4 için bir ko-faktördür ve meme kanserinde CAR ve E-kaderinin kaybıyla Snail1 ve SMAD3/4'ün birlikte nükleer ekspresyonu arasında güçlü bir ilişki olduğu bulunmuştur [142]. Akciğer kanseri A549 hücrelerinde TGF- β bağımlı CD 59 ekspresyonu EMT boyunca SMAD 2 üzerinden değil SMAD3 üzerinden ilerler [143]. Liu ve arkadaşları TGF- β bağımlı EMT için JAK/STAT3 yolunun gerekli olduğunu ve akciğer kanserinde IL-6/JAK/STAT3 yolu ile TGF- β /SMAD yolunun sinerjik olarak EMT'yi uyardıklarını bildirmişlerdir [144]. Bu nedenle TGF β ile kurulan EMT modeli pek çok yolu aktive ederek tümör

hücrelerinin metastazını sağlar. Biz de çalışmamızda SKOV-3 hücrelerine 72 saat boyunca 100 ng/ml TGF β 1 uyguladıktan sonra, E-kaderinde belirgin azalma, vimentin, Snail, Slug, Twist ve Zeb gen ekspresyonunda belirgin artış gözlemledik. İmmünohistokimya sonuçlarımız PCR ile uyumlu olup, morfolojik olarak da epitelyal yapıdaki SKOV-3 hücrelerinin mezenkimal yapıya dönüştüğünü daha içsi ve daha hareketli olduğunu bulduk. Bu bulgularımız daha önce TGF β ile EMT modeli kurulan over [137], tiroid [134] ve meme kanseri [132] gibi diğer kanser hücre türleriyle uyumludur. Yine çalışmamızda TGF- β ile EMT kurulan grubumuzda, kontrol grubuyla kıyasladığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde migrasyon, proliferasyon ve invazyonda belirgin artış gözlemledik.

ALA, yapısında kükürt içeren, doğal olarak oluşan kısa zincirli bir yağ asitidir [128]. ALA tüm prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde bulunan doğal bir antioksidan bileşik olup, insanlarda pirüvat dehidrojenaz ve α -keto gluterat dehidrojenaz kompleksi gibi enerji metabolizmasında yer alan birkaç mitokondriyal multi enzim kompleksi için esansiyel bir ko-faktör olarak davranır [129]. ALA'nın antioksidan etkisi, ROS'u temizleme ve endojen antioksidanları yenileme kabiliyetinden dolayı hücresel büyümede büyük bir rol oynar. Önceki çalışmalar hücre içi redoks dengesinin hücresel büyümeyle bağlantılı olduğunu ve karsinogenezde kritik bir rol oynadığını gösterdi. ALA'nın hücre proliferasyon inhibisyonu ve apoptoza öncülük eden, kanser hücreleri tarafından biriktirilmiş yüksek oksidatif stresi azalttığı öne sürüldü. Değişik çalışmalar dışardan ALA uygulamasının, çeşitli kanser tiplerinde proliferasyonu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Tümör proliferasyonunun PI3K/Akt, ERK ve mTOR gibi onkojenik sinyal yollarının aktivasyonuna öncülük eden, EGFR'yi içeren farklı tirozin kinaz reseptörlerinin aşırı ekspresyonundan dolayı olduğu iyi bilinmektedir. İlginç bir şekilde, çeşitli kanser tiplerinde bu proliferatif yolların uyarılması ALA tedavisi üzerinden inhibe edilir ve kanser hücre proliferasyonunu kısıtlayarak antitümör aktivitelere katkıda bulunur. Meme kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada ALA'nın, antikanser tedavisi için potansiyel bir hedef olarak görülen ve meme kanseri hücrelerinde sıklıkla aşırı eksprese olan PTP1B ve SHP2 aktivitesini azaltarak, meme kanser hücrelerinin canlılıklarını azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca ALA hücre siklusunun durmasına öncülük eden pek çok kanser türünde, siklin bağımlı kinaz inhibitörleri olan p27kip1 ve p21Cip1'in

artmasını teşvik eder. AMPK enerji dengesini koruyan enerji seviyesinin büyük bir sensörü olup, fosforilasyonla aktivasyonu azalan bir Akt efektörü olan mTOR protein kompleksinin inhibisyonu tarafından, tümör progresyonunu engellediği bildirilmiştir. İnhibitör rolüne ek olarak ALA, AMPK aktivasyonunun güçlendirilmesine yol açar ve ardından Akt yolunun inhibisyonunu güçlendirir, böylece kanser hücresi proliferasyonunu azaltır. Antiproliferatif rolüne ek olarak, ALA doza bağımlı olarak farklı tip kanser hücrelerinin apoptozunu teşvik eder. Önceki bilgiler ALA'nın anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler arasındaki dengeyi düzenleyerek çeşitli kanser hücrelerinde apoptozu destekleyen ROS'u oluşturabildiğini göstermişlerdir. Gerçekten de, mitokondriyal anti-apoptotik proteinler Mcl-1, bcl-2 ve bcl-XL, birkaç over, akciğer ve meme kanseri hücre hattında ALA tedavisini takiben, konsantrasyona bağlı bir şekilde düzenlenmesi azalır. Tersine, ALA tedavisine cevap olarak pro-apoptotik proteinler Bim ve Noxa'nın ekspresyonu artar. Bütün bu olaylar hücre ölümüne yol açar. Lösemi ve meme kanserinde artan kaspaz-3 aktivitesiyle ALA tedavisinden sonra Bax/bcl2 oranı belirgin şekilde artar. Hepatoma kanser hücrelerinde yapılan bir başka çalışma, ALA'nın kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivasyonu ile intrinsik apoptotik yolu tetiklediğini göstermiştir. Bu bulgular doğrultusunda kolon kanserinde yapılan bir başka çalışma, ALA'nın NF-κB sinyalini inhibe ederek WT p53 proteinini stabilize ettiğini meydana çıkarmıştır. WT p53 pro-apoptotik gen transkripsiyonunu uyararak böylece intrinsik apoptozu tetikleyen bir apoptoz aktivatörüdür. Dörsam ve arkadaşları. ALA'nın kolorektal kanserde P53 stabilizasyonundan bağımsız hücre ölümünü tetiklediğini göstermişlerdir. Aynı zamanda, akciğer kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada, ALA tedavisinin nekroz ve otofaji bağımlı hücre ölümüne öncülük eden Apoptoz-indükleyici Faktör (AIF) tarafından kaspaz bağımsız mekanizmalar aracılığıyla diğer hücre ölüm yollarını provoke ettiğini göstermişlerdir. [145]. Yapılan son çalışmalarda hepatoma hücreleri, kolon kanseri hücreleri ve akut T hücreli lösemiye içeren kanser hücrelerinde ALA'nın hücre ölümünü artırarak hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir [146-148]. Hem in vivo hem in vitro yapılan başka bir çalışmada ALA'nın akciğer kanseri büyümesini ve canlılığını azalttığını göstermişlerdir. ALA'nın akciğer kanseri için anti-kanser etkisi mTOR bağımlı otofaji inhibisyonu ile bağlantılıdır [149]. Mide kanseri hücrelerinde ALA MUC4'ün ekspresyonunu

azaltarak proliferasyonu ve invazyonu inhibe eder. Özellikle ALA MUC4'ü bağlayarak STAT3'ü baskılar [150]. Yapılan başka bir çalışmada ALA'nın AMPK aktivasyonu yoluyla ve ardından mTOR-S6 sinyal yolunun düzenlenmesini azaltarak tiroid kanseri hücre proliferasyon ve büyümesini engellediğini bulmuşlardır [134]. Çalışmamızda wound healing deneyi sonuçlarına göre ALA verilen SKOV-3 hücrelerinde, kontrol ve TGF β gruplarıyla karşılaştırıldığında proliferasyon ve migrasyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. Yine ALA+TGF β verilen grupta wound healig deney sonuçlarına göre SKOV-3 hücrelerinde proliferasyon ve migrasyon istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0.05$). Ancak çalışmamız ALA'nın SKOV-3 hücrelerinde migrasyon ve proliferasyonu nasıl azalttığına dair mekanizmasını anlamak için yetersizdir

Metastaz kaskadı çok basamaklı kompleks bir süreçtir, ilk kritik basamak ekstrasellüler bariyer boyunca hücre invazyonu ve bazal membran penetrasyonudur, bunu vasküler infiltrasyon, damar dışına çıkış ve uzak organ kolonizasyonu takip eder. Bu olaylar TGF β ve the fokal adezyon kinase isimli iki hayati yolak tarafından düzenlenir. Bir kez bu yollar aktive olduğunda, vimentin, Slug, Twist ve Snail gibi EMT-TF'ler ile uyarılır. Bu transkripsiyon faktörleri, E-kadherini azaltarak ve birkaç EMT belirtecinin aşırı ekspresyonunu tetikleyerek EMT'ye yol açar. Bu belirteçlerin ekspresyonu diğer kanser tiplerinde ALA tedavisi üzerinden azaltılır. Ayrıca, TGF β sinyali SMAD aktivasyonuna yol açtıktan sonra, EMT sürecinde olduğu bilinen SMAD yolu ALA tarafından inhibe edilir. Biz de çalışmamızda TGF- β grubunda E-kadherin ekspresyonunun azalıp, vimentin, Snail, Slug, Twist ve Zeb ekspresyonunun belirgin şekilde arttığını gördük. TGF- β grubunda yapılan immünohistokimya sonuçlarına göre normalde hücre zarı üzerinde bulunan E- kadherin pozitif boyanan hücre sayısı TGF- β grubunda, kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0,05$). Normalde sitoplazmada lokalize olan vimentin pozitif hücre sayısı TGF- β grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,05$). Yine çekirdekte Snail, Slug, Twist ve Zeb pozitif boyanan hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını gözlemledik ($p<0,05$). Çekirdeğe doğru toplanan bir transkripsiyonel faktör olan β -katenin de EMT'nin bir işareti olarak kabul edilir [151]. E-kadherin, β -katenin'in çekirdekten sitoplazmaya göçüne aracılık edebilir [152]. Son olarak biz de TGF- β 1 verilen SKOV-3 hücrelerinde

immünsitokimya boyama sonuçlarına göre hem çekirdekte toplanan β -katenin hem de hücre zarında E-cadherin azalması gözlemledik. TGF β 1 verilen SKOV-3 hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada da bizimle benzer sonuçlar bulunmuştur [137].

BCPAP ve HTH-83 tiroid kanseri hücre hatlarına yapılan bir çalışmada ALA verilmesinden sonra E-kadherin artmış, beta katenin ve vimentin gibi EMT belirteçleri azalmıştır. Bunun yanında Snail ve Twist gibi en önemli EMT transkripsiyonel faktörleri 48 saat ALA tedavisi sonrası azalmış olarak bulunmuştur [134]. Yapılan başka bir çalışmada MDA-MB-231 ve 4T1 isimli iki meme kanseri hücre hattında, ALA'nın Snail, vimentin ve Zeb gibi TGF β bağımlı EMT belirteçlerini bastırarak hücre migrasyonunu azalttığı gösterilmiştir [132]. Bizim çalışmamızda ise tek başına ALA verilen grubumuzda; ilginç bir şekilde E-kadherin azalmış, vimentin artmış buna karşın Snail, Slug, Zeb transkripsiyonel faktörlerinde bir değişiklik olmayıp, Twist'de ise belirgin bir azalma görülmüştür. EMT transkripsiyonel faktörleri olan Snail, Slug, Twist, Zeb arttıktan sonra E-kadherin azalıp, vimentin arttığı için, bunlar yükselmeden E-kadherinin azalıp vimentinin artması EMT'yi düşündürmemiştir. İmmünsitokimya sonuçlarında ise E-kadherin kontrol grubuyla kıyaslandığında, E- kadherin pozitif hücre sayısı kontrol grubuyla benzer bulundu, Snail, Slug, Twist ve Zeb'de çekirdekte değil de sitoplazmada boyanan pozitif hücre sayısının yüksek olduğu gözlemlendi, β -kateninde ise çekirdek dışı boyanma izlenmiştir. ALA+TGF β grubunda; E-kadherin, vimentin, Snail, Slug, Twist, Zeb' de belirgin azalma görülmüştür. İmmünsitokimya sonuçlarına göre, E-kadherin pozitif hücre sayısı ve sitoplazmada vimentin pozitif hücre sayısı kontrol grubuyla benzer bulundu, Snail, Slug, Twist ve Zeb'de çekirdekte değil de sitoplazmada boyanan pozitif hücre sayısının yüksek olduğu gözlemlendi. β -kateninde ise çekirdek dışı boyanma izlendi. Tüm bu bulgular ışığında TGF β uygulayarak EMT modeli kurduğumuz ve daha invaziv ve proliferatif hale getirdiğimiz SKOV-3 hücrelerinde, ALA uygulayarak proliferasyon, migrasyon ve invazyonun engellendiğini hem gen ve protein düzeyinde hem de morfolojik olarak gösterildi.

Diğer EMT tiplerinin aksine kanserde görülen EMT agresif ve kontrolsüzdür. Hem EMT hem de bunun tersi olan MET, kanser metastaz ve ilerlemesinde merkezi rol oynar. MET, EMT sırasında meydana gelen değişiklikleri tersine çevirme

işlemidir. MET geçiren metastatik hücre, epitel hücre özelliklerini geri kazanarak ikinci yerleştiği ortama uyum sağlar ve orada çoğalır. Doku kolonizasyonunu destekleyen MET süreci hakkında nispeten az şey bilinmektedir, ancak dahil olan mekanizmaların çoğunun EMT'ye bağlı olduğu açıktır. Twist, Snail1 ve Snail2 gibi birkaç EMT transkripsiyon faktörünün azalması hücrelerin epitel özelliklerini yeniden kazanmasını ve hücre büyümesini ve kolonizasyonunu artırır. MKKH'leri kolonizasyon oluşturmak ve primer tümöre benzeyen ikinci bir tümör oluşturmak için mezenkimal özelliklerini kaybeder yani MET geçirir [122]. Biz de çalışmamızda koloni deneyi sonrası gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi. TGF β grubu ve ALA+TGF β grubunda koloni sayısında kısmen bir azalma olması kolonileşmede MET'in önemli olduğunu düşündürmesine rağmen, ALA'nın kolonileşme üzerinde etki etmediği gözlemlendi.

SONUÇ

Çalışmamız alfa lipoik asitin (ALA), TGF- β 1 sinyal yolunu bloke ederek SKOV-3 over adenokarsinom hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve invazyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçları, lipoik asidin over kanserinin proliferasyon, invazyon ve metastazının önlenmesi için umut verici bir terapötik ajan olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, ALA'nın bu etkilerinin altında yatan mekanizmayı netleştirmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu, lipoik asidin moleküler mekanizması hakkında daha fazla çalışma yürütülerek doğrulanabilir.

KAYNAKLAR

1. Nguyen, V.H.L., et al., *The Role of microRNAs in Epithelial Ovarian Cancer Metastasis*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(19).
2. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2019*. CA Cancer J Clin, 2019. **69**(1): p. 7-34.
3. Boussios, S., et al., *Ovarian sex-cord stromal tumours and small cell tumours: Pathological, genetic and management aspects*. Crit Rev Oncol Hematol, 2017. **120**: p. 43-51.
4. Karlan, B.Y., R.D. Alvarez, and J.F. Strauss, 3rd, *Evolving Paradigms in Research and Care in Ovarian Cancers*. Obstet Gynecol, 2016. **128**(4): p. 771-774.
5. Ledermann, J.A., et al., *Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2013. **24 Suppl 6**: p. vi24-32.
6. Bodurka, D.C., et al., *Reclassification of serous ovarian carcinoma by a 2-tier system: a Gynecologic Oncology Group Study*. Cancer, 2012. **118**(12): p. 3087-94.
7. Loret, N., et al., *The Role of Epithelial-to-Mesenchymal Plasticity in Ovarian Cancer Progression and Therapy Resistance*. Cancers (Basel), 2019. **11**(6).
8. Lupia, M. and U. Cavallaro, *Ovarian cancer stem cells: still an elusive entity?* Mol Cancer, 2017. **16**(1): p. 64.
9. Webb, P.M. and S.J. Jordan, *Epidemiology of epithelial ovarian cancer*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2017. **41**: p. 3-14.
10. Tan, D.S., R. Agarwal, and S.B. Kaye, *Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer*. Lancet Oncol, 2006. **7**(11): p. 925-34.
11. Yeung, T.L., et al., *Cellular and molecular processes in ovarian cancer metastasis. A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2015. **309**(7): p. C444-56.
12. Lengyel, E., *Ovarian cancer development and metastasis*. Am J Pathol, 2010. **177**(3): p. 1053-64.
13. Dongre, A. and R.A. Weinberg, *New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2019. **20**(2): p. 69-84.
14. Bierie, B., et al., *Integrin-beta4 identifies cancer stem cell-enriched populations of partially mesenchymal carcinoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(12): p. E2337-E2346.
15. Chaffer, C.L., et al., *EMT, cell plasticity and metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2016. **35**(4): p. 645-654.
16. Pastushenko, I., et al., *Identification of the tumour transition states occurring during EMT*. Nature, 2018. **556**(7702): p. 463-468.
17. Brozovic, A., *The relationship between platinum drug resistance and epithelial-mesenchymal transition*. Archives of Toxicology, 2017. **91**(2): p. 605-619.
18. Guadamillas, M.C., A. Cerezo, and M.A. Del Pozo, *Overcoming anoikis--pathways to anchorage-independent growth in cancer*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 19): p. 3189-97.

19. Du, B.W. and J.S. Shim, *Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer*. *Molecules*, 2016. **21**(7).
20. Lu, W. and Y.B. Kang, *Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis*. *Developmental Cell*, 2019. **49**(3): p. 361-374.
21. Kafara, P., et al., *Lipoic acid decreases Mcl-1, Bcl-xL and up regulates Bim on ovarian carcinoma cells leading to cell death*. *J Ovarian Res*, 2015. **8**: p. 36.
22. Attia, M., et al., *An Overview of the Antioxidant Effects of Ascorbic Acid and Alpha Lipoic Acid (in Liposomal Forms) as Adjuvant in Cancer Treatment*. *Antioxidants*, 2020. **9**(5).
23. Tripathy, J., et al., *alpha-Lipoic acid prevents the ionizing radiation-induced epithelial-mesenchymal transition and enhances the radiosensitivity in breast cancer cells*. *Eur J Pharmacol*, 2020. **871**: p. 172938.
24. Tetkova, A., et al., *Follicle-stimulating hormone administration affects amino acid metabolism in mammalian oocytes*. *Biology of Reproduction*, 2019. **101**(4): p. 719-732.
25. Li, Y.Y., et al., *NEK5 regulates cell cycle progression during mouse oocyte maturation and preimplantation embryonic development*. *Molecular Reproduction and Development*, 2019. **86**(9): p. 1189-1198.
26. Gibson, E. and H. Mahdy, *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Ovary*, in *StatPearls*. 2020: Treasure Island (FL).
27. Mihiu, D. and C.M. Mihiu, *Ultrasonography of the uterus and ovaries*. *Med Ultrason*, 2011. **13**(3): p. 249-52.
28. Hoare, B.S. and Y.S. Khan, *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Female Internal Genitals*, in *StatPearls*. 2020: Treasure Island (FL).
29. Roach, M.K. and R.F. Andreotti, *The Normal Female Pelvis*. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 2017. **60**(1): p. 3-10.
30. Del Campo, M., et al., *Effect of Superior Ovarian Nerve and Plexus Nerve Sympathetic Denervation on Ovarian-Derived Infertility Provoked by Estradiol Exposure to Rats*. *Front Physiol*, 2019. **10**: p. 349.
31. Yoshino, T. and D. Saito, *Epithelial-to-mesenchymal transition-based morphogenesis of dorsal mesentery and gonad*. *Semin Cell Dev Biol*, 2019. **92**: p. 105-112.
32. Kuyama, H., *Reply to the letter to the editor concerning "Close relationship between the short round ligament and the ovarian prolapsed inguinal hernia in female infants"*. *Pediatric Surgery International*, 2019. **35**(10): p. 1165-1166.
33. Ross, M. and W. Pawlina, *Histology: a Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology (6th eds)*. 2010, Lippincott Williams & Wilkins.
34. Momenimovahed, Z., et al., *Incidence and mortality of uterine cancer and relationship with Human Development Index in the world*. *Cukurova Medical Journal*, 2017. **42**(2): p. 233-240.
35. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 2018. **68**(6): p. 394-424.
36. Coburn, S.B., et al., *International patterns and trends in ovarian cancer incidence, overall and by histologic subtype*. *International Journal of Cancer*, 2017. **140**(11): p. 2451-2460.

37. Yoneda, A., et al., *Breast and Ovarian Cancers: A Survey and Possible Roles for the Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2012. **60**(1): p. 9-21.
38. Jacobs, I.J. and U. Menon, *Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer*. Molecular & Cellular Proteomics, 2004. **3**(4): p. 355-366.
39. Badgwell, D. and R.C. Bast, *Early detection of ovarian cancer*. Disease Markers, 2007. **23**(5-6): p. 397-410.
40. Isherwood, A., J. Bamford, and A.V.J.R.d.É.e.d.S.P. Dupuy, *Ovarian cancer in select EU countries: incidence, treatable populations and sales by key drug class*. 2018. **66**: p. S286.
41. Sopik, V., et al., *Why have ovarian cancer mortality rates declined? Part I. Incidence*. 2015. **138**(3): p. 741-749.
42. Ferlay, J., et al., *GLOBOCAN 2012 v1. 0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Online]*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2013.
43. Chen, W., et al., *Cancer statistics in China, 2015*. CA Cancer J Clin, 2016. **66**(2): p. 115-32.
44. Siegel, R., A.J.A.C.S.C.F. Jemal, and Figures, *Cancer facts & figures 2015*. 2015.
45. Howlader, N.J.h.s.c.g.c., based on November SEER data submission, posted to the SEER web site, *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008*, National Cancer Institute, Bethesda, MD. 2011.
46. Allemani, C., et al., *Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2)*. Lancet, 2015. **385**(9972): p. 977-1010.
47. Sopik, V., et al., *Why have ovarian cancer mortality rates declined? Part I. Incidence*. Gynecol Oncol, 2015. **138**(3): p. 741-9.
48. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
49. Torre, L.A., et al., *Ovarian cancer statistics, 2018*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(4): p. 284-296.
50. Malvezzi, M., et al., *Global trends and predictions in ovarian cancer mortality*. Ann Oncol, 2016. **27**(11): p. 2017-2025.
51. Chornokur, G., et al., *Global ovarian cancer health disparities*. Gynecol Oncol, 2013. **129**(1): p. 258-64.
52. Chan, J.K., et al., *Ovarian cancer in younger vs older women: a population-based analysis*. Br J Cancer, 2006. **95**(10): p. 1314-20.
53. Mohammadian, M., et al., *Variations in the incidence and mortality of ovarian cancer and their relationship with the human development index in European Countries in 2012*. 2017. **4**(08): p. 1541-1557.
54. Poole, E.M., et al., *Hormonal and reproductive risk factors for epithelial ovarian cancer by tumor aggressiveness*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2013. **22**(3): p. 429-37.

55. Kim, S.J., et al., *Epidemiologic factors that predict long-term survival following a diagnosis of epithelial ovarian cancer*. Br J Cancer, 2017. **116**(7): p. 964-971.
56. Salazar-Martinez, E., et al., *Reproductive factors of ovarian and endometrial cancer risk in a high fertility population in Mexico*. Cancer Res, 1999. **59**(15): p. 3658-62.
57. Fathalla, M.F., *Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia?* Lancet, 1971. **2**(7716): p. 163.
58. Fujita, M., et al., *Smoking, earlier menarche and low parity as independent risk factors for gynecologic cancers in Japanese: a case-control study*. Tohoku J Exp Med, 2008. **216**(4): p. 297-307.
59. Titus-Ernstoff, L., et al., *Menstrual and reproductive factors in relation to ovarian cancer risk*. Br J Cancer, 2001. **84**(5): p. 714-21.
60. Kvåle, G., et al., *Reproductive factors and risk of ovarian cancer: a prospective study*. Int J Cancer, 1988. **42**(2): p. 246-51.
61. Moorman, P.G., et al., *Hormonal risk factors for ovarian cancer in premenopausal and postmenopausal women*. Am J Epidemiol, 2008. **167**(9): p. 1059-69.
62. Adami, H.O., et al., *Parity, age at first childbirth, and risk of ovarian cancer*. Lancet, 1994. **344**(8932): p. 1250-4.
63. Ness, R.B., et al., *Factors related to inflammation of the ovarian epithelium and risk of ovarian cancer*. Epidemiology, 2000. **11**(2): p. 111-7.
64. Jia, D., et al., *Inflammation is a key contributor to ovarian cancer cell seeding*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 12394.
65. Ness, R.B., et al., *Serologic evidence of past infection with Chlamydia trachomatis, in relation to ovarian cancer*. J Infect Dis, 2003. **187**(7): p. 1147-52.
66. Merritt, M.A., et al., *Talcum powder, chronic pelvic inflammation and NSAIDs in relation to risk of epithelial ovarian cancer*. Int J Cancer, 2008. **122**(1): p. 170-6.
67. Lin, H.W., et al., *Risk of ovarian cancer in women with pelvic inflammatory disease: a population-based study*. Lancet Oncol, 2011. **12**(9): p. 900-4.
68. Chiang, A.J., et al., *Risk factors in progression from endometriosis to ovarian cancer: a cohort study based on medical insurance data*. J Gynecol Oncol, 2018. **29**(3): p. e28.
69. Pavone, M.E. and B.M. Lyttle, *Endometriosis and ovarian cancer: links, risks, and challenges faced*. Int J Womens Health, 2015. **7**: p. 663-72.
70. Stewart, L.M., et al., *In vitro fertilization, endometriosis, nulliparity and ovarian cancer risk*. Gynecol Oncol, 2013. **128**(2): p. 260-4.
71. Rossing, M.A., et al., *Risk of epithelial ovarian cancer in relation to benign ovarian conditions and ovarian surgery*. Cancer Causes Control, 2008. **19**(10): p. 1357-64.
72. Caserta, R., et al., *[Small ovarian cysts in postmenopause: assessment of their malignant potential with vaginal ultrasonography and tumor marker Ca125 titration]*. Minerva Ginecol, 2001. **53**(1 Suppl 1): p. 120-4.
73. Sieh, W., et al., *Tubal ligation and risk of ovarian cancer subtypes: a pooled analysis of case-control studies*. Int J Epidemiol, 2013. **42**(2): p. 579-89.

74. Gaitskell, K., et al., *Tubal ligation and ovarian cancer risk in a large cohort: Substantial variation by histological type*. Int J Cancer, 2016. **138**(5): p. 1076-84.
75. Madsen, C., et al., *Tubal ligation and salpingectomy and the risk of epithelial ovarian cancer and borderline ovarian tumors: a nationwide case-control study*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2015. **94**(1): p. 86-94.
76. Tung, K.H., et al., *Reproductive factors and epithelial ovarian cancer risk by histologic type: a multiethnic case-control study*. Am J Epidemiol, 2003. **158**(7): p. 629-38.
77. Soegaard, M., et al., *Different risk factor profiles for mucinous and nonmucinous ovarian cancer: results from the Danish MALOVA study*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(6): p. 1160-6.
78. Tsilidis, K.K., et al., *Oral contraceptive use and reproductive factors and risk of ovarian cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. Br J Cancer, 2011. **105**(9): p. 1436-42.
79. Risch, H.A., et al., *Differences in risk factors for epithelial ovarian cancer by histologic type. Results of a case-control study*. Am J Epidemiol, 1996. **144**(4): p. 363-72.
80. Rossing, M.A., et al., *Menopausal hormone therapy and risk of epithelial ovarian cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(12): p. 2548-56.
81. Hempling, R.E., et al., *Hormone replacement therapy as a risk factor for epithelial ovarian cancer: results of a case-control study*. Obstet Gynecol, 1997. **89**(6): p. 1012-6.
82. Glud, E., et al., *Hormone therapy and the impact of estrogen intake on the risk of ovarian cancer*. Arch Intern Med, 2004. **164**(20): p. 2253-9.
83. Lacey, J.V., Jr., et al., *Menopausal hormone replacement therapy and risk of ovarian cancer*. Jama, 2002. **288**(3): p. 334-41.
84. Lerner-Geva, L., et al., *Are infertility treatments a potential risk factor for cancer development? Perspective of 30 years of follow-up*. Gynecol Endocrinol, 2012. **28**(10): p. 809-14.
85. Reigstad, M.M., et al., *Cancer Risk in Women Treated with Fertility Drugs According to Parity Status-A Registry-based Cohort Study*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2017. **26**(6): p. 953-962.
86. Shushan, A., et al., *Human menopausal gonadotropin and the risk of epithelial ovarian cancer*. Fertil Steril, 1996. **65**(1): p. 13-8.
87. Kazerouni, N., et al., *Family history of breast cancer as a risk factor for ovarian cancer in a prospective study*. Cancer, 2006. **107**(5): p. 1075-83.
88. Mori, M., et al., *Reproductive, genetic, and dietary risk factors for ovarian cancer*. Am J Epidemiol, 1988. **128**(4): p. 771-7.
89. Walsh, T., et al., *Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(44): p. 18032-7.
90. Toss, A., et al., *Hereditary ovarian cancer: not only BRCA 1 and 2 genes*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 341723.
91. Andrews, L. and D.G. Mutch, *Hereditary Ovarian Cancer and Risk Reduction*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2017. **41**: p. 31-48.

92. Kotsopoulos, J., et al., *Age-specific ovarian cancer risks among women with a BRCA1 or BRCA2 mutation*. *Gynecol Oncol*, 2018. **150**(1): p. 85-91.
93. Iordache, P.D., et al., *Identification of Lynch syndrome risk variants in the Romanian population*. *J Cell Mol Med*, 2018. **22**(12): p. 6068-6076.
94. Lu, K.H. and M. Daniels, *Endometrial and ovarian cancer in women with Lynch syndrome: update in screening and prevention*. *Fam Cancer*, 2013. **12**(2): p. 273-7.
95. Nakamura, K., et al., *Features of ovarian cancer in Lynch syndrome (Review)*. *Mol Clin Oncol*, 2014. **2**(6): p. 909-916.
96. Helder-Woolderink, J.M., et al., *Ovarian cancer in Lynch syndrome; a systematic review*. *Eur J Cancer*, 2016. **55**: p. 65-73.
97. Pan, S.Y., et al., *A case-control study of diet and the risk of ovarian cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004. **13**(9): p. 1521-7.
98. Ong, J.S., et al., *Association of vitamin D levels and risk of ovarian cancer: a Mendelian randomization study*. *Int J Epidemiol*, 2016. **45**(5): p. 1619-1630.
99. Bandera, E.V., et al., *Impact of body mass index on ovarian cancer survival varies by stage*. *Br J Cancer*, 2017. **117**(2): p. 282-289.
100. Rodriguez, C., et al., *Body mass index, height, and the risk of ovarian cancer mortality in a prospective cohort of postmenopausal women*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002. **11**(9): p. 822-8.
101. Anderson, J.P., J.A. Ross, and A.R.J.C.I.I.J.o.t.A.C.S. Folsom, *Anthropometric variables, physical activity, and incidence of ovarian cancer: The Iowa Women's Health Study*. 2004. **100**(7): p. 1515-1521.
102. Cottreau, C.M., et al., *Physical activity and reduced risk of ovarian cancer*. 2000. **96**(4): p. 609-614.
103. Moorman, P.G., et al., *Recreational physical activity and ovarian cancer risk and survival*. 2011. **21**(3): p. 178-187.
104. Webb, P.M., et al., *Alcohol, wine, and risk of epithelial ovarian cancer*. 2004. **13**(4): p. 592-599.
105. Schouten, L.J., et al., *Alcohol and ovarian cancer risk: results from the Netherlands Cohort Study*. 2004. **15**(2): p. 201-209.
106. Kuper, H., et al., *Population based study of coffee, alcohol and tobacco use and risk of ovarian cancer*. 2000. **88**(2): p. 313-318.
107. Goodman, M.T., K.-H.J.C.C. Tung, and Control, *Active and passive tobacco smoking and the risk of borderline and invasive ovarian cancer (United States)*. 2003. **14**(6): p. 569-577.
108. Jordan, S.J., et al., *Risk factors for benign, borderline and invasive mucinous ovarian tumors: epidemiological evidence of a neoplastic continuum?* 2007. **107**(2): p. 223-230.
109. Momenimovahed, Z., et al., *Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors*. 2019. **11**: p. 287.
110. Roett, M.A. and P.J.A.f.p. Evans, *Ovarian cancer: an overview*. 2009. **80**(6): p. 609-616.
111. Kroeger, P.T., Jr. and R. Drapkin, *Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer*. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2017. **29**(1): p. 26-34.
112. Stewart, C., C. Ralyea, and S. Lockwood, *Ovarian Cancer: An Integrated Review*. *Semin Oncol Nurs*, 2019. **35**(2): p. 151-156.
113. Colombo, N., et al., *Ovarian cancer*. 2006. **60**(2): p. 159-179.

114. Matulonis, U.A., et al., *Ovarian cancer*. 2016. **2**(1): p. 1-22.
115. Yousefi, M., et al., *Current insights into the metastasis of epithelial ovarian cancer-hopes and hurdles*. 2020. **43**(4): p. 515-538.
116. Ediriweera, M.K., K.H. Tennekoon, and S.R. Samarakoon. *Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance*. in *Seminars in cancer biology*. 2019. Elsevier.
117. Orr, B. and R.P.J.H.O.C. Edwards, *Diagnosis and treatment of ovarian cancer*. 2018. **32**(6): p. 943-964.
118. Lheureux, S., et al., *Epithelial ovarian cancer*. 2019. **393**(10177): p. 1240-1253.
119. Webb, P.M., et al., *Epidemiology of epithelial ovarian cancer*. 2017. **41**: p. 3-14.
120. Kuroki, L. and S.R.J.B. Guntupalli, *Treatment of epithelial ovarian cancer*. 2020. **371**.
121. Kroeger Jr, P.T., R.J.C.o.i.o. Drapkin, and gynecology, *Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer*. 2017. **29**(1): p. 26.
122. Singh, M., et al., *EMT: Mechanisms and therapeutic implications*. 2018. **182**: p. 80-94.
123. Loret, N., et al., *The role of epithelial-to-mesenchymal plasticity in ovarian cancer progression and therapy resistance*. 2019. **11**(6): p. 838.
124. Debnath, P., et al., *Epithelial–mesenchymal transition and its transcription factors*. *Bioscience Reports*, 2021. **42**(1).
125. Dongre, A. and R.A.J.N.r.M.c.b. Weinberg, *New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer*. 2019. **20**(2): p. 69-84.
126. Heldin, C.-H., M. Vanlandewijck, and A.J.F.I. Moustakas, *Regulation of EMT by TGF β in cancer*. 2012. **586**(14): p. 1959-1970.
127. Lu, W. and Y.J.D.c. Kang, *Epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression and metastasis*. 2019. **49**(3): p. 361-374.
128. Attia, M., et al., *An overview of the antioxidant effects of ascorbic acid and alpha lipoic acid (in liposomal forms) as adjuvant in cancer treatment*. 2020. **9**(5): p. 359.
129. Farhat, D. and H. Lincet, *Lipoic acid a multi-level molecular inhibitor of tumorigenesis*. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020. **1873**(1): p. 188317.
130. Kafara, P., et al., *Lipoic acid decreases Mcl-1, Bcl-xL and up regulates Bim on ovarian carcinoma cells leading to cell death*. 2015. **8**(1): p. 1-13.
131. Davidson, B., C.G. Trope, and R.J.F.i.o. Reich, *Epithelial–mesenchymal transition in ovarian carcinoma*. 2012. **2**: p. 33.
132. Tripathy, J., et al., *α -Lipoic acid inhibits the migration and invasion of breast cancer cells through inhibition of TGF β signaling*. 2018. **207**: p. 15-22.
133. Tripathy, J., et al., *α -Lipoic acid prevents the ionizing radiation-induced epithelial-mesenchymal transition and enhances the radiosensitivity in breast cancer cells*. *Eur J Pharmacol*, 2020. **871**: p. 172938.
134. Jeon, M.J., et al., *Alpha lipoic acid inhibits proliferation and epithelial mesenchymal transition of thyroid cancer cells*. 2016. **419**: p. 113-123.
135. Wong, A.S. and N.J.O.C. Auersperg, *Normal ovarian surface epithelium*. 2002: p. 161-183.

136. Sundfeldt, K., et al., *E-cadherin expression in human epithelial ovarian cancer and normal ovary*. 1997. **74**(3): p. 275-280.
137. Hou, Y.-F., et al., *1 α , 25 (OH) 2D3 Suppresses the Migration of Ovarian Cancer SKOV-3 Cells through the Inhibition of Epithelial–Mesenchymal Transition*. 2016. **17**(8): p. 1285.
138. Imamura, T., A. Hikita, and Y.J.B.c. Inoue, *The roles of TGF- β signaling in carcinogenesis and breast cancer metastasis*. 2012. **19**(2): p. 118-124.
139. Knauf, J.A., et al., *Progression of BRAF-induced thyroid cancer is associated with epithelial–mesenchymal transition requiring concomitant MAP kinase and TGF β signaling*. 2011. **30**(28): p. 3153-3162.
140. Zavadil, J. and E.P.J.O. Böttinger, *TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions*. 2005. **24**(37): p. 5764-5774.
141. Saunders, D., et al., *Inhibition of c-myc in breast and ovarian carcinoma cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D3, retinoic acid and dexamethasone*. 1993. **4**(2): p. 201-208.
142. Pang, M., et al., *TGF- β 1-induced EMT promotes targeted migration of breast cancer cells through the lymphatic system by the activation of CCR7/CCL21-mediated chemotaxis*. 2016. **35**(6): p. 748-760.
143. Goswami, M.T., et al., *Regulation of complement-dependent cytotoxicity by TGF- β -induced epithelial–mesenchymal transition*. 2016. **35**(15): p. 1888-1898.
144. Liu, R.-Y., et al., *JAK/STAT3 signaling is required for TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells*. 2014. **44**(5): p. 1643-1651.
145. Farhat, D. and H.J.B.e.B.A.-R.o.C. Lincet, *Lipoic acid a multi-level molecular inhibitor of tumorigenesis*. 2020. **1873**(1): p. 188317.
146. van de Mark, K., et al., *Alpha-lipoic acid induces p27Kip-dependent cell cycle arrest in non-transformed cell lines and apoptosis in tumor cell lines*. *J Cell Physiol*, 2003. **194**(3): p. 325-40.
147. Wenzel, U., A. Nickel, and H. Daniel, *alpha-Lipoic acid induces apoptosis in human colon cancer cells by increasing mitochondrial respiration with a concomitant O₂-*-generation*. *Apoptosis*, 2005. **10**(2): p. 359-68.
148. Shi, D.Y., et al., *Alpha-lipoic acid induces apoptosis in hepatoma cells via the PTEN/Akt pathway*. *FEBS Lett*, 2008. **582**(12): p. 1667-71.
149. Peng, P., et al., *Alpha-lipoic acid inhibits lung cancer growth via mTOR-mediated autophagy inhibition*. 2020. **10**(4): p. 607-618.
150. Yang, Y., et al., *The Antioxidant Alpha-Lipoic Acid Inhibits Proliferation and Invasion of Human Gastric Cancer Cells via Suppression of STAT3-Mediated MUC4 Gene Expression*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. **2019**: p. 3643715.
151. Lee, J.M., et al., *The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease*. 2006. **172**(7): p. 973-981.
152. Egan, J.B., et al., *Vitamin D receptor ligands, adenomatous polyposis coli, and the vitamin D receptor FokI polymorphism collectively modulate β -catenin activity in colon cancer cells*. 2010. **49**(4): p. 337-352.