



AGOMELATİN'İN ANTI-KANSER ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Doktora Tezi

FATMA ÖZÇELİK

Eskişehir, 2025

AGOMELATİN'İN ANTI-KANSER ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

FATMA ÖZÇELİK

DOKTORA TEZİ

Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zerrin SELLER

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Temmuz 2025

Eskişehir

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü tarafından 2212S212 proje numarası ve 1002 TÜBİTAK Acil Destek (124S286) ile desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Fatma ÖZÇELİK'in "Agomelatin'in Anti-Kanser Etkilerinin Belirlenmesi" başlıklı tezi .././2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyokimya Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Ünvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Danışman)	: Prof. Dr. Zerrin SELLER	
Üye	: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR	
Üye	: Doç. Dr. Emel ERGENE	
Üye	: Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN	
Üye	: Dr. Öğr. Üy. Seda Mehtap SARI KILIÇASLAN	

Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

Lisansüstü Eğitim Enstitü Müdürü

ÖZET

AGOMELATİN'İN ANTİ-KANSER ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Fatma ÖZÇELİK

Biyokimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Temmuz 2025

Danışman: Prof. Dr. Zerrin SELLER

Kanser, dünyada sıklığı giderek artan, kalp damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alan bir hastalıktır. Ovaryum kanseri, jinekolojik kanserler arasında en yüksek ölüm oranına sahip kanser türüdür. Agomelatin antidepresan ilaç olarak geliştirilmiş melatonin hormonunun sentetik analogudur. Antidepresan etkileri dışında araştırılan çalışmalar giderek artmaktadır. Sisplatin, kanser tedavilerinde tek başına veya kombinasyon halinde kullanımı yaygın olan güçlü bir anti-kanser ajandır. miR-340-5p memeliler arasında yüksek oranda korunmuştur ve kanser patogeninde önemlidir.

Tez çalışmamızda, SKOV-3 ovaryum kanseri hücrelerinde agomelatin ve sisplatin'in IC_{50} dozları ile uygun kombinasyon dozları belirlendikten sonra miR-340-5p transfeksiyonun işlemleri yapılmıştır. miR-340-5p transfeksiyonu yapılan SKOV-3 hücre hattına agomelatin IC_{50} , sisplatin IC_{50} ve kombine % 40 dozları uygulanarak gerçek zamanlı analiz yöntemi (RTCA) yöntemi ile hücre proliferasyonuna ve migrasyonuna etkisi incelenmiştir. Elde edilen deneysel sonuçlarda miR-340-5p transfekte edilmiş SKOV-3 hücre hatlarında agomelatin IC_{50} , sisplatin IC_{50} veya kombine % 40 ilaç uygulanan hücre gruplarında proliferasyonu oranını düşürdüğü, migrasyon oranının ise yalnızca agomelatin IC_{50} hücre gruplarında düştüğü belirlenmiştir. Annexin V-FITC ve Akridin oranj/Etidyum bromür boyama yöntemi ile elde edilen sonuçlar, miR-340-5p transfekte edilen ve ilaç uygulaması sonrasında, apoptotik SKOV-3 hücre sayısında artış gösterdiği saptanmıştır. Sonuç olarak, agomelatin'in anti-kanser etkili olabileceği ve kombine tedavinin ayrı ayrı kullanımına göre daha etkili olabileceği görülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Agomelatin, Ovaryum Kanseri, miR-340-5p, Sisplatin

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE ANTI-CANCER EFFECTS OF AGOMELATINE

Fatma ÖZÇELİK

Department of Biochemistry

Anadolu University, Postgraduate Education Institute, July 2025

Supervizör: Prof. Dr. Zerrin SELLER

Cancer is a disease that is increasingly common in the world, ranking second after cardiovascular diseases. Ovarian cancer is the type of cancer with the highest mortality rate among gynecologic cancers. Agomelatine is a synthetic analogue of the melatonin hormone developed as an antidepressant drug. Studies investigating its antidepressant effects are on the rise. Cisplatin is a potent anticancer agent. It is widely used alone and in combination in cancer treatments. miR-340-5p is highly conserved across mammals and plays a crucial role in cancer pathogenesis.

In this thesis, miR-340-5p transfection procedures were performed after determining the IC₅₀ doses of agomelatine and cisplatin with the appropriate combination doses on SKOV-3 ovarian cancer cells. Agomelatine IC₅₀, cisplatin IC₅₀, and combined 40% doses were applied to the miR-340-5p transfected SKOV-3 cells, and their effects on cell proliferation and migration were investigated by the real-time analysis (RTCA) method. In the experimental results obtained, it was determined that the miR-340-5p transfected SKOV-3 cell lines, a proliferation rate in agomelatine IC₅₀, cisplatin IC₅₀, and combined 40% drug-treated cell groups, while the migration rate decreased in the cell groups treated with agomelatine IC₅₀. Apoptosis cell ratios were determined by the Annexin V-FITC kit and Acridine orange/Ethidium bromide staining method, and the apoptotic cell number increased in SKOV-3 cell lines transfected with miR-340-5p after application of the drug dose. The results obtained show that agomelatine may be effective in anti-cancer and that combining treatment may be effective in combination rather than using them separately in treatment.

Keywords: Agomelatine, Ovary Cancer, miR-340-5p, Cisplatin

.../.../2025

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

FATMA ÖZÇELİK

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve çalışmalarım boyunca bilgi, beceri, tecrübe ve etik ahlakına hayran kaldığım, emeğini esirgemeyen, yol gösterici, cesaretlendirici ve mesleki hayatımda örnek alacağım, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Zerrin SELLER'e,

Çalışmalarında destek ve motivasyonlarını her zaman hissettiren laboratuvar arkadaşlarım, Dr. Canan YILMAZ KAPANCIK, İbrahim Halil ÇELİK, Elif APAYDIN YAŞAR ve Gamze YILMAZ'a,

Bilgilerinden yararlandığım tüm bölüm hocalarıma ve çalışmamda desteğini esirgemeyen Mikrobiyoloji ABD'dan sayın Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK'e,

Tez çalışmamızda maddi destek olan Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (AÜBAP) Komisyonu'na ve TÜBİTAK'a,

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, sevgili AİLEM'e...

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

.../.../2025

ETİK KURUL BELGESİ BEYANNAMESİ

Bu tez çalışmasının hazırlanmasında, yürütülmesinde, verilerin analizinde Etik Kurul İzni'ne gerek yoktur.

.....

Fatma ÖZÇELİK



.../.../2025

ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI

Bu tez hazırlanması, yürütülmesi, verilerin analizi vb. aşamalarının herhangi birinde üretken yapay zekâ programlarından yararlanmadığımı beyan ederim.

.....

Fatma ÖZÇELİK



İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAY ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	v
TEŞEKKÜR	vi
ETİK KURUL BELGESİ BEYANNAMESİ	vii
ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI	viii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1 GİRİŞ	1
1.1 Araştırma Konusunun Tanımı.....	1
1.2 Önemi	2
1.3 Amacı.....	2
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Kanser Biyolojisi	3
2.2 Ovaryum Kanseri.....	10
2.2.1 Ovaryum kanserinin alt tipleri.....	11
2.2.2 Ovaryum kanseri risk faktörleri.....	16
2.2.2.1 Genetik.....	16
2.2.2.2 Yaş	16
2.2.2.3 Obezite ve fiziksel aktivite	16

2.3 Agomelatin	16
2.4 Sisplatin	20
2.5 MikroRNA (miRNA)	22
2.5.1 Tanımı	22
2.5.2 miRNA biyogenezi	22
2.5.3 miRNA ve kanser	24
2.5.4 Ovaryum kanserinde miRNA	25
2.5.5 miRNA-340 (miR-340) ve etki mekanizması	26
3 YÖNTEM	28
3.1 Hücre Hattı	28
3.2 Materyaller	28
3.2.1 Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler	28
3.2.2 Ekipmanlar	29
3.2.3 Kullanılan ticari kitler	29
3.2.4 Kullanılan bilgisayar programları	30
3.2.5 Agomelatin bileşiğinin çözündürülmesi ve hazırlanması	30
3.2.6 Sisplatin bileşiğinin çözündürülmesi ve hazırlanması	30
3.2.7 miR-340-5p mimik, miRNA-340-5p inhibitör, mimik ve inhibitör negatif kontrollerinin stok konsantrasyonlarının hazırlanması	30
3.2.8 Hücre kültürü	31
3.2.9 Sitotoksisite belirleme testi	31
3.2.9.1 MTT yöntemi ile Agomelatin ve Sisplatinin IC_{50} dozlarının belirlenmesi	31
3.2.9.2 Kombinasyon dozları ve sitotoksik etkilerinin belirlenmesi	32
3.2.9.3 Kombinasyon indeksinin (CI) belirlenmesi	33

3.2.10 Hücrelere miRNA'nın transfekte edilmesi ve transfeksiyon konsantrasyonunun belirlenmesi	33
3.2.11 MiR-340-5p transfeksiyonun verimliliğinin BLOCK-iT Alexa Fluor kırmızı floresan ile kontrolü ve görüntülenmesi.....	34
3.2.12 Hücre proliferasyon oranının RTCA ile belirlenmesi.....	35
3.2.13 Hücre migrasyon oranının RTCA ile belirlenmesi	36
3.2.14 Apoptoz düzeylerinin flow sitometri cihazı aracılığıyla belirlenmesi....	36
3.2.15 Kaspaz-3 aktivasyon düzeylerinin belirlenmesi	37
3.2.16 Akridin oranj (AO) ve Etidyum Bromür (EB) boyama ile apoptozun belirlenmesi	38
3.2.17 İstatistiksel analiz	39
4 BULGULAR VE YORUM.....	40
4.1 Agomelatin'in Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	41
4.2 Sisplatin'in Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	42
4.3 Kombine Dozlarla Sitotoksik Etkilerin Belirlenmesi.....	43
4.4 miR-340-5p Mimik ya da İnhibitörün Farklı Dozlarının Proliferasyon Üzerine Etkisi	44
4.5 miR-340-5p Transfeksiyon Verimliliğinin BLOCK-iT Alexa Fluor Kırmızı Floresan ile Belirlenmesi	47
4.6 Agomelatin, Sisplatin veya Kombine İlaç Uygulamalarının SKOV-3 Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi	48
4.7 miR-340-5p Transfekte SKOV-3 Hücre Proliferasyonu Üzerine Agomelatin, Sisplatin ve Kombine İlaç Uygulamasının Etkilerinin Belirlenmesi	53
4.8 Agomelatin, Sisplatin ve Kombine Doz Uygulamalarının SKOV-3 Hücre Migrasyonu Üzerine Etkisi.....	63
4.9 miR-340-5p ayrı ayrı ya da Agomelatin, Sisplatin ve Kombine İlaç Uygulamaları Sonrasında Hücre Migrasyonu Üzerine Etkileri	65
4.10 Apoptoz Düzeylerinin Akım Siometrisi ile Belirlenmesi	71

4.11 Kaspaz-3 Aktivasyonunun Belirlenmesi	79
4.12 Akridin Oranj (AO) ve Etidyum Bromür (EB) Boyama ile Apoptozun Belirlenmesi	80
5 SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	86
5.1 Sonuç	86
5.2 Tartışma	87
5.3 Öneriler	95
KAYNAKÇA.....	96
EKLER	
ÖZ GEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1 Dünya Sağlık Örgütü Over Kanseri Histolojik Sınıflaması.....	12
Tablo 2.2 FIGO Yumurtalık Kanseri Evreleme Sınıflandırması.....	14
Tablo 3.1 Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler.....	28
Tablo 3.2 Ekipmanlar.....	29
Tablo 3.3 Kullanılan Ticari Kitler.....	29
Tablo 3.4 Kullanılan Bilgisayar Programları.....	30
Tablo 4.1 Agomelatin ve Sisplatin'in IC ₅₀ Dozları Üzerinden Farklı Yüzdelerde Oluşturulan Kombinasyonlarının SKOV-3 Ovaryum Kanseri Hücre Hatlarındaki Sitotoksikite Verileri Kullanılarak Hesaplanan Kombinasyon İndeksleri (CI).....	44
Tablo 4.2 SKOV-3 Ovaryum Kanseri Hücrelerinde BLOCK-iT Alexa Fluor Kırmızı Fluorasan ile Farklı Konsantrasyon (10 nM, 25 nM, 50 nM) ve Zamanda (24 saat, 48 saat ve 72 saat) Hesaplanan Transfeksiyon Verimliliği.....	48
Tablo 4.3 SKOV-3 Hücrelerinde miR-340-5p Transfeksiyonu Sonrasında Agomelatin IC ₅₀ , Sisplatin IC ₅₀ ve Kombine % 40 Uygulaması Sonrası 24 Saatlik Erken ve Geç Apoptoz % Oranları.....	73
Tablo 4.4 SKOV-3 Hücrelerinde miR-340-5p Transfeksiyonu Sonrasında Agomelatin IC ₅₀ , Sisplatin IC ₅₀ ve Kombine % 40 Uygulaması Sonrası 48 Saatlik Erken ve Geç Apoptoz % Oranları.....	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1	Reseptör Tirozin Kinaz Sinyal Yolları	5
Şekil 2.2	Ovaryum Kanseri Tümör Mikroçevresi.....	6
Şekil 2.3	Apoptoz Yolları.....	8
Şekil 2.4	Kadın Üreme Sistemi Anatomisi.....	10
Şekil 2.5	2022 Yılındaki Çeşitli Jinekolojik Kanserlerin % Tanı ve Ölüm Oranları....	11
Şekil 2.6	Ovaryum Kanserinin Farklı Evreleri.....	15
Şekil 2.7	Agomelatin ve Melatoninin Kimyasal Yapısı.....	17
Şekil 2.8	Melatonerjik Reseptörlerdeki Agomelatinin Agonist Özellikleri.....	18
Şekil 2.9	5-HT _{2C} Reseptörlerinde Agomelatinin Antagonist Özellikleri.....	20
Şekil 2.10	Sisplatin'in Kimyasal Yapısı.....	21
Şekil 2.11	miRNA Biyogenezi.....	23
Şekil 2.12	miR-340'ın Kanser Hücresi Proliferasyon, Apoptoz ve İnvazyon ve Metastazın Düzenlenmesinde İlgili Genlerle İlişkisi.....	27
Şekil 4.1	SKOV-3 Hücrelerinin 24 ve 48 Saat Agomelatin Uygulanması Sonrasındaki % Canlılık Oranları.....	41
Şekil 4.2	SKOV-3 Hücrelerinin 24 ve 48 Saat Sisplatin Uygulanması Sonrasındaki % Canlılık Oranları.....	42
Şekil 4.3	Agomelatin ve Sisplatin'in IC ₅₀ Dozları Üzerinden Farklı Yüzdelerde Oluşturulan Kombinasyonlarının Sitotoksikite Verileri Kullanılarak Hesaplanan Kombinasyon İndeksleri (CI < 1 (Sinerjist), CI =1 (Aditif), CI > 1(Antagonist)).....	44
Şekil 4.4	25 nM miR-340-5p Mimik, miR-340-5p İnhibitör ve Negatif Kontrolleri ile Transfekte Edilen SKOV-3 Hücrelerinin Proliferasyonu Oranları.....	45

Şekil 4.5 30 nM miR-340-5p Mimik, miR-340-5p İnhibitör ve Negatif Kontrolleri ile Transfekte Edilen SKOV-3 Hücrelerinin Proliferasyonu Oranları.....	45
Şekil 4.6 50 nM miR-340-5p Mimik, miR-340-5p İnhibitör ve Negatif Kontrolleri ile Transfekte Edilen SKOV-3 Hücrelerinin Proliferasyonu Oranları.....	46
Şekil 4.7 BLOCK-iT Alexa Fluor Fluoresan Boyası ile Transfeksiyon Verimliliği (20×).....	47
Şekil 4.8 SKOV-3 Hücrelerine E-plakalarda Agomelatin IC ₅₀ , Sisplatin IC ₅₀ ve Kombine (%10, %20, %30, %40) Uygulamasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi.....	49
Şekil 4.9 SKOV-3 Hücrelerine Agomelatin IC ₅₀ , Sisplatin IC ₅₀ ve Kombine Doz Uygulamalarının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi.....	50
Şekil 4.10 SKOV-3 Hücrelerine Agomelatin IC ₅₀ , Sisplatin IC ₅₀ ve Kombine Doz Uygulamalarının Işık Mikroskobu Görüntüleri (20×).....	51
Şekil 4.11 SKOV-3 Hücrelerine E-plakalarda miR-340-5p Mimik, miR-340-5p İnhibitör ve Negatif Kontrollerinin Transfeksiyonu Sonrasında Agomelatin IC ₅₀ , Sisplatin IC ₅₀ ve Kombine % 40 Uygulamasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi.....	53
Şekil 4.12 SKOV-3 Hücrelerine miR-340-5p ve Agomelatin IC ₅₀ Uygulamasının Zaman Bağlı Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi.....	54
Şekil 4.13 SKOV-3 Hücrelerine miR-340-5p ve Sisplatin IC ₅₀ Uygulamasının Zamana Bağlı Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi.....	56
Şekil 4.14 SKOV-3 Hücrelerine miR-340-5p ve Kombine % 40 Uygulamasının Zamana Bağlı Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi.....	57
Şekil 4.15 miR-340-5p Transfekte Edilmiş SKOV-3 Hücrelerine Agomelatin IC ₅₀ , Sisplatin IC ₅₀ ve % 40 Kombine Doz Uygulamalarının Işık Mikroskobu Görüntüleri (20×).....	60
Şekil 4.16 SKOV-3 Hücrelerinin CIM-platelerde Agomelatin IC ₅₀ , Sisplatin IC ₅₀ ve Kombine % 40 Uygulama Gruplarının Zamana Karşı Grafiği.....	64

Şekil 4.17 SKOV-3 Hücrelerinin Agomelatin IC ₅₀ , Sisplatin IC ₅₀ ve Kombine % 40 Uygulama Sonrası Zamana Bağlı Migrasyon Oranları.....	64
Şekil 4.18 SKOV-3 Hücrelerinin CIM Platelere miR-340-5p Mimik, miR-340-5p İnhibitör ve Negatif Kontrollerinin Transfeksiyonu Sonrasında Agomelatin IC ₅₀ , Sisplatin IC ₅₀ ve Kombine % 40 Uygulamasının Hücre Migrasyonu Üzerine Etkisi....	66
Şekil 4.19 SKOV-3 Hücrelerine miR-340-5p ve Agomelatin IC ₅₀ Uygulamasının Hücre Migrasyonu Üzerine Etkisi.....	67
Şekil 4.20 SKOV-3 Hücrelerine miR-340-5p ve Sisplatin IC ₅₀ Uygulamasının Hücre Migrasyonu Üzerine Etkisi.....	69
Şekil 4.21 SKOV-3 Hücrelerine miR-340-5p ve Kombine % 40 Uygulamasının Hücre Migrasyonu Üzerine Etkisi.....	70
Şekil 4.22 SKOV-3 Hücrelerinde 24 Saatlik Apoptoz Düzeylerinin Akım Sitometri Cihazıyla Belirlenmesi.....	71
Şekil 4.23 SKOV-3 Hücrelerinde 48 Saatlik Apoptoz Düzeylerinin Akım Sitometri Cihazıyla Belirlenmesi.....	75
Şekil 4.24 SKOV-3 Hücrelerinde Kaspaz 3 Aktivitelerinin Akım Sitometri Cihazıyla Belirlenmesi.....	79
Şekil 4.25 SKOV-3 Hücrelerine miR-340-5p Transfeksiyon Sonrasında Agomelatin IC ₅₀ , Sisplatin IC ₅₀ ve Kombine % 40 Uygulamalarından 24 Saat sonra AO/EB ile Boyanmış Canlı ve Apoptotik Hücre Görüntüleri (40×).....	80
Şekil 4.26 SKOV-3 Hücrelerine miR-340-5p Transfeksiyon Sonrasında agomelatin IC ₅₀ , Sisplatin IC ₅₀ ve Kombine % 40 Uygulamalarından 48 Saat Sonra AO/EB ile Boyanmış Canlı ve Apoptotik Hücre Görüntüleri (40×).....	83

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AKT	: Serin/Treonin Protein Kinaz
ATP	: Adenozin Tri Fosfat
AO	: Akridin Oranj
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CDK	: Cyclin Dependent Kinase (Siklin bağımlı kinaz)
Cis (CDDP)	: Sisplatin
CI	: Kombinasyon İndeksi
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksirübönükleik Asit
ECM	: Extracellular Matrix (Hücre dışı Matriks)
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü)
ERK	: Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyen Kinaz
EMT	: Epitel-mezenkimal Geçiş
EB	: Etidyum Bromür
FGFR	: Fibroblast Growth Factor Receptor (Fibroblast büyüme faktörü Reseptörü)
FADD	: Fas Reseptörü ile İlişkili Ölüm Alanı
Fas	: Hücre Yüzeyi Ölüm Reseptörü
FasL	: Fas Ligandı
IC ₅₀	: Maksimum inhibisyonun % 50'sini oluşturan doz
IGFR	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktör Reseptörü
JAK	: Janus Kinase (Janus kinaz)
JNK	: Jun Amino-terminal Kinaz
MAPK	: Mitojenle Aktive olan Protein Kinaz
miRNA	: mikroRNA
MT	: Melatonin Reseptörü

MTT	: 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5difeniltetrazolyum bromür
OV	: Ovaryum (yumurtalık) kanseri
p53	: p53 proteini
PDGFR	: Trombosit Büyüme Faktör Reseptörü
PI3K	: Fosfatidil İnositol 3-Kinaz
PK	: Protein Kinaz
RNA	: Ribonükleik Asit
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
RTCA	: Gerçek Zamanlı Hücre Analizi
SKOV-3	: İnsan Yumurtalık Kanseri Hücre Hattı
STAT	: Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü
TME	: Tümör Mikroçevre
UPR	: Katlanmamış Protein Yanıtı
VEGFR	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörü
5-HT	: 5-hidroksitriptamin

1 GİRİŞ

1.1 Araştırma Konusunun Tanımı

Kanser, genellikle belirli genlerdeki genetik anormallikler ve epigenetik değişikliklerin birikmesi nedeniyle hücrelerin kontrolsüz bölünme ve büyüme yeteneği kazandığı karmaşık bir hastalık durumudur. Dünya çapında büyük bir zorluk ve tüm ülkelerde erken ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir (Yang vd., 2023).

Ovaryum (yumurtalık) kanseri en yüksek ölüm oranına sahip en yaygın jinekolojik kanserlerden biridir. Ovaryum kanserinin 2022 yılı istatistiklerine göre dünya genelinde 324 603 yeni vaka görülmüş ve 206 956'lık ölüm sayısı bildirilmişken, ülkemizde 2022 yılı istatistiklerinde, 3855 yeni kanser vakası görülmüş ve 2848 ölüm vakası ile, meme kanseri hariç üreme organları kanserleri içinde rahim içi kanserlerinden sonra, ikinci en sık görülen kanserler arasında yer almaktadır. Kadın üreme sisteminde jinekolojik kanserlerin görülme sıklığı, kötü yaşam tarzı, beslenme alışkanlıkları ve genetik faktörler nedeniyle artmakta ve yeni vaka ve ölüm sayısının önümüzdeki yirmi yılda daha da artması beklenmektedir (http-1; Zhu vd., 2024).

Agomelatin ($C_{15}H_{17}NO_2$, N-[2-(7-metoksi-1-naftil) etil] asetamid)), 2000'li yılların ortalarında sentezlenmiş, melatonin hormonunun sentetik analogudur. Agomelatin bir melatoninerjik reseptör (MT_1 ve MT_2) agonisti, melatoninden daha fazla afinite gösteren ve 5-HT_{2C} reseptör antagonisti olarak geliştirilmiş bir melatonin analogu, antidepresan ilaçtır (Guardiola-Lemaitre vd., 2014; Uzbay, 2012).

Sisplatin (cis-diamindikloroplatin (II), CDDP), bir cis konfigürasyonunda iki klorür ve iki amonyak koordineli, ağır bir metal olan platin (Pt) içeren güçlü bir antikanser ajandır. Sisplatinin antikanser aktivitesi, DNA çift zincirinde çapraz bağlanma yapmasından ileri gelmektedir (Dasari vd., 2014; Ghosh, 2019).

MikroRNA (miRNA), fonksiyon olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan, yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda, tek iplikçikli, küçük, kodlamayan RNA molekül çeşididir (He vd., 2020). İnsan miR-340, 5q35.3 kromozomu üzerinde konakçı gen RNF130'un intronik bölgesinde yer alan intragenik bir miRNA'dır. miR-340, memeliler arasında yüksek oranda korunmuştur ve ekspresyon modeli konakçı genininkine benzerdir (Huang vd., 2021). miR-340-5p, epitel-mezenkimal geçişi inhibe ederek tümör baskılayıcı etki gösterdiği kanıtlanmış, yeni keşfedilen bir miRNA'dır

(Zhang vd., 2020). miR-340-5p, inflamasyon, tümör oluşumu ve oksidatif stres gibi çeşitli patolojik süreçlerde yer almaktadır (Cheng vd., 2020; Li vd., 2019; Qian vd., 2020).

1.2 Önemi

Ovaryum kanserinin jinekolojik kanserler arasında en yüksek ölüm oranına sahip olmasının nedenlerinden birisi, hastalığın teşhisinin ancak ilerlemiş safhalarda teşhis edilebilmesinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, mevcut kemoterapik yöntemler hastaların çoğunda yetersiz kaldığından etkili tedavi yapılabilmesi için erken tanı ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Erken tanıda fayda sağlayabilmek için yeni hedef molekül olarak miRNA'lar ve yeni tedavi stratejileri için de yeni anti-kanser etkili ilaç ve kombine ilaçlar ön plana çıkmaktadır.

miRNA'ların tedavi amacıyla kullanılabilmesi için gen ifadelerinin farklı düzeylerde nasıl düzenlendiği ve bunu işlevsel olarak nasıl gerçekleştirdiğinin tam olarak bilinmesi önemlidir.

1.3 Amacı

Bu tez kapsamında, jinekolojik kanserler arasında en yüksek ölüm oranına sahip olan ovaryum kanserinde, agomelatinin SKOV-3 ovaryum kanseri hücreleri üzerine anti-kanser etkilerinin varlığı ve agomelatin ile sisplatinin ayrı ayrı ve/veya kombine olarak uygulanmasının sisplatin kaynaklı hücre sitotoksitesisi üzerine etkilerinin incelenmesi, sisplatinin tek kullanımına kıyasla daha etkili tedavinin önerilebilmesine ilişkin sonuçlara ulaşmak ve kanser patogenezinde etkili olan miRNA'lardan miR-340'ın agomelatin ve/veya sisplatin ile uyarılan SKOV-3 hücrelerindeki hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, hücre göçü ve apoptozdaki etkilerinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser Biyolojisi

Kanser, genellikle belirli genlerdeki genetik anormallikler ve epigenetik değişikliklerin birikmesi nedeniyle hücrelerin kontrolsüz bölünme ve büyüme yeteneği kazandığı karmaşık bir hastalık durumudur. Başlangıçta, normal hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalma, hücre ölümüne direnme ve anjiyogenezi başlatma yeteneği kazanarak tümör olarak bilinen doku kütlelerine dönüşür. Daha sonra, yayılma, istila etme ve ikincil bölgelerde hayatta kalma yeteneğiyle çoğu kanser hastalarında birincil ölüm nedeni olan metastaza yol açar (Yang vd., 2023). Tüm kanser vakalarında yalnızca % 5-10'u genetik kusurların etkisine dayanırken, % 90-95'i ise çevre ve yaşam tarzına (sigara, stres, çevre kirliliği, radyasyon, obezite, enfeksiyon vb.) dayanmaktadır (Anand vd., 2008). Dış faktörlerin kansere önemli derecede katkısı bulunmasına rağmen, DNA onarımında yer alan genlerin incelenmesi, proto-onkogenlerdeki mutasyonlar, tümör baskılayıcı genlerin ifadesindeki değişiklikler gibi genetik yapıyı anlamak oldukça karmaşıktır (Chavan vd., 2024).

Hücre döngüsü normalde sıkı bir şekilde kontrol edilirken, kanser hücrelerinde bu döngü bozulmakta ve kanser hücreleri hızlı ve kontrolsüz bir şekilde bölünmektedir. Hücre bölünmesinde normal olarak görev yapan p53 tümör süppresif proteini, bölünme sırasında hasarlı DNA moleküllerini tanıyarak, hücrelerin G1 fazından S fazına geçişini durdurmakta ve DNA hasarlı bölgenin tamirini sağlamaktadır. DNA hasarı tamir edilemez ise, hücreyi apoptoza yönlendirmektedir (Chee vd., 2013). Tümör hücrelerinde ise, mutant p53'ler normal fonksiyonlarını kaybederek, kanser gelişiminin başlangıcında rol oynayan onkogen olarak görev yapmaktadır (Muller ve Vousden, 2014). Tümörleşen hücrelerdeki mutant p53 sentezini normal hücrelerdeki p53 sentezinden daha fazla gerçekleştirerek büyüme ve bölünmeyi artıran faktörlerinin miktarında artış meydana gelir. Bu nedenle de, kanser hücresi daha hızlı ve kontrolsüz bir şekilde bölünür (Addadi vd., 2010). Hücre döngüsünün her aşaması siklinler olarak bilinen bir dizi protein ailesi tarafından düzenlenmektedir. Siklin bağımlı kinazlar (CDKs), serin/treonin kinaz ailesinden ve hücre döngüsünün ilerleyebilmesinde önemli rol oynarlar. CDK aktivitesinin artması hem hücre döngüsünü hızlandırması hem de çoğu onkogenin aktive edilmesi ve tümör baskılayıcıları inhibe etmesi gibi özelliklere

sahip olduğu için birçok kanser patogeneğinde önemlidir. CDK inhibitörleri kanser tedavisinde büyük önem taşımaktadır (Shapiro, 2006).

Kanserin gelişme süreci mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesiyle oluşur. Bu nedenle kanserde ilk etkilenen mekanizma çoğunlukla hücre içindeki sinyal iletim yolları olmakta ve farklı sinyal yollarının düzensizliği sonucu da kanser meydana gelmektedir. Hücrede sinyal iletiminde önemli olan protein kinazlar uygun sinyal aldığında diğer proteinlerdeki serin, treonin, tirozin ve histidin amino asitlerine fosforilleyerek aktive ederken, bir takım düzenleyici moleküllerle de inhibe olurlar (He vd., 2021; Manning vd., 2002). Kanser türlerinde epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörleri (VEGFR), fibroblast büyüme faktörü reseptörleri (FGFR), trombosit türevli büyüme faktörleri (PDGFR), insülin benzeri büyüme faktör reseptörleri (IGFR) gibi reseptör tirozin kinazlar (RTK'lar) aşırı ekspres halde oldukları için, genler üzerindeki mutasyonlar ligand bağlanmasa da aktivasyona sebep olmaktadır (Du vd. 2018; Lemmon vd., 2010). MiRNA'lar da RTK'ların ifadesini doğrudan düzenleyebilir ve hem tümör baskılayıcı hem de onkogen olarak işlev görebilirler (Donzelli vd., 2016). RTK'lar tarafından aktive edilen yollar mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK sinyal yolu olarak da bilinir)), Janus kinaz/sinyal transdüktörü ve transkripsiyon aktivatörü (JAK/STAT) ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/AKT/mTOR sinyal yollarıdır (Bahar vd., 2023; Peng vd., 2022; Xin vd., 2020). RTK aktivasyonu reseptörün kendisini fosforillemesiyle başlar ve fosforlanan bölgelere adaptör proteinleri bağlanarak uyarının hücre içine iletimi sağlanmaktadır. Kanserde sürekli ve kontrolsüz olarak RTK aktivitesi mevcuttur (Blume-Jensen ve Hunter, 2001) (Şekil 2.1).

MAPK sinyal yolağı hücre çoğalması, hücre döngüsünün düzenlenmesi, migrasyon, anjiyogenez gibi çeşitli hücresel işlevleri düzenleyen çoklu kinaz inhibitörleri tarafından yönetilen önemli bir sinyal yoludur. MAP kinazlar, ekstrasellüler sinyal düzenleyen kinaz (ERK), Jun amino-terminal kinaz (JNK), stresle aktive olan protein kinazlar (p38/SAPK'lar) olmak üzere üç kinaz ailesinden oluşmaktadır. MAP kinazda sinyal iletimi G-protein aktivasyonu (Ras) ile başlar ve MAP kinaz kinaz kinaz = Raf'ın (MAPKKK) aktivasyonunun ardından MAP kinaz kinaz = MEK (MAPKK) ve MAP kinaz= Erk (MAPK) aktive olur. Tümör hücrelerinde bu yolak çoğunlukla düzensizdir. Erk hücre çoğalması ve sağ kalımda, JNK ve p38 MAPK yolları hücresel strese yanıt ve

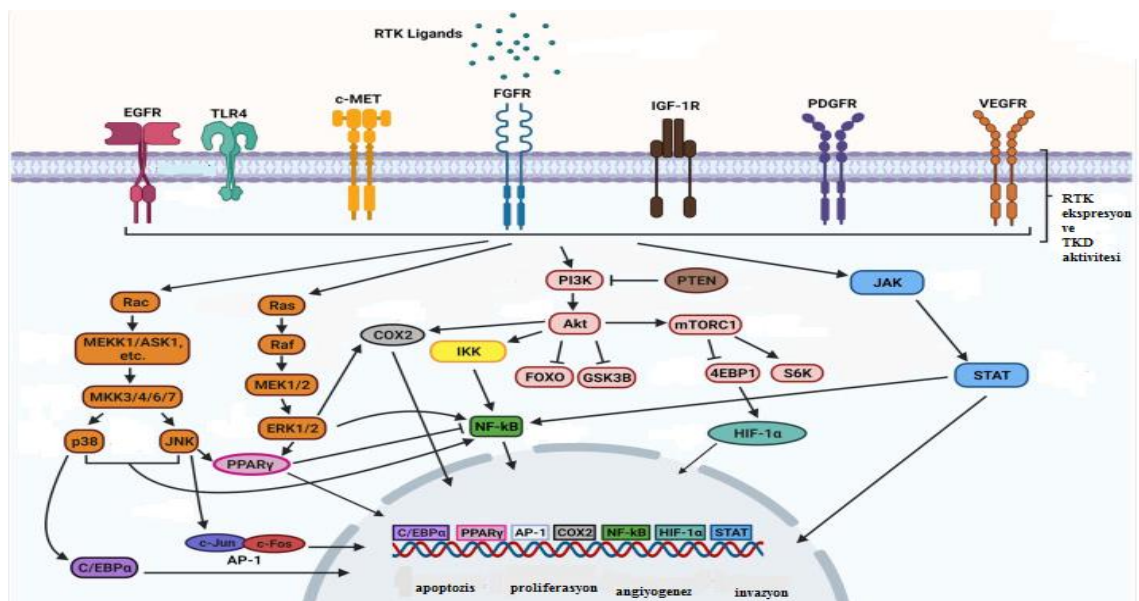
apoptozu düzenlemede, RAS/RAF/MAPK yolu ise hücre çoğalması ve farklılaşmasında önemli rollere sahiptir (Bahar vd., 2023; Doğan ve Güç, 2004).

PI3K/AKT/mTOR kanserde en sık bozulan sinyal yollarından biridir ve kanserde hücre hareketliliği, hayatta kalması, büyümesi ve metabolizması için çok önemlidir (Hoxhaj ve Manning, 2020). RAS proteinleri ve RTK ile aktive olan fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfat kinaz (PI3K), PIP2'yi PIP3'e dönüştürür. Daha sonra, PIP3 de AKT'yi fosforilleyerek aktif hale getirir. Aktif hale geçen AKT mTOR'u (rapamisin'in memeli hedefi) aktive etmektedir (Alizadeh vd., 2014). PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağındaki değişiklikler hücre çoğalması, otofaji, apoptoz, anjiyogenez, epitel mezenkimal geçiş (EMT), ilaç direncinde ve kanserin gelişmesinde birçok role sahiptir (Peng vd., 2022).

JAK/STAT sinyal yolu hücre çoğalması, farklılaşması, hücre göçü, apoptoz, bağışıklık düzenlenmesi gibi birçok önemli süreçte yer alır. Sitokin reseptörünün liganda bağlanmasıyla konformasyonel değişikliğe uğrayan reseptöre JAK molekülü bağlanarak fosforilasyona neden olur. Daha sonra STAT molekülleri de fosforile edilip aktive edildikten sonra çekirdeğe taşınır ve hedef genlerin ekspresyonu gerçekleşir. JAK/STAT sinyal yolu hem MAPK hem de PI3K/AKT sinyal yollarıyla etkileşim halindedirler ve kanser gelişim sürecinde önemli rol oynarlar (Liu vd., 2023) (Şekil 2.1).

Şekil 2.1

Reseptör Tirozin Kinaz Sinyal Yolları

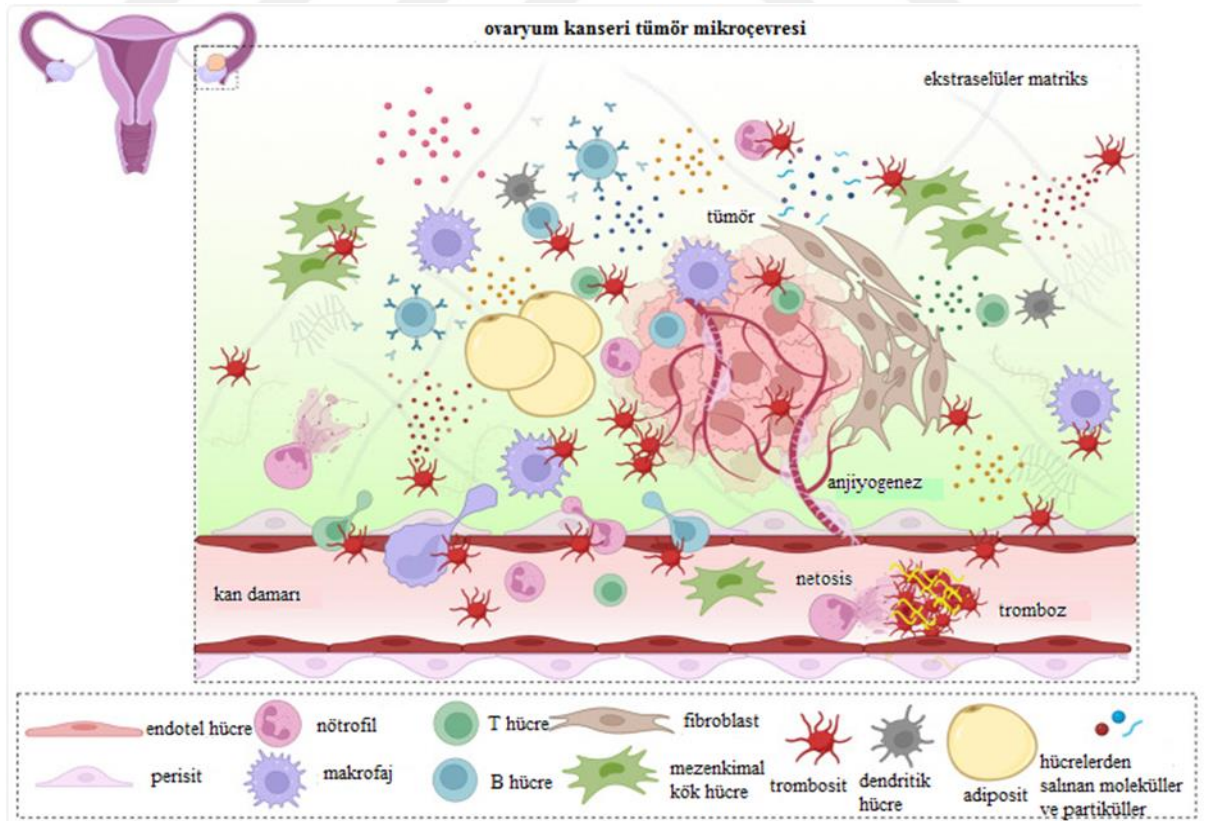


Kaynak: Dev vd., 2021

Kanser hücreleri sürekli büyüme, invazyon ve metastaz için bağımlı oldukları karmaşık doku ortamlarında gelişir. Tümörün büyümesinde gerekli besinleri taşımak ve kanser hücrelerinin metastaz yapabilmesi için yeni kan damarlarının gelişiminde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörlerinin uyarılmasıyla oluşur. Kanser hücreleri ve tümör mikroçevresi (TME) arasında sürekli, dinamik ve karşılıklı etkileşimler mevcuttur. TME fibroblast, endotel hücreleri, nöronlar, adipositler, adaptif ve doğal immün hücreleri de dahil olmak üzere tümördeki tüm kanserli olmayan konakçı hücrelerin yanı sıra hücre dışı matriks (ECM), kemokinler, sitokinler, büyüme faktörleri ve hücre dışı veziküller gibi çözünür ürünler de dahil olmak üzere hücre dışı bileşenlerini de içerir. Kanser proliferatif sinyalizasyonun sürdürülebilmesi, hücre ölümüne direnç gösterilmesi, anjiyogenezin tetiklenmesi, invazyon ve metastazın aktive edilmesi, tümörü teşvik eden enflamasyonun tetiklenmesi ve immün yıkımdan kaçınılması gibi ayırt edici özelliklerinin kazanılması ve sürdürülebilmesi için çeşitli derecelerde tümör mikroçevresine bağlıdır (Xiao ve Yu, 2021) (Şekil 2.2).

Şekil 2.2

Ovaryum Kanseri Tümör Mikroçevresi



Kaynak: Oncul vd., 2023

EMT, epitelyal hücrelerin mezenkimal duruma dönüştüğü hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerde yer alan geri dönüşümlü bir süreçtir. Bu süreç kanser ilerlemesi, yara iyileşmesi ve organ gelişimi gibi çeşitli biyolojik durumlarda önemlidir. Tümör metastazının başlatılmasında rol oynayan ana mekanizma EMT, hücre hareketliliği ve invazyonuna yol açan epitelyal belirteçlerin kaybı ve mezenkimal hücrelerin kazanılmasıyla karakterize edilir. Mezenkimal fenotip ile ilişkili N-kadherin ve vimentin ekspresyonunda artışla birlikte, E-kadherin (CDH1) ekspresyonu kaybı (artmış migrasyon, ECM'in parçalayıcı proteazların salgılanması ve yeniden şekillenmesi vb.) birçok kanserde klinik olarak kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Jinekolojik kanserlerde EMT, tümör ilerlemesi, metastaz ve kemoterapi direncine katkıda bulunur (Leung vd., 2022; Zhang ve Weinberg, 2018).

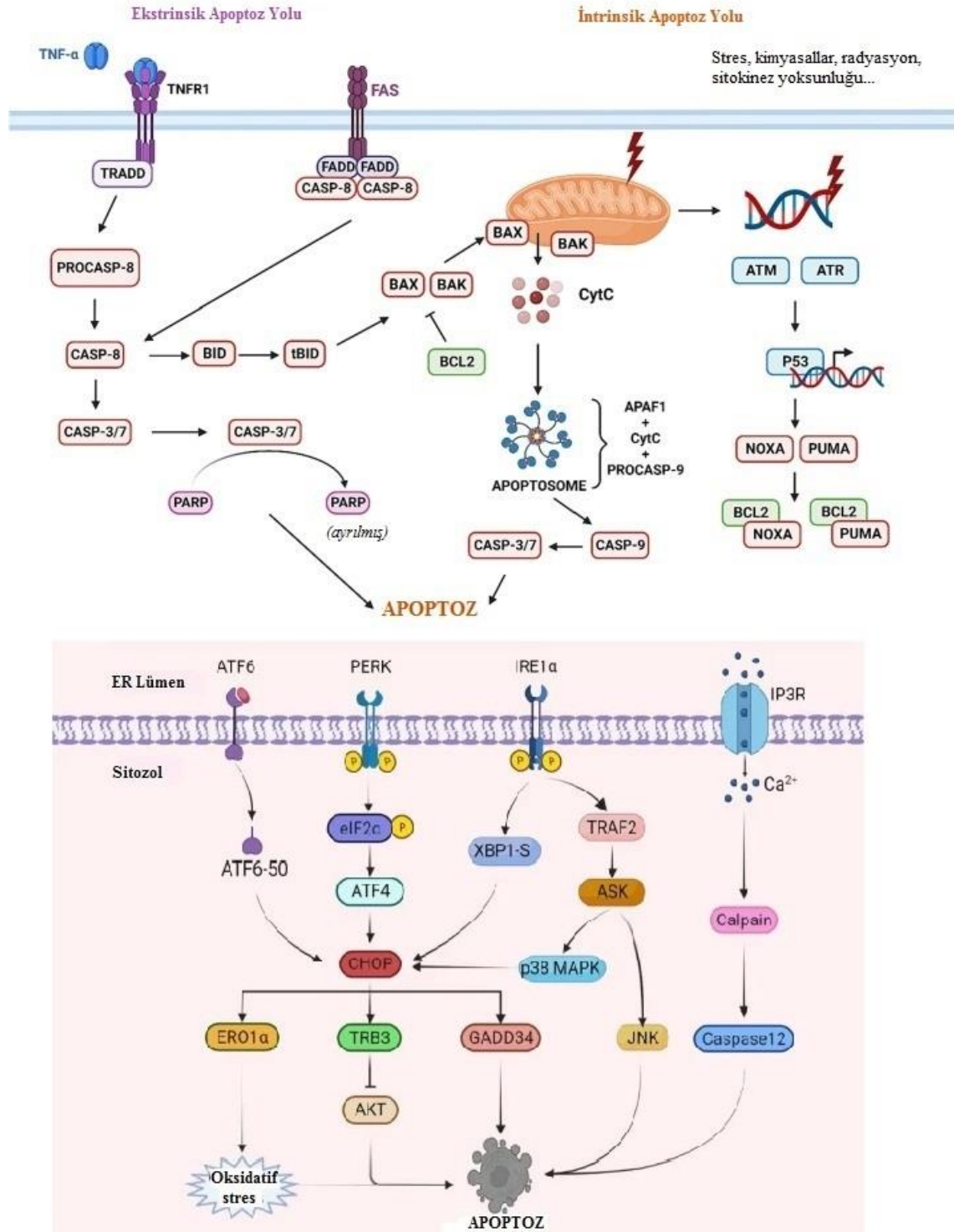
Kanser gelişimi ve ilerlemesi sırasında farklı apoptotik bileşenlerin düzensizliği mevcuttur. Apoptoz kanserde sıklıkla düzensizleşen farklı sinyal yollarının aktivasyonuna dayandığı için kanser gelişiminde bir veya birden fazla apoptotik bileşeni araştırmak gerekir. Apoptotik yollardaki kusurlar ilaç direncine de neden olabilir (Pistritto vd., 2016). Sitotoksik ilaçların kanser hücrelerini apoptoz yoluyla öldürdüğü uzun yıllardır bilinmektedir. Kemoterapi ilaçları kanser hücrelerinde apoptozu başlatır ama kaspaz aktivitesinin inhibitörleri veya kaspaz sinyal yollarındaki değişiklikler apoptozu önleyebilir veya ilaç direncine sebep olabilir (Bhat vd., 2023).

Apoptozun mekanizması karmaşık ve de birçok sinyal yolunu içermektedir. Bir hücrede apoptoz, kaspaz aracılı dışsal (ekstrinsik/ölüm reseptörü yolu), içsel (intrinsik/mitokondriyal yol) ve endoplazmik retikulum (ER) üzerinden bir yol ile genelde üç ana yol ile tetiklenebilmektedir. Endoplazmik retikulum verimli bir şekilde çalışmadığında, katlanmamış ya da yanlış katlanmış protein birikmesi sonucunda endoplazmik retikulum stresi oluşur. ER reseptörleri, bu stresi algılar ve ER işlevini geri kazandırmak için katlanmamış protein yanıtını (UPR) başlatır. Stres uzar ise apoptotik hücre ölümü gerçekleşir (Gielecińska vd., 2023; Mohd vd., 2024) (Şekil 2.3). Apoptotik yolların aktivasyonu sonucunda hücrede morfolojik (sitoplazmik hücre büzülmesi, plazma membranının tomurcuklanması, kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması) ve biyokimyasal (kaspazların aktivasyonu) gibi hücresel değişikliklere uğrar. Genellikle pro-apoptotik (p53) ve anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL vb.) protein düzenleyiciler

arasındaki denge bir hücrenin apoptoza uğrayıp uğramadığını belirlemek için kritik bir noktadır (Pistritto vd., 2016).

Şekil 2.3

Apoptoz Yolları



Kaynak: Gielecińska vd., 2023; Zhang vd., 2022.

Ekstrinsik yol plazma membranındaki ölüm reseptörleri (Fas (CD95), tümör nekroz faktörü reseptörü-1 (TNFR1) gibi) tarafından aktive edilerek, kaspaz-8'in aktive edilmesine yol açar. Hücre dışı sinyaller çevreden, komşu hücrelerden ve bağışıklık sisteminden gelebilir. Fas ligandı (FASL), tümör nekroz faktörü (TNF) veya TNF ile ilişkili apoptoz başlatıcı ligand (TRAIL) gibi ölüm ligandları, ilgili spesifik hücre yüzeyi ölüm reseptörleri olan Fas reseptörü (FasR), TNF reseptörü 1 ve 2 (TNFR1/2) ve TRAIL reseptörleri DR4 ve DR5 tarafından tanınır. Bu ölüm reseptörlerine ilgili ligandların bağlanmasıyla adaptör molekül FAS-ölüm yoluyla ilişkili (FADD) ve TNFRSF1A- ölüm yoluyla ilişkili (TRADD) moleküllerine dönüşür. Ölüm indükleyici sinyal kompleksinin (DISC) de oluşmasıyla kaspaz-8 aktive edilir. İntrinstik yol, büyüme faktörü veya besin eksikliği, DNA hasarı ve ER stresi, oksidatif stres, hipoksi gibi çeşitli stres uyaranları tarafından hücre içinde indüklenebilir ve mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu (MOMP), sitokrom c salınımı, apoptozom oluşumu ve başlatıcı kaspaz-9'un aktivasyonu ile sonuçlanır. Başlatıcı kaspazlar 8 ve 9'un aktive olmasıyla her iki apoptotik yol da efektör kaspaz 3 ve 7'nin proteolitik aktivasyon adımıyla birleşir. Bu yollar, anti-apoptotik proteinlerin (Bcl-2, Bcl-XL) ekspresyonunu artırarak, pro-apoptotik (Bax, Bak) sinyalleri inhibe ederek hücrenin sağkalımını ve çoğalmasını sağlarlar (Carneiro vd., 2020; Das vd., 2021; Ketelut-Carneiro vd., 2022) (Şekil 2.3).

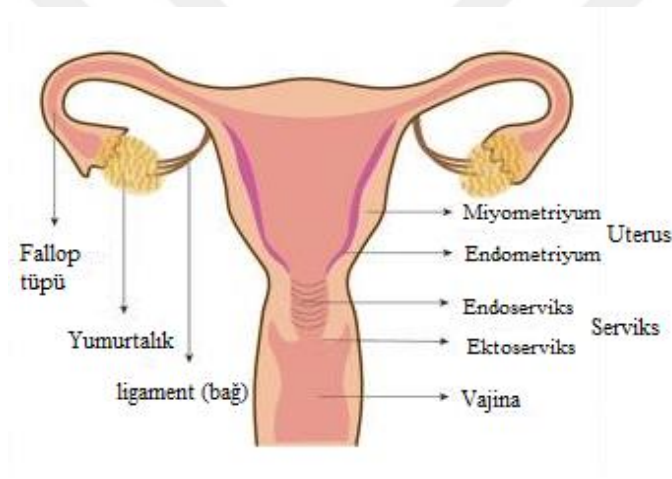
Endoplazmik retikuluma bağımlı apoptotik yolda ise, hatalı katlanmış proteinlerin birikimi ve stres koşullarında bir hücre endoplazmik retikulum stresinin üstesinden gelmek için UPR olarak adlandırılan sinyal yolağının aktivasyonuna ihtiyaç duymaktadır. UPR'nin aktivasyonu ise protein kinaz R (PKR) benzeri ER kinaz (PERK), inozitol gerektiren enzim 1 α (IRE1 α) ve aktive edilmiş transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) olarak adlandırılan üç farklı endoplazmik retikulum stres sensörü tarafından düzenlenmektedir. Bu yollar yaşam işlevlerini sağlayan yolları ya da apoptozun yollarını indüklerler (Beilankouhi vd., 2023). ER stres kaynaklı apoptoz yolunda, kalsiyum homeostazındaki bozulma ve endoplazmik retikuluma istenmeyen proteinlerin aşırı birikimi, aktive edilmiş kaspaz-12'nin endoplazmik retikuluma sızarak sitozole geçerek doğrudan kaspaz-9'u parçalar ve sonrasında kaspaz-3'ü aktive ederek kaspaz-12 aracılı apoptozu indüklemektedir (Zhang vd., 2022).

2.2 Ovaryum Kanseri

Ovaryum kanseri, yumurtalıklarda oluşur, genellikle diğer organlara yayılım gösterdikten sonra teşhis edildiğinden dolayıda en fazla yaşam kaybına sebep olan jinekolojik kanser türüdür. Vücudun her iki yanında bir tane olmak üzere 2 yumurtalık vardır ve fallop tüpleri ile yakın temas halinde, uterusu bağlı over bağlarıyla bağlanmaktadır. Yumurtalıklarda, hormon üretimi ve doğurganlık çağındaki kadınlarda menopoza kadar döllenme için her ay düzenli olarak yumurta üretilir (Beret vd., 2021; Chumduri vd., 2021; Sun vd., 2022) (Şekil 2.4).

Şekil 2.4

Kadın Üreme Sistemi Anatomisi



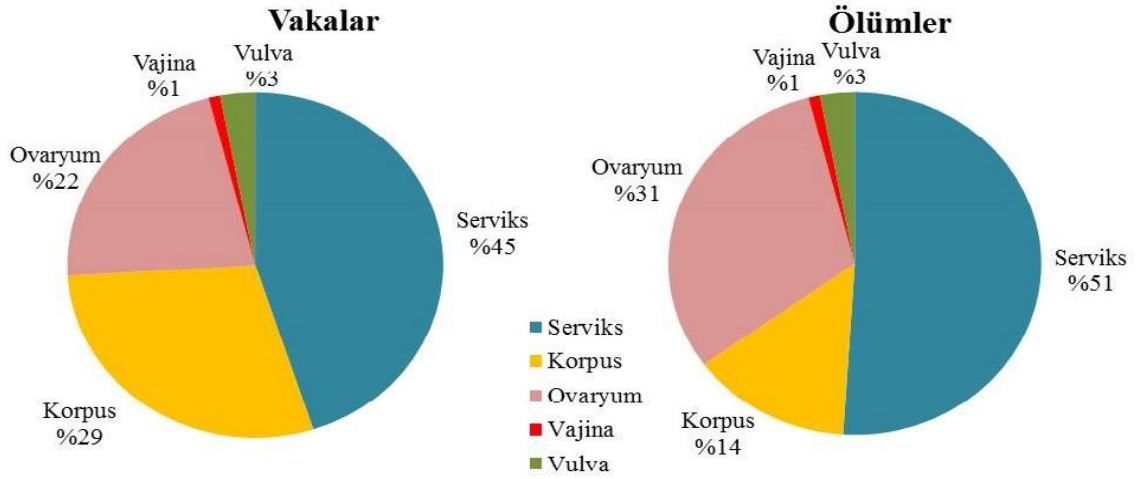
Kaynak: Chumduri vd., 2021

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'nın (IARC) önemli bir projesi olan GLOBOCAN'ın raporuna göre 2022 yılında dünya çapında 1.473.427 kadına jinekolojik kanser teşhisi konulmuş ve 680.372 kadın jinekolojik kanserden ölüm bildirilmiştir. Yeni kanser teşhisi bildirilen vakaların yaklaşık % 44.95'i serviks kanserini oluştururken, % 22'si ise ovaryum kanseri oluşturmaktadır. Yine jinekolojik kanserlerden ölenlerin de % 51.28'ini serviks kanseri oluştururken, yaklaşık % 31'ini ise ovaryum kanseri oluşturmaktadır (Şekil 2.5). Jinekolojik genital sistem kanserleri, kadınlarda en sık görülen ilk on kanserden üçünü oluşturmaktadır. Tüm kanserler arasında serviks kanseri dördüncü, korpus uteri altıncı ve ovaryum kanseri ise yedinci sırada yer almaktadır (Zhu vd., 2024). Serviks kanseri, ovaryum kanseri ve endometriyal kanser yüksek oranda görülen kanserleri temsil ederken, dünya çapında

yeni teşhis edilen kanserlerin üçte birinden fazlasını oluşturmaktadır (Park vd., 2021; Zhu vd., 2024).

Şekil 2.5

2022 Yılındaki Çeşitli Jinekolojik Kanserlerin % Tanı ve Ölüm Oranları



Kaynak: Zhu vd., 2024.

Ovaryum kanseri tedavisindeki gelişmelere rağmen hala jinekolojik kanserler arasında en ölümcül hastalık olmaya devam etmektedir. Kadınlar arasında ovaryum kanseri meme kanserine göre daha düşük bir yaygınlığa sahip olmasına rağmen üç kat daha ölümcüldür ve bu kanserin ölüm oranının 2040 yılına kadar daha da artabileceği tahmin edilmektedir. Ovaryum kanserinde ölüm oranının yüksek olmasının sebebi, tümörün asemptomik ve gizli büyümesi, gecikmiş semptom başlangıcı ve tarama eksikliğinden dolayı hastalığın ileri evrelerde teşhis edilmesinden kaynaklanmaktadır (Momenimovahed vd., 2019).

2.2.1 Ovaryum kanserinin alt tipleri

Ovaryum kanseri tek bir hastalık olarak değil, farklı histolojik alt birimlere ve farklı tanımlanabilir risk faktörlerine, köken hücrelerine, moleküler ve klinik özelliklere ve tedavilere sahip heterojen bir hastalık olarak kabul edilmektedir (Matulonis vd., 2016).

Ovaryum kanseri köken aldığı dokuda göre epitelyal, seks kord-stromal, germ hücreli ve metastik olmak üzere dört ana gruba ayrılmaktadır ve histolojik özelliklerine göre ise çoğunlukla Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ün 2014 yılında yaptığı sınıflamasına göre sınıflandırılmaktadır (Matz vd., 2017) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1

Dünya Sağlık Örgütü Over Kanseri Histolojik Sınıflaması

I-) Epiteyal Over Tümörleri

1. Seröz Adenokarsinom
2. Müsinöz Adenokarsinom
3. Endometrioid adenokarsinom
4. Berrak Hücreli Karsinom
5. Malign Brenner Tümörü
6. Mikst Karsinom
7. İndifansiye Karsinom

II-) Germ Hücreli Over Tümörleri

1. Disgerminom
2. Endodermal Sinüs (Yolk Sac) Tümörü
3. Teratom
4. Poliembriyom
5. Monodermal Teratomlar
6. Embriyonal Karsinom
7. Ovaryan Koryokarsinom
8. Mikst Germ Hücreli Tümörler

III-) Seks Kord Stromal Tümörler

1. Granülosa- Stromal Hücreli Tümörler
 - Granülosa
 - Tekoma
 - Fibroma
2. Sertoli- Leyding Hücreli Tümörler
3. Jinandroblastom
4. Sınıflanamayan

IV-) Metastatik Tümörler

- Meme
- Kolon
- Mide
- Endometriyum
- Lenfoma

Kaynak: Kurman vd.,2014; Matz vd.,2017

Ovaryum kanserinin histolojik alt birimlerinin yaklaşık % 90'ını epitelyal kanserleri oluşturmaktadır. Epitelyal over kanserlerinden, yüksek dereceli seröz karsinom (HGSC) en sık teşhis edilen ve sık görülen kanserdir. Epitelyal over kanserleri endometrioid, berrak hücreli, müsinöz karsinomlarını ve düşük dereceli seröz karsinom (LGSC) gibi alt tipleri de içerir. Ovaryum kanserinin yaklaşık % 10'unu da germ hücreli (% 5), seks kord-stromal (% 2-5) tümörler olmak üzere epitelyal olmayan diğer over hücre tiplerinden oluşmaktadır (Matulonis vd., 2016).

Ovaryum kanserleri Evre I, II, III ve IV olmak üzere dört evreden oluşmaktadır. Hastalık ise çoğu kez evre III veya IV'e ilerleyene kadar fark edilememektedir. Hastalığın ilk evresi, erken evre kanserler, Evre I yumurtalık epiteli, fallop tüp kanserleri tedavi edilebilirken, Evre II, III ve IV yumurtalık epiteli, fallop tüpleri ve primer peritoneal kanserler ise ileri evre kanserler olarak kabul edilmekte ve tedavi zorlaşmaktadır. Geç tanı ise hastalığın sağkalım oranını etkileyen en önemli faktördür. Ovaryum kanserinde evreleme hastalığın ne kadar ilerlemiş olduğu ve vücutta diğer bölgelere yayılıp yayılmadığını belirlemektedir. Evrelemede ise genellikle Uluslararası Obstetrik ve Jinekoloji Federasyonu (FIGO)'un evreleme sistemi kullanılmaktadır (Berek vd., 2021; Tavares vd., 2024) (Tablo 2.2).

Tablo 2.2*FIGO Yumurtalık Kanseri Evreleme Sınıflandırması*

Evreler	
Evre I	Tümör yumurtalıklarla veya fallop tüpleriyle sınırlıdır
IA	Tümör tek overde (kapsül sağlam) veya fallop tüpü ile sınırlı, over veya fallop tüpü yüzeyinde tümör yok; asit veya peritoneal yıkamada malign hücre yok
IB	Tümör her iki overde (kapsüller sağlam) veya fallop tüpleriyle sınırlı, over veya fallop tüpü yüzeyinde tümör yok, asit veya periton yıkamalarında kötü hücre yok
IC	Tümör tek veya iki over veya fallop tüplerinde, herhangi biri ile takip eden sınırlı
IC1	Cerrahi dökülme
IC2	Ameliyattan önce kapsül yırtılması veya yumurtalık veya fallop tüpü yüzeyinde tümör
IC3	Asit veya peritoneal yıkamadaki malign hücreler
Evre II	Tümör 1 veya her iki yumurtalığa veya fallop tüpünü, pelvik yayılımı (pelvik sınırın altında) veya periton kanserini içerir
IIA	Rahim ve/veya fallop tüpü ve/veya yumurtalıklara uzatma ve/veya implantlar
IIB	Diğer pelvik intraperitoneal uzanım
Evre III	Tümör bir veya her iki overi veya fallop tüpünü veya periton kanserini içerir, sitolojik veya histolojik olarak pelvis dışındaki peritona yayılım doğrulanmıştır ve/veya retroperitoneal lenf düğümlerine metastaz vardır.
IIIA1	Sadece pozitif retroperitoneal lenf nodları (sitolojik veya histolojik olarak kanıtlanmış)
IIIA1(i)	En büyük boyutta 10 mm'ye kadar metastaz
IIIA1(ii)	En büyük boyutu 10 mm'den büyük metastaz
IIIA2	Pozitif retroperitoneal lenf nodları ile veya onlarsız mikroskopik ektrapelvik (pelvik kenarın üstünde) periton tutulumu
IIIB	Pelvisin ötesinde en büyük boyutu 2 cm ² 'ye kadar olan makroskopik peritoneal metastaz, retroperitoneal lenf düğümlerine metastaz olsun veya olmasın
IIIC	Pelvisin ötesinde en büyük boyutu 2 cm'den fazla olan makroskopik peritoneal metastaz, retroperitoneal lenf düğümlerine metastaz olsun veya olmasın (her iki organın parankimal tutulumu olmaksızın tümörün karaciğer ve dalak kapsülüne uzanması dahil)
Evre IV	Periton metastazları hariç uzak metastaz
IVA	Pozitif sitolojili plevral efüzyon
IVB	Parankimal metastazlar ve karın dışı organlara metastazlar (kasık lenf düğümleri ve karın dışındaki lenf düğümleri dahil)

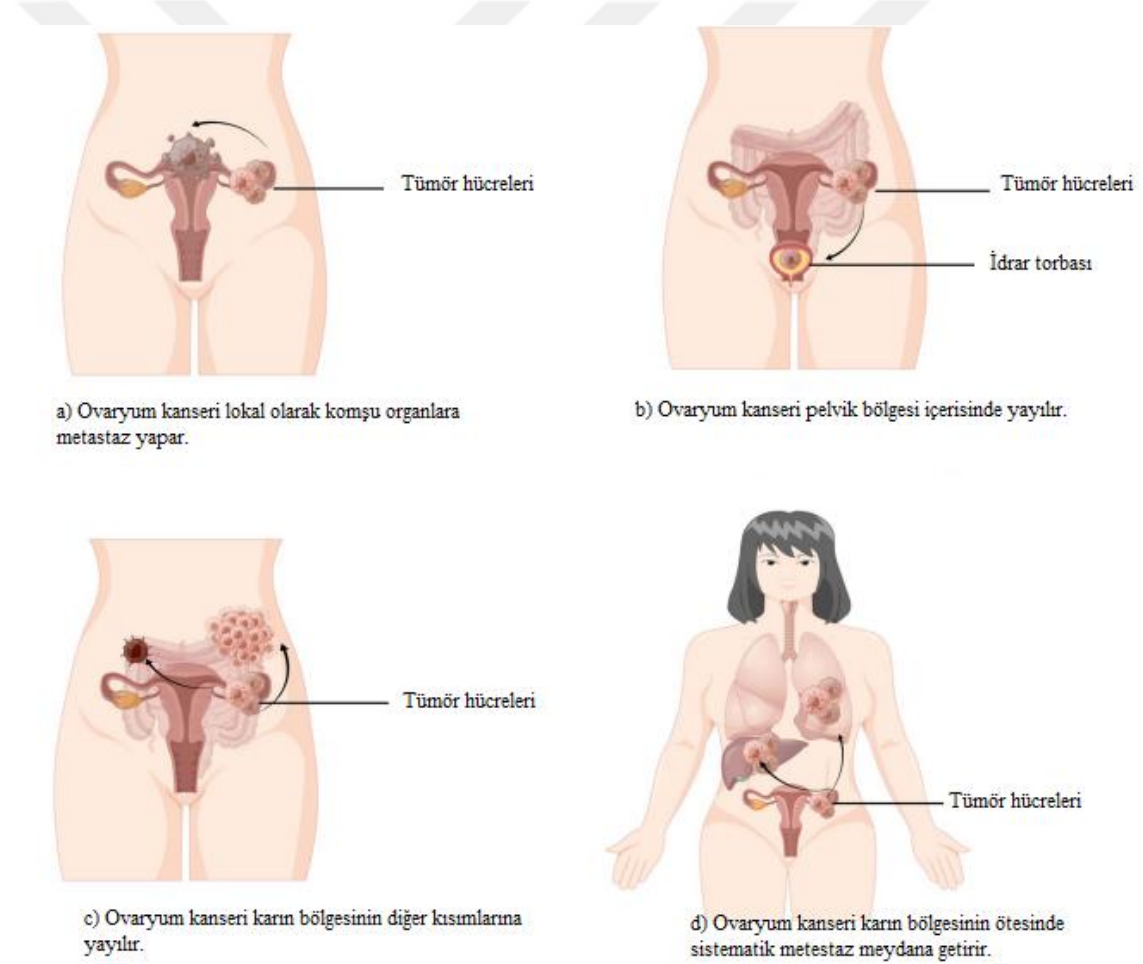
Kaynak: Berek vd., 2021

Ovaryum kanserinin patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır. En yaygın alt tip olan yüksek dereceli seröz karsinomun fallop tüpünde veya yumurtalık yüzeyinde kaynaklandığı gösterildiğinden, fallop tüpü karsinomu da yumurtalık kanserinin tanımına eklenmiştir (Kurman vd., 2010).

Ovaryum kanseri metastazının yaygın olarak başlangıç aşaması, çevredeki bağ dokular, fallop tüpleri ve uterus gibi bitişik organlara yayılmaktadır. Karaciğer ve akciğeri içeren sistemik metastaz ise daha az sıklıkla görülür ve hastalığın ilerleyen evrelerinde ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.6 a-d) (Mei vd., 2023; Tanaka vd., 2021).

Şekil 2.6

Ovaryum Kanserinin Farklı Evreleri



Kaynak: Mei vd., 2023

2.2.2 Ovaryum kanseri risk faktörleri

Ovaryum kanseri oluşumunun genetik faktörlerin yanı sıra ailede kanser öyküsü, ileri yaş, yaşam tarzı, üreme ve beslenme alışkanlıkları da etkili olabilmektedir (Matulonis vd., 2016).

2.2.2.1 Genetik

Ovaryum kanseri en önemli risk faktörü ailede yumurtalık, rahim veya meme kanseri öyküsünün olmasıdır. Ovaryum kanserlerinin beşte birinden fazlası tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Kalıtsal ovaryum tümörlerinin % 65-85'i Breast Cancer 1 (BRCA1) ve Breast Cancer 2 (BRCA2) germ hattı mutasyonlarından kaynaklanmaktadır (Momenimovahed vd., 2019).

2.2.2.2 Yaş

Ovaryum kanseri her yaşta görülmesine rağmen, genç kadınlarda, özellikle 30 yaşın altındaki kadınlarda nadiren görülmekte, risk yaşla birlikte artmaktadır. Görülme sıklığı 50 yaşından sonra önemli miktarda artmakta ve teşhis ise ortalama olarak 50 ile 70 yaş arasında konulmaktadır (Stewart vd., 2019).

2.2.2.3 Obezite ve fiziksel aktivite

Ovaryum kanseri ile ilgili yapılan bir araştırmada obezitenin, kanserde sağ kalma riskini azalttığını ve hastalıktan kaynaklanan ölüm riskini artırdığını göstermiştir (Bandera vd., 2017). Yapılan başka bir meta-analiz çalışmasında ise, obezitenin menopoza sonrası over kanseri gelişimi için risk faktörü olarak tanımlanmış ve hormon replasman tedavisi kullanmayan ya da düşük oranda kullanan menopoza sonrası kadınlarda % 13'lük bir artış olduğunu göstermiştir (Keum vd., 2015). Fiziksel aktivite ile ilgili meta-analizde ise düzenli fiziksel aktivitenin over kanseri riski üzerinde yararlı olduğu ve aktif olan kadınlarda riskin % 30-60 oranında azalma sağlayacağı ileri sürülmüştür (Cannito vd., 2015).

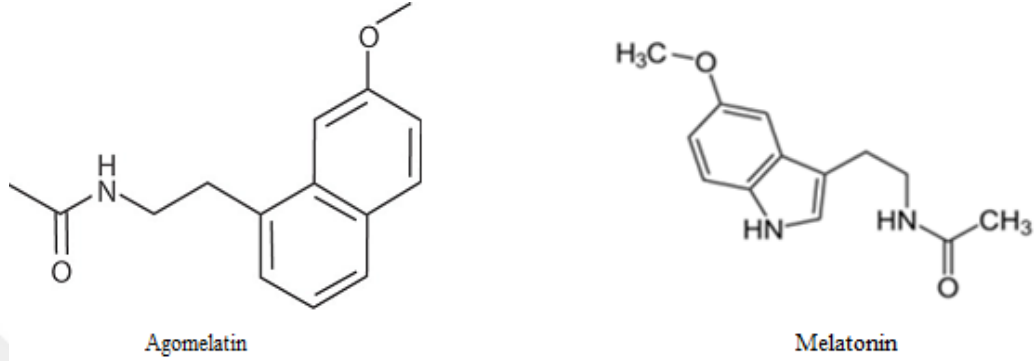
2.3 Agomelatin

Agomelatin ($C_{15}H_{17}NO_2$, N-[2-7-metoksi-1-naftil) etil] asetamid)), 2000'li yılların ortalarında daha güvenli yeni antidepresan ilaçlar geliştirmeye yönelik çalışmalar sırasında sentezlenmiş, melatonin hormonunun sentetik analogudur (Şekil 2.7). Agomelatin bir melatoninerjik reseptör (MT_1 ve MT_2) agonisti, melatoninden daha fazla

afinite gösteren ve 5-HT_{2C} reseptör antagonisti olarak geliştirilmiş bir melatonin naftalin analogu, antidepresan ilaçtır (Guardiola-Lemaitre vd., 2014; Uzbay, 2012).

Şekil 2.7

Agomelatin ve Melatoninin Kimyasal Yapısı



Kaynak: Green B, 2011; Uzbay, 2012

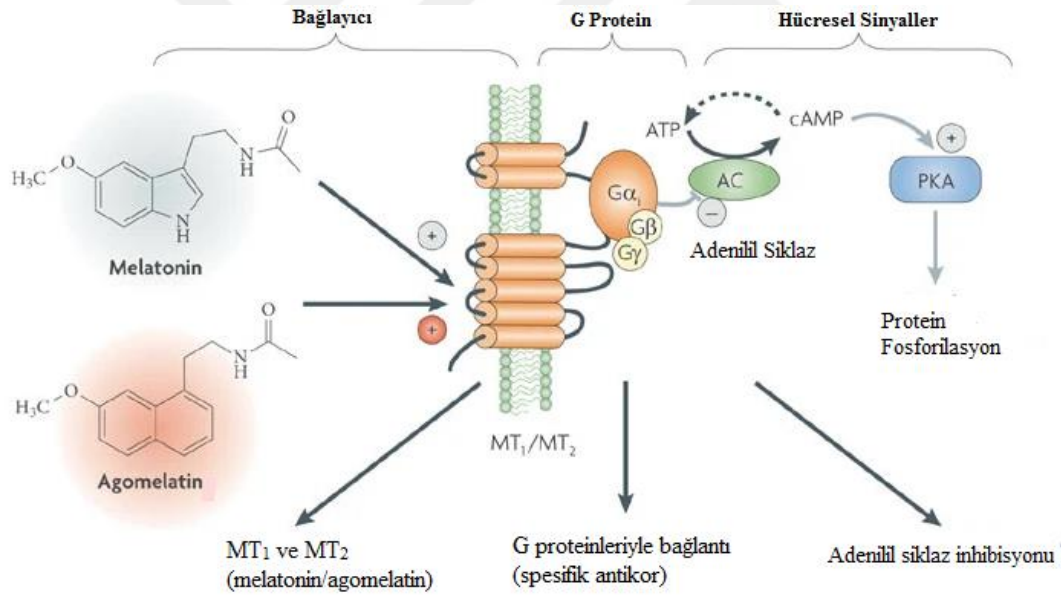
Melatoninden kimyasal yapısında indol grubu yerine bir naftalen bioizostere grubu ve NH grubu içermesi ile ayrılır. Toz şeklindeki etken madde içeren formuyla oda sıcaklığında saklanabilir (Uzbay, 2012). Monoamin taşıyıcıların ve GABA_A reseptörlerini tanımayan benzersiz bir bağlanma profiline sahiptir (Millan M.J., 2022). Kapsamlı farmakolojik değerlendirme ve klinik denemelerin ardından agomelatin (Valdoxan/Thymanax; Servier) 2009 yılında Avrupa’da majör depresyon tedavisi için pazarlama yetkisi almış monoaminerjik bir etki mekanizmasını bünyesinde barındıran ilk onaylı antidepresan ilaçtır (Bodinat vd., 2010).

Hem melatonin hem de agomelatinin antidepresan etkileri dışında da etkilerinin olduğuna dair araştırılan çalışmalar günümüzde giderek artmaktadır. Melatonin ile ilgili yapılan çalışmalarda, SKOV-3 yumurtalık kanseri kök hücresinde, melatoninin yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu, kanser hücre canlılığını azalttığını ve tümör gelişimini geriletliği vurgulanmaktadır (Akbarzadeh vd., 2017). Agomelatinin antioksidan etkisinin araştırıldığı çalışmada ise, hayvan deneylerinde agomelatinin, oksidatif stres koşulları altında salınan, hücrel redoks homeostazını düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör eritroit-2 ile ilişkili faktörün (Nrf2), oksijenaz (Nrf2-HO-1) yoluyla ekspresyonunu artırarak antioksidan özellikler gösterdiğini, bunun da antioksidan enzimlerinin üretimine ve buna bağlı olarak da ROS toksisitesinde bir azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (Chumboatong vd., 2020).

Melatoninin en işlevsel hücre yüzeyi reseptörleri, G-protein bağlı reseptör ailesine ait olan MT₁ ve MT₂' dir. MT₁ ve MT₂ aktivasyonu siklik AMP (cAMP) üretimini ve MAPK kaskadı ile PI3K'ya bağlı yolları inhibe etmektedir. Melatonin hücre zarından geçerek, kalmodulini inhibe eder ve radikal temizleme yetenekleriyle detoksifikasyonu başlatmaktadır. Kalmodulinin inhibisyonu cAMP birikiminin ve ilgili sinyal yollarının da azalmasıyla sonuçlanmaktadır. Ayrıca MT₁ ve MT₂ melatonin reseptörleri adenilil siklazı (AC) inhibe etmek için G proteinleriyle birleşir. Bu da ATP'den cAMP oluşumunun azalmasına ve dolayısıyla çeşitli hücresel substratların fosforile eden protein kinaz A'nın (PKA) aktivitesinin azalmasına yol açmaktadır. Melatonin, MT₁ ve MT₂ reseptörlerinin endojen ligandıdır ve işlevleri agomelatin tarafından da gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.8) (Akbarzadeh vd., 2017; Bodinat vd., 2010).

Şekil 2.8

Melatonerjik Reseptörlerdeki Agomelatinin Agonist Özellikleri



Kaynak: Bodinat vd., 2010

Sirkadiyen ritimler, uyku-uyanıklık döngüsü, üreme ve inflamatuvar ve bağışıklık tepkileri gibi başlıca fizyolojik olayların düzenlenmesinde rol oynayan, yaklaşık 24 saat süren döngüsel biyolojik süreçlerdir. Sirkadiyen ritimindeki değişiklikler kanser başlangıcı ve gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Kelleher vd., 2014). Farklı *in vivo* modeller, agomelatinin muhtemelen MT₁/MT₂ reseptör etkileşim yoluyla sirkadiyen ritimleri senkonize ettiğini kanıtlamıştır (Mairesse vd., 2013). Yapılan bir çalışmada, kolorektal kanser hücre hatlarında *in vitro* ve *in vivo* modellerde, agomelatinin hücre

büyümesini inhibe ettiğini, hücre döngüsünün durmasını ve kaspaz bağımlı apoptotik hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir. Agomelatinin bu etkisinin ise, sirkadiyen saati etkileyen genlerin, düzenlenmesi yoluyla gerçekleştiği öne sürülmektedir (Moreno-SanJuan vd., 2023). Ovaryum kanserinin oluşumu hormon salgılanmasıyla yakından ilişkilidir. Kadın hormonları da sirkadiyen ritim tarafından da düzenlenir. Sirkadiyen ritmin bozulması da tümör gelişim risklerinin artmasıyla ilişkilidir (Wang vd., 2020).

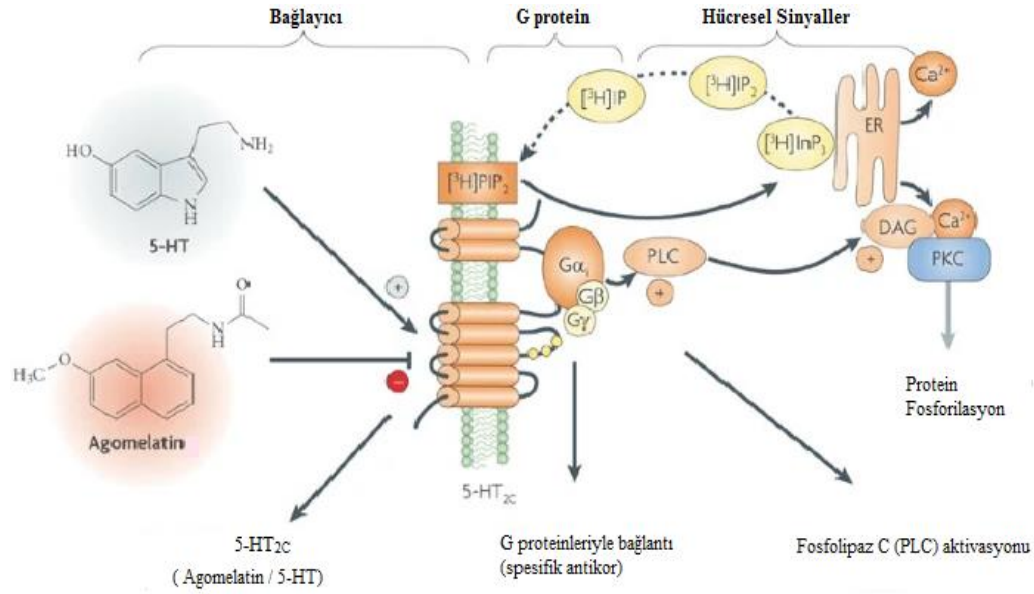
Melatoninin antikanser etkilerinin olduğu çalışmalarda, altta yatan mekanizmaların, melatonin reseptörleri MT₁ ve MT₂'nin modülasyonu, pro-survival sinyalizasyon, apoptozun düzenlenmesi, anjiyogenezin inhibisyonu, epigenetik değişimin indüksiyonu, invazyon ve metastaz olduğu vurgulanmaktadır. Ayrıca, melatonin kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanıldığında kanser hücrelerini yok etmek için adjuvan olarak önemli bir rol almaktadır. Melatonin, kemoterapötikler ile birlikte kullanıldığında da, terapötik etkileri güçlendirmektedir. Bununla birlikte, kemoterapi kaynaklı yan etkileri azaltmakta, antioksidan etkileri ve hücreler arası bağışıklık uyarıcı mekanizmaları artırmaktadır (Bhattacharya vd., 2019). Yapılan çalışmalarda melatoninin, ovaryum kanseri hücrelerinde anti-proliferatif etkiye sahip olduğu vurgulanmaktadır. Ovaryum kanseri hücrelerinde, melatonin MT₁ reseptörünün aktivasyonundan sonra etki göstermektedir. Bu aktivasyon cAMP inhibisyonunu ve MAPK'ların, protein kinaz A ve C'nin indirgenmesini kolaylaştırmaktadır. Bu inhibisyon ve indirgenme ise; metastaz, proliferasyonu ve anjiyogenezde yer alan genleri down regüle ederek düzenleyebilmektedir. Çoğunlukla MT₁ ekspresyonu, SKOV-3 ve OVCAR-3 gibi ovaryum kanser hücrelerine kıyasla normal yumurtalık IOSE 364 hücrelerinde yüksektir. Yapılan çalışmada da, ovaryum kanseri hücrelerinde, sitoplazmik membran (MT₁CM) ve membran (MT₁M) reaksiyonları kullanılarak, MT₁'in sınırlı prognostik önemi gösterilmektedir (Jablonska vd., 2014). Başka bir çalışmada ise melatonin ve agomelatinin insan over (A2780) ve prostat kanseri (PC-3) hücre hatlarında, hücre canlılığı üzerine araştırma yapılarak, agomelatin ve melatoninin güçlü sitotoksik ve antitümör özelliklerinin olduğu vurgulanmaktadır (Tekin, 2017).

5-hidroksitriptamin 2C (5-HT_{2C}) reseptörleri, fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PIP₂), diaminogliserol (DAG) ve inositol-1-4-5-trifosfat (InsP₃) üreten fosfalipaz C'yi (PLC) aktive etmek için G proteinleri üzerinden birleşmektedir. InsP₃, DAG ile birlikte protein

kinaz C'yi (PKC) aktive ederek ER'dan kalsiyum salınımını uyarmaktadır. 5-HT'nin 5-HT_{2C} reseptörlerindeki etkiler nötr antagonist agomelatin tarafından engellenmektedir (Bodinat vd., 2010). Agomelatinin 5-HT_{2C} reseptörlerini bloke etmesi strese yanıtta önemli roller üstlenmektedir (Guardiola-Lemaitre vd., 2014) (Şekil 2.9).

Şekil 2.9

5-HT_{2C} Reseptörlerinde Agomelatinin Antagonist Özellikleri



Kaynak: Bodinat vd., 2010

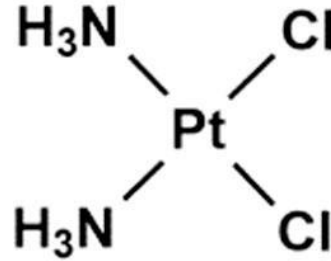
Agomelatinin, en önemli yan etkisi ise düşük oranlarda karşılaşılan ve tedavinin kesilmesinden sonra geri dönüşümsüz olan hepatotoksisitedir. Bu nedenle, karaciğer fonksiyonlarının düzenli olarak izlenmesi gerekmektedir (Štuhec M., 2013).

2.4 Sisplatin

Sisplatin (cis-diamindikloroplatin (II), CDDP), bir cis konfigürasyonunda iki klorür ve iki amonyak ile koordineli, ağır bir metal olan platin (Pt) içeren güçlü bir antineoplastik (sitotoksik, antikanser) ajandır (Şekil 2.10). Sisplatinin antikanser aktivitesi, DNA'daki pürin bazlarıyla etkileşime girerek, DNA çift sarmalında sarmal içi çapraz bağlar oluşturarak DNA sentezini engelleyen bir komplekse dönüşmesinden, yani DNA çift zincirinde çapraz bağlanma yapmasından ileri gelmektedir. Böylece sisplatin, tümör hücresinde DNA biyosentezini inhibe ederek apoptoza yol açmaktadır (Dasari vd., 2014; Ghosh, 2019).

Şekil 2.10

Sisplatin'in Kimyasal Yapısı



Kaynak: Ghosh S., 2019

Sisplatin 1845 yılında Michele Pyrone tarafından keşfedilmiştir, ancak 1960'larda sitotoksik özelliklere sahip olduğu keşfedilerek 1978'de kanser tedavisi için ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan, ilk platin bileşiğidir (Ghosh, 2019; Kelland, 2007). Günümüzde sisplatin, yumurtalık, testis, akciğer, meme ve mide kanseri dahil olmak üzere tüm kanser hastalarının yaklaşık % 50'sinin tedavisinde kullanılmaktadır (Ghosh, 2019; Liu vd., 2023; Yang vd., 2024; Zoń vd., 2023). Sisplatin kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak kullanımını kısıtlayan dezavantajlara sahiptir. En önemlileri nefrotoksisite, ototoksisite, hepatotoksisite, kardiyotoksisite ve gastrointestinal toksisite gibi ilacın neden olduğu tehlikeli yan etkiler ve tedavi sırasında kanser hücrelerinin etkisine karşı direnç geliştirmesidir (Breglio vd., 2017; Skowron vd., 2018; Wang vd., 2023).

Sisplatinin etkinliğini ve verimliliğini artırmak, toksisitesini azaltmak ve hücre direnci mekanizmalarını aşmak için kombinasyon halinde kullanımı oldukça yaygındır. Ovaryum kanserinin ileri evrelerinde platin bazlı kemoterapi kombinasyonları önerilmektedir (Berek vd., 2021). Ovaryum kanseri tedavisinde en sık kullanılan kombinasyon tedavisi sisplatinin paklitaksel ile eş zamanlı kullanımudur. Çalışmalar sisplatin ve paksitakselin kombinasyonunun kullanıldığı tedavinin ovaryum kanseri hastalarında genel sağ kalım ve hastalığın ilerlemeden sağ kalım üzerinde olumlu etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Parmar vd., 2003). Ovaryum kanserinde potansiyel antikanser mekanizmaların araştırıldığı başka bir çalışmada ise, siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü olan purvalanol A ve sisplatinin kombinasyon tedavisinin etkisi

araştırılmıştır ve reaktif oksijen türlerini indükleyerek ovaryum kanseri hücrelerinde apoptozu ve otofajiyi tetikleyebileceği gösterilmiştir (Zhang vd., 2023). Başka bir çalışmada ise, sisplatin ile tedavi edilen ovaryum kanseri hücrelerine doğal bir fenolik bileşik olan eugenolün eklenmesiyle apoptoz indüksiyon yoluyla ovaryum kanser hücreleri büyümeleri ve sağkalımı engellediği hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak gösterilmiştir (Islam vd., 2019). Sisplatin kullanımından kaynaklanan serbest radikal hasarından kaynaklanabilecek nefrotoksisitede, hayvan deneylerinde yapılan çalışmada agomelatin ve melatonin kullanılmış ve sisplatin kaynaklı oksidatif hasarın azaldığı bildirilmiştir (Yılmaz vd., 2013).

2.5 MikroRNA (miRNA)

2.5.1 Tanımı

miRNA, fonksiyon olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan, yaklaşık olarak 22 nükleotit uzunluğunda, tek iplikçikli, küçük, kodlamayan RNA molekül çeşidir (He vd., 2020). Watson-Crick baz eşleşmesiyle miRNA transkriptlerine bağlanarak gen ifadesini inhibe ederler (Badal vd., 2015).

İlk miRNA, Lee ve çalışma arkadaşları tarafından 1993 yılında Victor Ambros laboratuvarında, yuvarlak solucan olan *Caenorhabditis elegans*'ı gen içeriği bakımından tarayarak, lin-4 olarak adlandırdıkları genin herhangi bir protein kodlamamasına karşın 22 nükleotit uzunluğunda, küçük bir RNA transkribe ettiği rapor edilerek keşfedilmiştir (Lee vd., 1993). 2000 yılında ise, *C.elegans*'da 22 nükleotit uzunluğunda, let-7 olarak adlandırılan, canlının gelişim zamanlamasını düzenleyen farklı bir miRNA keşfedilmiştir (Reinhart vd., 2000).

miRNA'lar gelişim, apoptoz, çoğalma, farklılaşma, bağışıklık, stres direnci, yağ metabolizması, hayatta kalma ve hücrelerin tümör oluşumu ve metastazı dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik işlevde yer almaktadır (Zou vd., 2012).

2.5.2 miRNA Biyogenezi

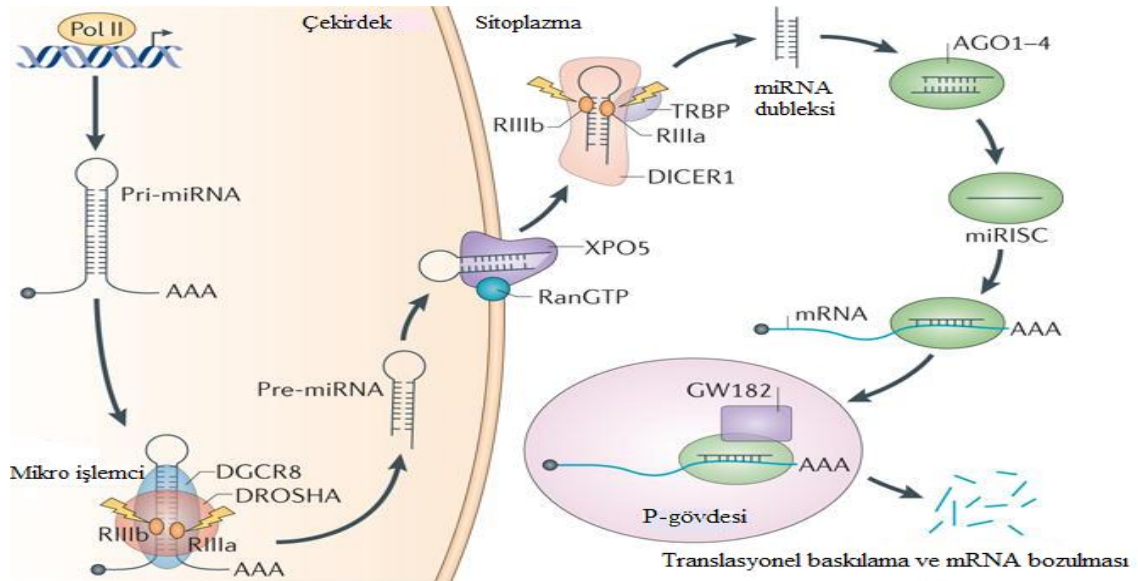
İnsanda miRNA biyogenezi, hem nükleer hem de sitoplazmik adımları olan karmaşık bir yoldur. Şekil 2.11'de miRNA biyogenezi gösterilmektedir. Çekirdekte RNA polimeraz II (Pol II) tarafından gerçekleştirilen transkripsiyon ile başlamaktadır (Lee vd., 2004). İlk aşamada, pri-miRNA (uzun miRNA) adı verilen, saç tokası yapısında ve olgun miRNA dizisini içeren uzun bir RNA oluşmaktadır. Daha sonra, saç tokası yapısı,

Drosha (RNAaz III enzimi) ve kofaktörü DiGeorge sendromu kritik bölge 8 proteini (DGCR8)' den (Pasha) oluşan mikroişlemci tarafından kesilmektedir. Bu kesimin ardından, öncü miRNA (pre-miRNA) adı verilen 60-70 nükleotid uzunluğunda RNA molekülü oluşturulur. Oluşan pre-miRNA nükleustan Exportin-5 (XPO5) ve Ran guanozin trifosfat (RanGTP) aracılığı ile çekirdekten sitoplazmaya taşınmaktadır (Bohnsack vd., 2004).

Sitoplazmada bulunan pre-miRNA ribonükleaz enzimi olan, RNAIII ailesinde yer alan Dicer ve trans aktivasyon yanıtı RNA bağlayıcı protein (TRBP) ile birleşerek, Dicer tarafından 21-24 nükleotid uzunluğunda dubleks miRNA'ya kesilmektedir. miRNA'nın olgun dizisini oluşturmak üzere kesilecek olan iplik, miRNA indüklenmiş susturma kompleksini oluşturan (RNA-induces silencing complex; RISC) argonat (AGO) proteinine yüklenir. miRNA-mRNA bağlantısı, miRNA'ların sahip olduğu 6-8 nükleotit uzunluğundaki tohum dizisi aracılığıyla gerçekleşmektedir. miRNA'nın hedeflediği mRNA'nın 3' kodlanmayan bölgesine (UTR) bağlanması ile transkripsiyon sonrası düzenleme gerçekleştirilir. Bu spesifik baz eşleşmesinin ardından, miRNA RISC'i indüklemektedir ve mRNA'nın yıkımına ya da translasyonun baskılanmasına neden olmaktadır (He vd., 2020; Menon vd., 2022; Zhong vd., 2014).

Şekil 2.11

miRNA Biyogenezisi



Kaynak: Lin vd., 2015

2.5.3 miRNA ve kanser

miRNA'ların işlevini yerine getirememesi kronik hastalıklardan kansere kadar birçok patolojik gelişmeye yol açmaktadır (Calin vd., 2002; Menon vd., 2022). miRNA'ların kanser gelişim sürecine katkıda bulunduğunun ilk kanıtı, Calin ve arkadaşlarının 2002 yılında Kronik Lenfositik Lösemili (KLL) hastalarında yapılan moleküler çalışma ile araştırılan miRNA'ların ekspresyonlarının azaldığı ya da hiç yapılmadığı bulunarak ortaya çıkmıştır (Calin vd., 2002).

miRNA'lar hücre döngüsü inhibisyonu, tümör gelişimi ve ilerlemesinde yer alan genleri hedef alarak tümör baskılayıcı genler veya onkogenler olarak işlev görebilir. Onkojenik miRNA'lar (onkomiR) tümörlerde aşırı ifade edilen, tümör baskılayan ve tümör hücre çoğalmasını, metastazı uyaran miRNA olarak tanımlanırken, tümör baskılayıcı miRNA'lar (TS miRNA) onkogenleri kodlayan mRNA'ların çevresini baskılayarak tümör oluşumunu ve kanser gelişimini engeller (Chakraborty vd., 2023; Svoronos vd., 2016).

Hem onkojenik hem de tümör baskılayıcı olarak işlev görebilen miRNA örnekleri de mevcuttur. Genel olarak, miR-155 bir onkomiR olarak kabul edilmektedir. Hayvan deneyleriyle yapılan bir çalışmada, üretilen lenfomanın miR-155'e bağımlı olduğu, tetrasiklin kaynaklı miR-155 geri çekilmesi lenfomanın tamamen gerilemesiyle sonuçlanarak bulunmuştur (Babar vd., 2012). Başka bir çalışmada ise, miR-155'in SMAD2'yi hedef alarak mide kanserini başlatan hücrelerde tümör baskılayıcı bir etki uyguladığı gösterilmiştir (Li vd., 2012). Bu tür değişkenlikler miRNA, özellikle düzenlenmiş genlerin miRNA hedef bölgelerinde bir dizi varyasyonlardan dolayı mümkün olmaktadır (Savaranos vd., 2016).

Kanserdeki miRNA ekspresyon seviyelerinin düzensizliği, tümör hücre çoğalması, apoptoz, migrasyon, EMT, invazyon/metastaz, anjiyogenez, otofaji ve malign hücre ile TME arasındaki etkileşimleri artırmadaki önemli rolleri de dahil olmak üzere kanser gelişimindeki olaylarla ilişkilendirilmektedir. miRNA'lar kanser teşhis ve prognozu için güvenilir belirteçler olarak kullanılabilir ve potansiyel terapötik hedefler olarak daha fazla ilgi görmektedir (Holjencin vd., 2022; Mei vd., 2023).

2.5.4 Ovaryum kanserinde miRNA

Ovaryum kanseri hücrelerinde, hem *in vitro* hem de *in vivo* yapılan çalışmalar miRNA'ların anormal ekspresyonunu göstermiştir. Fonksiyonel çalışmalar hücre döngüsü kontrolü, apoptoz, hücre çoğalması ve invazyon gibi temel süreçlerde yer aldıkları gösterilmiştir. miRNA'lar PI3K/Akt, Wnt/ β -katein, mTOR, MAPK ve EGFR gibi ovaryum kanseriyle ilişkili birkaç yolağın ekspresyonunu düzenleyebilir (Ghafouri-Fard vd., 2020).

Ovaryum kanserindeki miRNA ile ilgili ilk çalışmalar, Zhang ve çalışma arkadaşları tarafından, insan epitel kanserleri (ovaryum, meme ve cilt kanseri) ile yapılan çalışmada araştırılmıştır. Ovaryum kanseri doku örneklerinde miRNA genleri (miR-15a ve miR-16-1) birçok kanser türlerinde önemli rol alan B hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) genini hedefleyerek apoptotik bir yanıt oluşturduğu ve bu nedenle tümör baskılayıcı gen olarak fonksiyon gördüğü sonucuna varılmıştır (Zhang vd., 2006).

Ovaryum kanseri hücrelerinde miR-551-3p seviyelerinin araştırıldığı bir çalışmada, miR-551b-3p seviyelerinin JAK/STAT yolunu aktive ederek hücrelerin çoğalması ve invazyona yol açtığı ve tümör dokusu anjiyogenezini artırdığı gösterilmiştir (Ghafouri vd., 2020). Başka bir çalışmada ise, ovaryum kanserinde down regüle edilen miR-145 araştırılmıştır. Bu miRNA, TRIM2 ekspresyonunu baskılamaktadır. Bim, ERK tarafından fosforile edildiğinde, TRIM2 proteazomlardaki Bim'in parçalanmasını artırarak, apoptozu engellemektedir. miR-506'nın down regüle düzenlenmesi de bu mekanizma yoluyla apoptozu engellemektedir. Bununla birlikte, TRIM2, ERK1/2 ve c-FOS2'u up regüle ederek kanser hücrelerinin kötü huylu fenotipini artırmaktadır (Eitan vd., 2009).

Ovaryum kanseri OVCAR-3 ve SKOV-3 hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalarda ise miR-17-5p'nin, PTEN sinyallenmesini hedefleyerek EMT'yi etkileyen ovaryum kanseri ilerlemesindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda miR-17-5p'nin göçü artırdığı, anti-miR-17-5p inhibitör uygulamasının ise ovaryum kanseri hücrelerinin göçünü ve invazyonunu azalttığı gösterilmektedir (Fang vd., 2015).

Ovaryum kanserinde ilaç direncine karşı yapılan miRNA çalışmalarında, miR-181c'nin aşırı ifadesinin hem *in vitro* hem de *in vivo* PI3/Akt yolunu inhibe edebildiği, GRP78 ifadesini azalttığı ve paklitaksel ilaç direncini tersine çevirdiğini gösterilmektedir (Zhang vd., 2021).

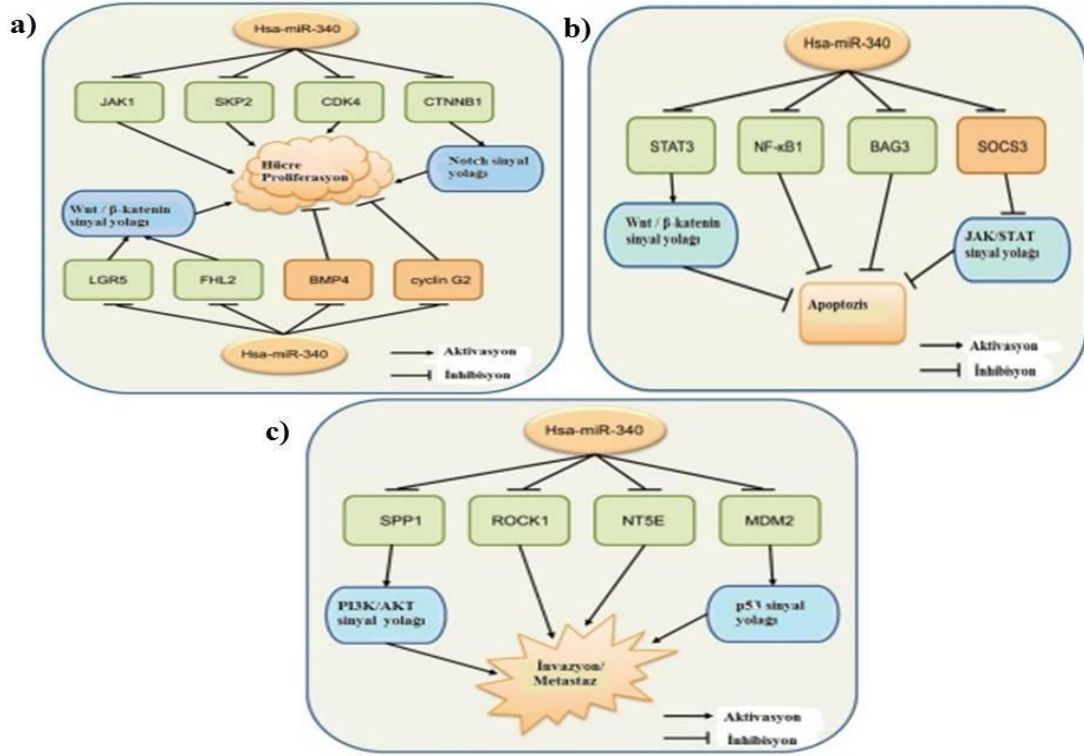
2.5.5 miRNA-340 (miR-340) ve etki mekanizması

İnsan miR-340, 5q35.3 kromozomu üzerinde konakçı gen RNF130'un intronik bölgesinde yer alan intragenik bir miRNA'dır. miR-340, memeliler arasında yüksek oranda korunmuştur ve ekspresyon modeli, konakçı genine benzerdir. İnsan tümörlerindeki rolleri hala belirsiz ve ilişkili mekanizmalar karmaşık olmasına rağmen Wnt/ β -katenin ve JAK-STAT yolları gibi sinyal yollarını içermektedir. (Huang vd., 2021). İnsanda miR-340-5p ve miR-340-3p olarak ifade edilmektedir (Cui vd., 2022; Huang vd., 2021).

miR-340, hücre çoğalması, apoptoz, göç ve invazyon gibi biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. miR-340'ın kanser hücrelerinde proliferasyonu, apoptoz ve metastaz ile ilgili genlerin düzenlenmesinde rol almasının yanı sıra; tanı, tedavi, kemo-direnç ve prognoz ile ilgili genleri hedefleyerek bir onkogen veya tümör baskılayıcı olarak hareket edebileceği belirtilmektedir (Huang vd., 2021) (Şekil 2.12). Ovaryum kanseri hücre hatlarıyla yapılan bir çalışmada, miR-340'ın up regülasyonunun hücre çoğalmasını engellediği, hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozu indüklediğini vurgulanmaktadır. miR-340'ın aşırı ekspresyonun ovaryum kanseri hücrelerinin invazyonunu ve EMT'sini de inhibe edebileceğini ve NF- κ B1'in ovaryum kanserinin doğrudan hedefi olduğunu göstermektedir. miR-340'ın NF- κ B1'in aşağı regülasyonu yoluyla bir tümör baskılayıcı işlev gördüğü belirtilmektedir (Liv vd., 2016). Ovaryum kanserinde miR-340'ın baskılanmasının moleküler mekanizması hala net olmamasına rağmen, yapılan bir çalışmada, miR-340'ın aşırı ekspresyonun SKOV-3 hücrelerinin canlılığını inhihe ettiği, apoptozu indüklediği gösterilmektedir. Bunun da miR-340'ın ovaryum kanserinde tümör baskılayıcı olarak görev yapabileceği ön görülmektedir (Qu vd., 2017).

Şekil 2.12

miR-340'ın Kansere Hücre Proliferasyon (a) Apoptoz (b) İnvazyon ve (c) Metastazın Düzenlenmesinde İlgili Genlerle İlişkisi



Kaynak: Huang vd., 2021

miR-340-5p, epitel-mezenkimal geçişi inhibe ederek tümör baskılayıcı etki gösterdiği kanıtlanmış, yeni keşfedilen, kanserle ilişkili bir miRNA'dır (Zhang vd., 2020). miR-340-5p, inflamasyon, tümör oluşumu ve oksidatif stres gibi çeşitli patolojik süreçlerde yer almaktadır (Cheng vd., 2020; Li vd., 2019; Qian vd., 2020). miR-340-5p'nin tümör ilerlemesinde ve ilaç direncinde önemli rol oynadığını öne süren deneysel çalışmalar artmaktadır. Yapılan bir çalışmada, miR-340-5p'nin, osteosarkomda sisplatin kaynaklı hücre ölümünü arttırdığı bildirilmektedir (Song vd., 2017). Başka bir çalışmada ise, miR-340'ın tümör hücre çoğalmasını inhibe ettiğini ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde apoptozu indüklediği gösterilmektedir (Fernandez vd., 2015).

Meme kanseri ile yapılan bir çalışmada miR-340-5p, Wnt/β-katenin yoluyla lösin açısından zengin tekrar içeren G proteinine bağlı reseptör 5 (LGR5)'in ekspresyonunu down regüle ederek proliferasyonu ve ilaç direncini inhibe ettiği ve meme kanseri hücrelerinin apoptozunu artırdığı gösterilmektedir (Shi vd., 2019).

3 YÖNTEM

3.1 Hücre Hattı

SKOV-3 (İnsan ovaryum adenokarsinoma) hücre hattı Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

3.2 Materyaller

3.2.1 Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler

Tablo 3.1

Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler

İsim	Şirket
25 ve 75 cm ² 'lik hücre kültür flaksları	Nest, Çin
24 ve 96 kuyulu plakalar	Sarstedt, Almanya
CIM-Plaka	Roche, San Diego, CA
E- Plaka	Roche, San Diego, CA
Agomelatin	Sigma-Aldrich, China
Sisplatin	Sigma-Aldrich, USA
miR-340-5p	Thermo Fisher Sci (Ambion) ABD
MTT boyası (Thiazol Blue Tetrazolum Bromide)	Applchem, Almanya
Fetal Sığır serumu (FBS)	Sigma-Aldrich, Almanya
Penisilin/Streptomisin	Sigma-Aldrich, Almanya
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich, Almanya
Tripsin-EDTA	Sigma-Aldrich, Almanya
DMEM	Sigma-Aldrich, Almanya
Opti-MEM	Gibco, USA
Etil alkol	Detsan, Türkiye
Akridin oranj	Sigma-Aldrich, Almanya
Etidyum bromür	Sigma-Aldrich, Almanya

3.2.2 Ekipmanlar

Tablo 3.2

Ekipmanlar

Ekipmanlar	Şirket
Steril CO ₂ inkübatörü	Hera Cell 240 Thermo Fisher Sci, Almanya
Otoklav	ALP CL32L, Japonya
Sıvı azot tankı	Taylor Wharton, Almanya
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik NoFrost, Türkiye
Enzim bağlı immunosorbent okuyucu (ELISA)	Bio Tek Elx800, ABD
xCELLIGENCE Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA)	Roche, Almanya
Flow (Akış) Sitometri	BD Accuri C6, ABD
Laminar Kabin (Steril Kabin)	Thermo Fisher Sci, Heracell 150i, ABD
Inverted mikroskop	Leica DM IL LED, Almanya
Floresan mikroskop	Leica DMI, 4000B, Almanya
Soğutmalı santrifüj	Heraeus, Almanya
Distile su cihazı	Nuve ND 12, Türkiye
Hassas terazi	Ohaus, İsviçre
Etüv	Nuve FN 500, Türkiye
Stelizatör	Nuve FN 500, Türkiye
Su banyosu	Nuve BM 302, Türkiye
Vorteks	Yellowline, Belçika
pH metre	Thermo Sci, Singapore

3.2.3 Kullanılan ticari kitler

Tablo 3.3

Kullanılan Ticari Kitler

İsim	Şirket
Lipofectamine RNAiMAX Transfeksiyon kiti	Invitrogen, ABD
FITC Aktif Kaspaz-3 Apoptoz Kiti	BD Pharmingen, ABD
FITC Anneksin V Erken Apoptoz Belirleme Kiti	BD Pharmingen, ABD

3.2.4 Kullanılan bilgisayar programları

Tablo 3.4

Kullanılan Bilgisayar Programları

İsim	Şirket
GraphPad Prism 8.0.1	GraphPad Software, ABD
RTCA Software 2.0	Roche, Almanya
CompuSyn Software	CompuSyn Inc.

3.2.5 Agomelatin bileşiğinin çözündürülmesi ve hazırlanması

Agomelatinin ana stok çözelti konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde % 99,7 saflıkta dimetilsülfoksit (DMSO) çözücüsü kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu ana stok kullanılarak, % 10 fetal bovin serum (FBS) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Serum (DMEM) besiyeri içerisinde 10 mM'lık bir ara stok hazırlanmıştır. Etkili konsantrasyonu belirleme çalışmaları için 0.05-2 mM agomelatin konsantrasyon aralığı % 10 FBS'li DMEM besiyeri kullanılarak hazırlanmıştır (Tekin, 2017).

3.2.6 Sisplatin bileşiğinin çözündürülmesi ve hazırlanması

Sisplatin ana stok çözelti konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde % 99.7 saflıkta DMSO çözücüsü kullanılarak, her deney öncesi taze olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu ana stok kullanılarak, % 10 FBS içeren DMEM besiyeri içerisinde 1mM'lık bir ara stok hazırlanmıştır. Etkili konsantrasyonları belirleme çalışmaları için 5-100 μ M sisplatin konsantrasyon aralığı % 10 FBS'li DMEM besiyeri kullanılarak hazırlanmıştır (Xu vd., 2021).

3.2.7 miR-340-5p mimik, miRNA-340-5p inhibitör, mimik ve inhibitör negatif kontrollerinin stok konsantrasyonlarının hazırlanması

miR-340-5p'ın miRNA mimiğinin 100 μ M stok solüsyonunu hazırlamak için liyofilize sentetik miR-340-5p mimiği ürün veri sayfasında önerildiği gibi kısa bir süre santrifüj edilmiştir. 5 nmol miR-340-5p mimiğini yeniden süspanse etmek üzere 50 μ L nükleaz içermeyen su eklenmiş ve karıştırılmıştır. Deneylerde nükleaz içermeyen su kullanılarak 10 μ M'lık ara stok hazırlanıp kullanılmıştır.

Kullanılan miRNA ana stok çözeltisi kullanım kolaylığı sağlamak için ependorf tüplerine, her tüpte 10 µL miRNA mimik solüsyonu olacak şekilde bölünmüştür. Hazırlanan ependorf tüpler -20 °C’de saklanmıştır.

miR-340-5p inhibitör ile mimik ve inhibitör negatif kontrollerinin stok çözeltisinin hazırlanmasında da veri sayfasında önerildiği gibi aynı prosedür uygulanmıştır.

3.2.8 Hücre kültürü

SKOV-3 insan ovaryum kanser hücreleri % 10 FBS, % 1 penisilin-streptomisin ilave edilmiş DMEM (% 1 oranında L-glutamine) besiyeri kullanılarak kültüre edilmiştir. Hücreler 37 °C’de, % 95 bağıl nem ve % 5 CO₂’li inkübatör ortamında çoğaltılarak, hücre yoğunluğu % 80’e ulaştığında her 3 günde bir tripsin/EDTA solüsyonu ile pasajlanmıştır.

3.2.9 Sitotoksosite belirleme testi

Sitotoksosite, canlı hücreler üzerindeki toksik etki oranını ifade etmek için kullanılır. Sitotoksosite testleri, toksik etkisi olduğu düşünülen bir maddenin, uygun hücre kültürü ortamında, sitotoksik potansiyelinin belirlenmesi için yapılan yöntemlerdir.

3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi hücre canlılığı, hücre proliferasyonu ve sitotoksiteyi belirlemek için kullanılan yöntemlerdendir. Bu yöntemde MTT boyasındaki tetrazolyum halkasının, canlı hücrelerdeki mitokondriyal fonksiyona sahip mitokondriyal dehidrogenaz enzimiyle formazane dönüşüp mor renk değişiminin, spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle yaşayan hücre sayısının hesaplanması yöntemidir (Angius vd., 2015).

3.2.9.1 MTT yöntemi ile Agomelatin ve Sisplatinin IC₅₀ dozlarının belirlenmesi

SKOV-3 hücreleri flakslarda % 80 yoğunluğa geldiğinde, 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonrasında besi yeri solüsyonu değiştirilerek, hücrelere 24 ve 48 saat süre boyunca agomelatin için 0.05-2 mM konsantrasyon aralığında 4 farklı doz uygulaması, sisplatin için ise 5-100 µM konsantrasyon aralığında 8 farklı doz uygulaması yapılmıştır. Analiz sürelerinin sonunda her kuyucuğa 20 µl MTT boyası eklenerek hücreler 2-3 saat arası inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından besi yeri solüsyonu ve MTT boyası kuyucuklardan tamamen çekilip her kuyucuğa formazan kristalleri çözmesi amacıyla 200 µl DMSO eklenmiştir. Plakalar,

karanlık ortamda yaklaşık olarak 10 dakika boyunca lineer çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Süre sonrasında çalkalayıcıdan alınan plakalar, spektrofotometrik mikropilaka okuyucuda 540 nm dalga boyunda, karanlık ortamda okuması yapılmıştır. Deneyler birbirinden bağımsız olacak şekilde yapılmıştır. Okuma sonucunda belirlenen absorbans değerlerinden % hücre canlılık değerleri hesaplanmıştır. Hücrelerin % 50 canlılığını gösteren değer IC₅₀ değeri olarak kabul edilmiştir. Graphpad Prism 8 yazılımı kullanılarak hesaplanmış ve grafik çizilmiştir.

Agomelatin ve sisplatin için ayrı ayrı IC₅₀ hesaplaması, agomelatinin (0.05, 0.1, 1, 2 mM) ve sisplatinin (5, 10, 20, 30, 50, 60, 75, 100 µM) dozlarına ayrı ayrı maruz bırakılan SKOV-3 hücrelerindeki, % hücre canlılık değerleri hesaplaması MTT işleminin sonunda elde edilen absorbans değerleriyle aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

% Canlılık = (Agomelatin veya sisplatin uygulanan kuyucuktaki absorbans değeri) / (Agomelatin veya sisplatin uygulanmayan kuyucuktaki absorbans değeri (kontrol hücre grubu)) x100

Elde edilen sonuçlar ile birlikte agomelatin ve/veya sisplatin dozu ve % canlılık değerleri Graphpad Prism 8 yazılımına yüklenerek, IC₅₀ değerleri program üzerinden hesaplanmıştır.

3.2.9.2 Kombinasyon dozları ve sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Agomelatin ve sisplatinin belirlenen IC₅₀ dozlarını üzerinden % 100, 75, 50, 40, 30, 20, 10 oranları aşağıdaki gibi hesaplanıp, her bir kombinasyon için % kombine değerler oluşturulmuştur.

Agomelatin veya sisplatin IC₅₀ oranı × Kombinasyon oranı /100 = % Kombinasyon

Agomelatin IC₅₀ % 75+ Sisplatin IC₅₀ % 75 = % 75 Kombine

Oluşturulan kombinasyonlar sonucunda elde edilen hücre canlılıkları MTT yöntemiyle belirlenmiştir. Bu kombine doz aralığında SKOV-3 hücreleri 24 saat boyunca inkübasyona tabi tutulduktan sonra MTT deneyi gerçekleştirilmiştir. 96 kuyulu plakalara inkübasyon süresinin bitimi ile birlikte 20 µl MTT boyası (5 mg/ml) eklenerek, 2-3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Çözünmeyen formazen kristalleri 200 µl DMSO ilavesi ile çözülürülerek plakalar karanlık ortamda yaklaşık 10 dakika lineer çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Son olarak, spektrofotometrik mikropilaka okuyucuda 540 nm dalga boyunda okuması yapılmıştır. Agomelatin ve sisplatinle ayrı ayrı ya da

kombine olarak muamele edilmeyen hücreler kontrol hücresi olarak kabul edilmiş ve hücre sitotoksitesi % olarak ifade edilmiştir.

3.2.9.3 Kombinasyon indeksinin (CI) belirlenmesi

Kombinasyon çalışmalarında, kullanılan etken maddelerinin birbiri ile olan etkileşiminin belirlenmesi dikkat edilmesi gereken önemli konulardandır. Bu amaçla, CompuSym bilgisayar yazılım programı ile agomelatin ve sisplatin kombinasyonlarının kombinasyon indeksi (CI) hesaplanmıştır. Hesaplama sonucunda ilaçların sinerjik ve antagonist etki durumları ve kombinasyon çalışmaları için bir oran belirlenmiştir.

3.2.10 Hücrelere miRNA'nın transfekte edilmesi ve transfeksiyon konsantrasyonunun belirlenmesi

miR-340-5p mimik, miR-340-5p inhibitör, miR-340-5p mimik negatif kontrol ve miR-340-5p inhibitör negatif kontrol, endojen miRNA moleküler fonksiyonlarını taklit etmek amacıyla tasarlanmış sentetik moleküllerdir.

SKOV-3 proliferasyonu üzerine en etkili miR-340-5p mimik ve miR-340-5p inhibitör doz ve zaman aralığının belirlenebilmesi RTCA ile gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı hücresel analiz sistemi (RTCA; xCELLigence, Roche) ve RTCA yazılımı sürüm 1.1, empedans (elektriksel direnç) tabanlı hücre izleme için kullanılmıştır (Zhao vd., 2022) . Bu sistem, plakaların alt kısmında bulunan altın elektrotları kullanarak elektriksel empedansta meydana gelen değişiklikleri ölçer ve bu değişiklikler hücre indeksi (CI) olarak ifade edilir. CI değeri, kuyunun yüzeyine yapışan ve yayılan hücrelerin sayısını yansıtır. CI değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$CI = (\text{belirli bir zaman noktasında ölçülen direnç} - \text{hücre bulunmadığında ölçülen direnç}) / 15\Omega$.

RTCA software programında elde edilen verilerimizi, ilaçlarımızın eklendiği süreye göre normalize ederek, normalize CI değerleri hesaplanmıştır ve CI değerleri kullanılarak hücre proliferasyonu veya migrasyon oranları % olarak hesaplanmıştır.

% Hücre Proliferasyonu veya Migrasyonu = (Normalizasyon CI değeri/ Kontrol grubu ortalama normalize CI değeri) $\times 100$

Bunun için, 16 kuyucuklu E-plateler kullanılmış ve kuyucuklara besiyeri eklenerek arka plan (back ground) ölçümü yapılmıştır. Ölçüm yapıldıktan sonra, E-plateler cihazdan

çıkartılıp, her kuyucuğa 1×10^4 hücre olacak şekilde SKOV-3 hücre ekimi yapılmış ve cihaz her 15 dakikada bir ölçüm yapacak şekilde ayarlanmıştır. Hücre ekimi yapıldıktan sonra E-plateler cihaza yerleştirilip, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler 25 nM, 30 nM ya da 50 nM konsantrasyonlarında ayrı ayrı miR-340-5p mimik, miR-340-5p inhibitör, miR-340-5p mimik negatif kontrol ve miR-340-5p inhibitör negatif kontrol grupları hazırlanmıştır. Transfeksiyon Lipofektamin RNAiMAX Transfeksiyon Kiti (Invitrogen, ABD) kullanılarak yapılmıştır. İki ayrı ependorf tüpü kullanılarak birinde Opti-MEM ortamında ve kit protokolüne uygun olarak Lipofektamin seyreltilirken diğer tüpte ise yine Opti-MEM ortamında miR-340-5p mimik, miR-340-5p inhibitör, miR-340-5p mimik negatif kontrol veya miR-340-5p inhibitör negatif kontrol seyreltilmiştir. Daha sonra, Opti-MEM ile her bir miRNA içeriği karıştırılarak, her bir karışım da Lipofektamin RNAiMAX içeriği ile tekrar karıştırılıp, 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda cihazdan çıkarılan E-plate kuyucuklarında bulunan besiyeri hücre karışımı, pipetle dikkatli şekilde çekilerek, her kuyucuğa Opti-MEM eklenmiştir. Daha sonra hazırlanan konsantrasyonlar da kuyucuklara eklenip 72 saat inkübasyona bırakılmış olup, cihazdan her 15 dakikada ölçümler alınmaya devam edilmiştir. Konsantrasyon ve zamana bağlı hücre indeksi (CI) değerlerine ait grafik RTCA software 2.0 ile çizilmiştir.

3.2.11 MiR-340-5p transfeksiyonunun verimliliğinin BLOCK-iT Alexa Fluor kırmızı floresan ile kontrolü ve görüntülenmesi

Transfeksiyon verimliliğini belirlemek amacıyla 24 kuyulu plakalar kullanılmıştır. Birinci gün her kuyuda 1×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonrasında hücreler yaklaşık % 70-80 yoğunluğa ulaştığında ayrı kuyucuklarda, BLOCK-iT Alexa Fluor kırmızı floresan konsantrasyonları (10 nM, 25 nM, 50 nM) transfekte edilmiştir. Transfeksiyon Lipofektamin RNAiMAX Transfeksiyon Kiti (Invitrogen, ABD) kullanılarak yapılmıştır. İki ayrı ependorf tüpü kullanılarak birinde Opti-MEM ortamında ve kit protokolüne uygun olarak Lipofektamin seyreltilirken diğer tüpte ise yine Opti-MEM ortamında BLOCK-iT Alexa Fluor kırmızı floresan seyreltilmiştir. Daha sonra Opti-MEM ile her bir BLOCK-iT Alexa Fluor kırmızı floresan konsantrasyon içeriği karıştırılarak her bir karışım da Lipofektamin RNAiMAX içeriği tekrar karıştırılıp, 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Her bir karışım 24 kuyulu plakalara

aktarılarak, 1-3 gün arası 37 °C inkübasyona tabi tutulmuştur. Transfeksiyon işleminden 24, 48 veya 72 saat sonra kültür ortamı PBS ile değiştirilerek miRNA transfeksiyon verimliliği hem ışık mikroskobu hem de floresan mikroskobu ile görüntülenmiştir (Zhang vd., 2014). Görüntüler “Bulgular ve Yorum” kısmına eklenmiştir. Transfeksiyon verimliliği yüzde olarak hesaplanmıştır.

Transfeksiyon verimliliği (%) = (Transfekte olan hücre sayısı/Toplam hücre sayısı)×100

3.2.12 Hücre proliferasyon oranının RTCA ile belirlenmesi

Hücre proliferasyonu oranlarının belirlenebilmesi için 16 kuyucuklu E-plate’ler kullanılmış ve öncelikle kuyucuklara besiyeri eklenerek arka plan ölçümü yapılmıştır. Ölçüm yapıldıktan sonra, E-plate’ler cihazdan çıkartılıp, her kuyucuğa 1×10^4 hücre olacak şekilde SKOV-3 hücre ekimini yapılmış sonrasında E-plate’ler cihaza yerleştirilip, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresinin sonunda, E-plate kuyucuklarına agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ayrı ayrı ya da farklı dozlarda kombine (% 40, 30, 20 ve 10) ilaç eklenmiş olup, hücreler 120 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her uygulamaya sonrası hücreler ışık mikroskobu altında gözlenmiş ve görüntüler “Bulgular ve Yorum” kısmına eklenmiştir. Cihazdan her 15 dakikada ölçümler alınmaya devam edilmiştir. CI değerlerine ait grafik RTCA software 2.0 ile çizilmiştir. Diğer RTCA tekrar sonuç grafiği EK-1a’da verilmiştir.

30 nM miR-340-5p mimik, inhibitör ya da negatif kontrol maddeleri ile E-plate’lerde transfekte edilen SKOV-3 hücrelerine 24 saat inkübasyonun sonrasında, agomelatin, sisplatin ayrı ayrı ya da kombine ilaç uygulaması yapılarak 96 saat inkübasyon süresi boyunca RTCA ile görüntülenmiştir. Kontrol grubu % 100 kabul edilerek, 24, 48 veya 72 saatlerde alınan CI değerleri kullanılarak, hücre proliferasyonu oranları % olarak hesaplanmıştır. CI değerlerine ait grafik RTCA software 2.0 ile çizilmiştir. Diğer RTCA tekrar sonuç grafiği EK-2a’da verilmiştir.

Deney öncesi Lipofektamin RNAiMAX transfeksiyon kiti kullanılarak ana stoktan hazırlanan, 30 nM’lık miR-340-5p mimik, miR-340-5p inhibitör, miR-340-5p mimik negatif kontrol ve miR-340-5p inhibitör negatif kontrol gruplarıyla transfeksiyon işlemi yapılmıştır. E-plate’ler cihaza yerleştirilip, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Transfeksiyon süresi sonrasında E-plate’ler cihazdan çıkartılarak hücrelerin besi ortamı dikkatli bir şekilde çekilip deney öncesi hazırlanan ilaç konsantrasyonları gerekli

kuyucuklara eklenip, yaklaşık 96 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her uygulama sonrası hücreler ışık mikroskobu altında gözlenmiş ve görüntüler “Bulgular ve Yorum” kısmına eklenmiştir.

3.2.13 Hücre migrasyon oranının RTCA ile belirlenmesi

RTCA ile hücre göçü çalışmalarında empedansa dayalı ölçüm yapan CIM plakaları kullanılmıştır. CIM plakaların üst bölmesine ekimi yapılan hücreler, mikro gözenekli zar boyunca alt bölmeye geçer ve mikro-elektot sensörlerine bağlanarak RTCA cihazı tarafından gerçek zamanlı olarak ölçülen empedans artışına neden olur ve cihaz hücre göçüne bağlı bir grafik oluşturur (Roshan Moniri vd., 2015).

Öncelikle steril ortamda CIM plakaların alt bölümüne % 10 FBS içeren DMEM besiyeri, üst bölümüne ise serum içermeyen DMEM besiyeri eklenerek, membranın dengelenmesi için 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda arka plan ölçümü yapılmıştır. Daha sonra, her kuyuya 2×10^4 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıp, CIM plakalar 30 dakika kabin içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonrasında, hücrelerin tutunması için plakalar RTCA cihazına aktarılarak, inkübatör ortamında 2 saat inkübe edilmiştir. Sürenin bitmesi ile, CIM plakalar steril kabine alınarak, miR-340-5p mimik, miR-340-5p inhibitör ve negatif kontrol miRNA transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. CIM plakalara agomelatin IC_{50} , sisplatin IC_{50} ya da kombine % 40 ilaç uygulamaları da yapıldıktan sonra, hücreler migrasyon ölçümü için RTCA cihazına yerleştirilerek inkübatör ortamında 72 saat bekletilmiştir. Kontrol grubuna transfeksiyon işlemi yapılmamıştır. Cihazdan her 15 dakikada bir ölçüm alınmıştır. RTCA software cihazından elde edilen kantitatif sonuçlar normalize edilerek hücre indeksinin zamana karşı grafiği alınmıştır. Diğer RTCA tekrar sonuç grafikleri EK-3a ve EK-3b’de verilmiştir.

3.2.14 Apoptoz düzeylerinin flow sitometri cihazı aracılığıyla belirlenmesi

Erken apoptoz hücre oranı FITC Anneksin-V apoptoz belirleme kiti kullanılarak yapılmıştır (Ye vd., 2022). Normal hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde membran lipidlerinden fosfoditilserin (PS) bulunmaktadır. Hücre eğer apoptoza gidecekse normalde iç yüzeye yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzeyine geçer ve hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin-V yöntemi, hücrenin dış yüzeyine geçen PS’e Anneksin-V proteini bağlanabilir ve floresan bir madde olan FITC ile işaretlenerek

apoptotik hücre görünür hale getirilerek, FITC Anneksin-V kompleksinin PS'e bağlanma oranı flow sitometresi ile ölçülebilmesi esasına dayanır. Anneksin-V, nekrotik hücre yüzeylerinde de bağlanma yapabileceği için ikinci bir boya olarak ise promidyum iyodür (PI) eklenmektedir. Bu yöntem ile canlı hücreler (FITC-PI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin (FITC+PI+) birbirinden ayırt edilmesi sağlanmaktadır.

SKOV-3 hücreleri 24 kuyulu plakalara, her bir kuyuda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda miR-340-5p mimik, miR-340-5p inhibitör, mimik veya inhibitör negatif kontrol transfeksiyonu yapılarak, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Transfeksiyon süresi sonunda, kuyucuklardaki besiyerleri alınıp deney öncesi hazırlanan agomelatin IC_{50} , sisplatin IC_{50} ve kombine % 40 ilaç uygulamaları kuyucuklardaki besiyerlerine eklenerek, ilaçların 24 ve 48 saat etkilerine bakabilmek için gerekli sürelerde inkübasyona bırakılmıştır. İlaçların 24 saat süre sonunda etkisine bakabilmek için süre sonunda, kuyucuklardaki besiyeri grupları her bir kuyucuk için hazırlanan akım sitometri tüplerine aktarılmıştır. Tüm kuyucuklar 500 μ L PBS ile 2 defa yıkama yapılarak kendi tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra her bir kuyucuğa 100-150 μ L tripsin eklenip hücreler kaldırılmıştır. Hücreler kalktıktan sonra kuyucuklara besiyeri ekleyerek, tripsin inhibe edilip kuyucuklardaki besiyerleri her bir kuyucuk için hazırlanan akım sitometri tüplerine aktarılmıştır. Tüpler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. 1 ml PBS ile yıkama yapılarak tekrar santrifüj edilerek bu işlem 2 defa uygulanmıştır. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kit içerisinde bulunan $10 \times$ derişimindeki bağlanma tamponu (binding buffer) distile su ile $1 \times$ derişimine getirilerek her bir tüpe 100 μ l eklenmiştir. Daha sonra 5 μ l FITC Anneksin-V ve 5 μ l PI boyası tüplere eklenip, karanlık ortamda 15 dakika bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda her bir tüpe 400 μ L bağlanma tamponu eklenerek, akım sitometri cihazı ile ölçüm yapılmıştır. İlacın 48 saatlik etkisini ölçmek için, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda yine aynı işlemler gerçekleştirilerek, akım sitometri cihazı ile ölçüm yapılmıştır.

3.2.15 Kaspaz-3 aktivasyon düzeylerinin belirlenmesi

Kaspaz-3 aktivasyon düzeyini belirlemek için FITC Aktif Kaspaz-3 Apoptoz kiti (BD) kullanılmıştır. Apoptozu tetikleyen intrinsek ve ekstrinsek yolak olarak iki temel

mekanizma bilinmektedir. Her iki yolak sonunda da kaspaz-3 aktive olmaktadır. Kaspaz-3'ün aktivasyonu ile de hücre parçalanmaya başlamaktadır.

SKOV-3 hücreleri 24 kuyulu plakalara her kuyuda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda miR-340-5p mimik, miR-340-5p inhibitör, mimik veya inhibitör negatif kontrolleri ile transfeksiyonu yapılarak, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Transfeksiyon süresi sonunda besiyerleri çekilerek deney öncesi hazırlanan agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve kombine % 40 ilaç konsantrasyonları hazırlanarak, hesaplanan miktarda kuyucuklara aktarıldıktan sonra hücreler 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kuyucuklardaki besiyeri grupları her bir kuyucuk için etiketlenen akım sitometri tüplerine aktarılmıştır. Tüm kuyucuklar 500-1000 µL PBS ile iki defa yıkama yapılarak, kendi tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra her kuyucuğa 100-150 µL tripsin eklenerek hücrelerin kalkması için inkübatörde bekletilmiştir. Bu süre sonunda hücre süspansiyonları akım sitometri tüplerine aktarılmıştır. Tüpler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Tüplere 1mL PBS eklenip tekrar santrifüj edilerek, bu işlem iki defa uygulanmıştır. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kit protokolüne uygun olarak her bir tüpe 500 µL Cytotfix/Cytoperm solüsyonundan buzda 20 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra her bir tüpe 500 µL BD Perm/Wash 1× solüsyonu eklenerek tekrar santrifüj yapılmış ve bu işlem iki defa tekrarlanmıştır. Tüplere 100 µl BD Perm/Wash (1×) solüsyonu ve 20 µl antikor eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda tüplere 1 ml BD Perm/Wash eklenerek santrifüj yapılmış ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Sonra her bir tüpe 500 µL BD Perm/Wash eklenerek akım sitometri cihazı ile ölçüm yapılmıştır. İlaçların 48 saatlik etkisini ölçmek için, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda yine aynı işlemler gerçekleştirilerek, akım sitometri cihazı ile ölçüm yapılmıştır.

3.2.16 Akridin oranj (AO) ve Etidyum Bromür (EB) boyama ile apoptozun belirlenmesi

Akridin oranj (AO) ve etidyum bromür (EB) boyama yöntemi ile canlı ve apoptotik hücreler arasındaki farklar nükleus ve hücre sitoplazmasında meydana gelen değişimlerle belirlenmektedir. Akridin oranj hem canlı hem de apoptotik hücreleri boyarken, etidyum bromür ise, çekirdek membran bütünlüğü bozulan hücreleri

boyamaktadır. Canlı hücreler yeşil renkli boyanırken erken apoptotik hücreler de yeşil renk ile boyanır, ancak nükleuslarında kromatin kondensasyonu ve nükleer fragmantasyonu göstermektedir. Etidyum bromür ise geç apoptotik hücrelerin turuncu renge boyanmasını sağlamaktadır (Avcı vd; 2013).

SKOV-3 hücreleri 24 kuyulu plakaların her kuyuda 4.5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda miR-340-5p mimik, miR-340-5p inhibitör ve negatif kontrolleriyle transfeksiyonu Lipofektamine RNAiMAX transfeksiyon kiti kullanılarak yapılmıştır ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Transfeksiyon süresi sonunda, kuyucuklardaki besiyerleri alınıp, deney öncesi hazırlanan agomelatin IC_{50} , sisplatin IC_{50} ve kombine % 40 ilaç uygulamaları kuyucuklara eklenerek, ilaçların 24 veya 48 saat etkilerine bakabilmek için gerekli sürelerde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonrasında apoptotik hücreleri belirleyebilmek için 1:1 oranında hazırlanan 50 µg/ml etidyum bromür (EB) ve 100 µg/ml akridin oranj (AO) boya karışımından 100 µl hücrelere eklenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hücreler iki kez PBS ile yıkama yapılarak en son PBS ortamında floresan mikroskopta FITC filtresi ile hücrelerin görüntüsü alınmıştır.

3.2.17 İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler Graphpad Prism 8.0.1 programı kullanılarak yapılmıştır. Deneysel tasarıma bağlı olarak veriler tek yönlü (one-way) veya iki yönlü (two-way) ANOVA testleri ile analiz edilmiştir. Elde edilen p- değerleri istatistiksel anlamlılık açısından değerlendirilmiştir ve 0.05'ten küçük olan p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

($p > 0.5$ anlamlı değil (ns), $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$, $****p \leq 0.0001$).

4 BULGULAR VE YORUM

Tez çalışmasında, SKOV-3 ovaryum kanser hücreleri besiyeri kullanılarak 37 °C’de, % 95 nem ve % 5 CO₂’li inkübatör ortamında çoğaltıldıktan sonra SKOV-3 ovaryum kanseri hücrelerinde agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve kombine doz belirlendikten sonra RTCA deneyi için deney ve kontrol grupları aşağıda belirtildiği gibi oluşturulmuştur.

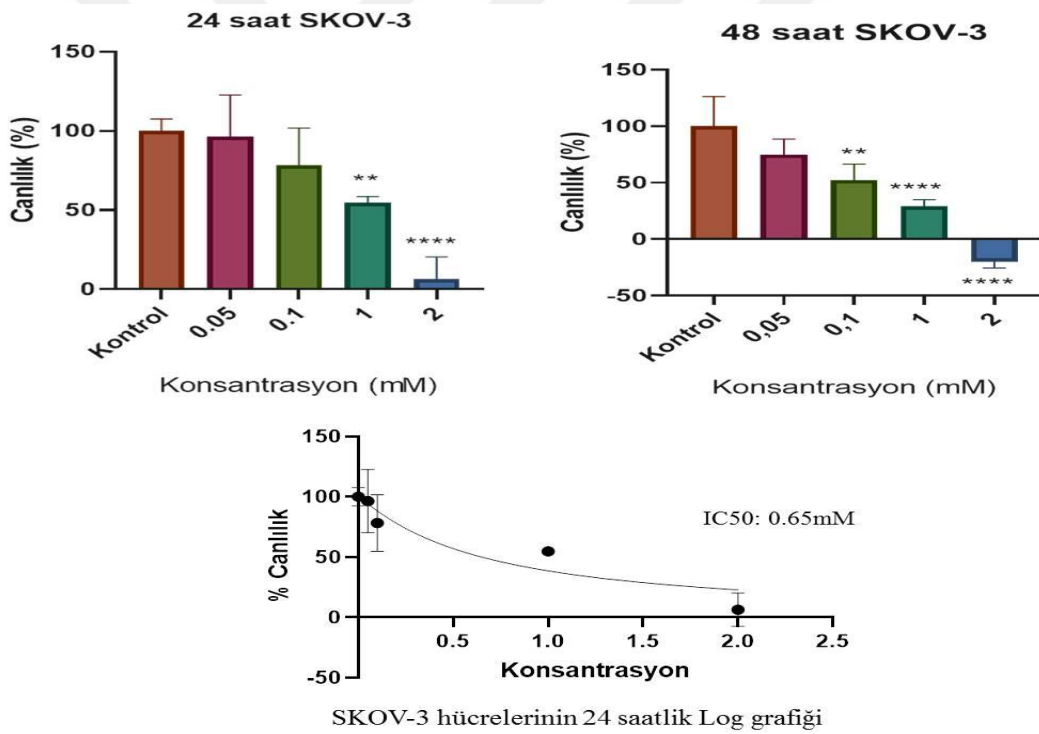
1. Deney Grubu: Kontrol (muamele edilmemiş SKOV-3 kontrol hücre grubu)
2. Deney Grubu: Agomelatin IC₅₀ uygulanmış hücreler
3. Deney Grubu: Sisplatin IC₅₀ uygulanmış hücreler
4. Deney Grubu: % 40 Agomelatin ve sisplatin kombine uygulanmış hücreler
5. Deney Grubu: miR-340-5p mimik negatif kontrol transfekte edilmiş hücreler
6. Deney Grubu: miR-340-5p mimik negatif kontrol+ Agomelatin IC₅₀ uygulanmış hücreler
7. Deney Grubu: miR-340-5p mimik negatif kontrol + Sisplatin IC₅₀ uygulanmış hücreler
8. Deney Grubu: miR-340-5p mimik negatif kontrol + % 40 kombine ilaç uygulanmış hücreler
9. Deney Grubu: miR-340-5p inhibitör negatif kontrol transfekte edilmiş hücreler
10. Deney Grubu: miR-340-5p inhibitör negatif kontrol + Agomelatin IC₅₀ uygulanmış hücreler
11. Deney Grubu: miR-340-5p inhibitör negatif kontrol + Sisplatin IC₅₀ uygulanmış hücreler
12. Deney Grubu: miR-340-5p inhibitör negatif kontrol + % 40 kombine ilaç uygulanmış hücreler
13. Deney Grubu: miR-340-5p mimik transfekte edilmiş hücreler
14. Deney Grubu: miR-340-5p mimik + Agomelatin IC₅₀ uygulanmış hücreler
15. Deney Grubu: miR-340-5p mimik + Sisplatin IC₅₀ uygulanmış hücreler
16. Deney Grubu: miR-340-5p mimik + % 40 kombine ilaç uygulanmış hücreler
17. Deney Grubu: miR-340-5p inhibitör transfekte edilmiş hücreler
18. Deney Grubu: miR-340-5p inhibitör + Agomelatin IC₅₀ uygulanmış hücreler
19. Deney Grubu: miR-340-5p inhibitör + Sisplatin IC₅₀ uygulanmış hücreler
20. Deney Grubu: miR-340-5p inhibitör + % 40 kombine ilaç uygulanmış hücreler

4.1 Agomelatin'in Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

SKOV-3 ovaryum kanser hücrelerinde agomelatin (0,05-2 mM) farklı konsantrasyonları ile 24 ya da 48 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Süre sonunda hücre ortamına, MTT boyası eklenerek yaklaşık 2-3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra oluşan formazan tuzları DMSO ile çözündürülerek, ELISA okuyucusu ile renk şiddeti 540 nm dalga boyunda okunmuştur. Hücre kontrol grubu % 100 kabul edilerek madde uygulaması yapılan hücre grupları hesaplanmıştır. Agomelatinin IC₅₀ değerleri Graphpad Prism 8 programı kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.1'de verilmiştir.

Şekil 4.1

SKOV-3 Hücrelerinin 24 ve 48 Saat Agomelatin Uygulanması Sonrasındaki % Canlılık Oranları



Sonuçlar iki bağımsız deney ve her deneyde n=3 olarak ifade edilmiştir. Analiz one-way Anova ile yapılmıştır (**p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001).

24 saatlik inkübasyon sonrası 0.05 ve 0.1 mM agomelatin uygulamasının SKOV-3 hücre canlılığı üzerine kontrol hücrelerine kıyasla istatistiksel olarak bir etki göstermediği tespit edilmiştir. Ancak, 1 mM agomelatin uygulaması sonrasında hücre canlılığı % 54.70 olarak istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir (p≤0.01).

Konsantrasyonun iki katına çıkarılması ile hücre canlılığındaki düşüşte artmıştır ($p \leq 0.0001$). SKOV-3 hücrelerinin 24 saat agomelatin ile muamelesi sonrasında IC_{50} değeri 0.65 mM olarak belirlenmiştir.

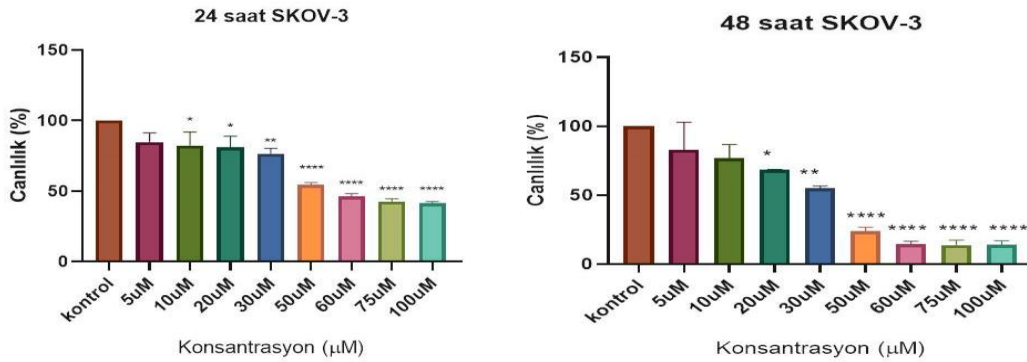
48 saatlik inkübasyon sonrası ise, 0.05 mM agomelatin uygulaması SKOV-3 hücre canlılığı üzerine kontrol hücrelerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermemektedir. Ancak 0.1 mM agomelatin uygulaması sonrasında hücre canlılığı % 52.15 olarak belirlenmiştir ($p \leq 0.01$). Konsantrasyonun 1 veya 2 mM çıkarılması ile hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ($p \leq 0.0001$). SKOV-3 hücrelerinin 48 saat agomelatin ile muamelesi sonucu IC_{50} değeri ise 0.125 mM olarak bulunmuştur. İleri deneysel çalışmalarda agomelatinin 24 saatlik inkübasyon sonrasında belirlenen IC_{50} değeri kullanılmıştır.

4.2 Sisplatin'in Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

SKOV-3 ovaryum kanser hücrelerinde sisplatinin (5-100 μ M) farklı konsantrasyonları ile 24 veya 48 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Sonuçlar Şekil 4.2 'de verilmiştir.

Şekil 4.2

SKOV-3 Hücrelerinin 24 ve 48 Saat Sisplatin Uygulanması Sonrasındaki % Canlılık Oranları



Sonuçlar iki bağımsız deney ve her deneyde $n=4$ olarak ifade edilmiştir. Analiz one-way Anova ile yapılmıştır (** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

Elde edilen sonuçlar, 5 μ M sisplatin uygulaması sonrasında SKOV-3 hücre canlılığında bir değişim olmadığını göstermiştir. Ancak, 20 μ M ve daha yüksek konsantrasyon uygulamalarında ise, hücre canlılığı konsantrasyon ve zamana bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşün olduğu belirlenmiştir. Özellikle 50 μ M sisplatin ile 48 saat

inkübasyon sonrasında hücre canlılığı % 23.87 ($p \leq 0.0001$), 60 μM uygulama sonrasında % 14.48, 75 μM uygulama sonrasında % 13.76 ve 100 μM uygulama sonrasında ise % 13.89 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

SKOV-3 hücrelerinin 24 saat sisplatin ile muamelesi sonrasında IC_{50} değeri 55.31 μM , 48 saat sonra ise 32.59 μM olarak bulunmuştur. İleri deneysel çalışmalarda sisplatinin 24 saat inkübasyon sonrasında belirlenen IC_{50} kullanılmıştır.

4.3 Kombine Dozlarla Sitotoksik Etkilerin Belirlenmesi

Agomelatin ve sisplatin hesaplanan IC_{50} dozları üzerinden % 100, 75, 50, 40, 30, 20 ve 10 kombinasyon oranları oluşturulmuştur. Oluşturulan bu kombinasyon oranlarının SKOV-3 ovaryum kanseri hücreleri üzerindeki inhibe edici etkileri MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Bu kombine doz aralığında SKOV-3 hücreleri 24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur.

SKOV-3 hücre hattındaki kombinasyonların sinerjik ve antagonist etkisini belirleyebilmek için CompuSyn programı kullanılmıştır. Agomelatin ve sisplatin kombine uygulama dozları şu şekilde belirlenmiştir:

%10 (0.06 mM agomelatin + 5.51 μM sisplatin)

%20 (0.13 mM agomelatin + 11.06 μM sisplatin)

%30 (0.19 mM agomelatin + 16.59 μM sisplatin)

%40 (0.26 mM agomelatin + 22.12 μM sisplatin)

%50 (0.32 mM agomelatin + 27.65 μM sisplatin)

%75 (0.48 mM agomelatin + 41.48 μM sisplatin)

%100 (0.65 mM agomelatin + 55.31 μM sisplatin)

Belirlenen kombinasyon indeks sonuçlarına göre (Tablo 4.1 ve Şekil 4.3) % 75 ve % 100 olan kombinasyon dozları uygulanan SKOV-3 hücrelerinde sinerjistik etki gözlenirken, % 10, % 20, % 30 ve % 40 kombinasyon gruplarında ise, ilaçların antagonistik etkili olduğu görülmüştür (Şekil 4.3). Farklı derecelerde antagonistik etki gösteren % 40, % 30, % 20 ve % 10 kombine doz uygulamaları daha ileri deneysel çalışmalarda araştırılmak üzere seçilmiştir.

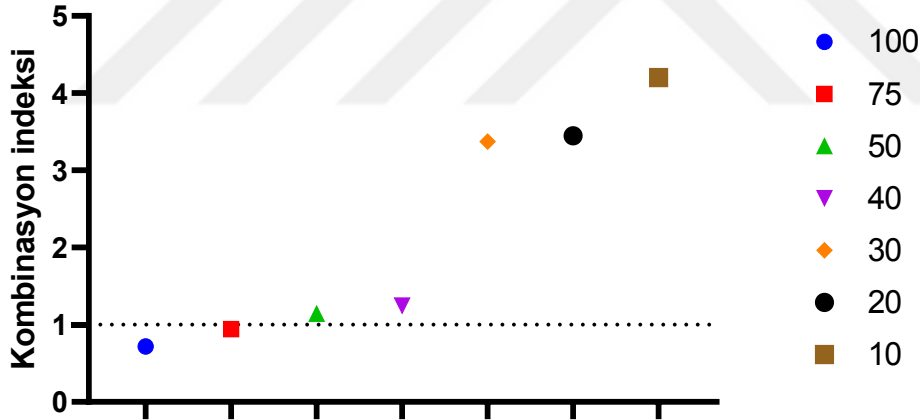
Tablo 4.1

Agomelatin ve Sisplatin'in IC₅₀ Dozları Üzerinden Farklı Yüzdelerde Oluşturulan Kombinasyonlarının SKOV-3 Ovaryum Kanseri Hücre Hatlarındaki Sitotoksosite Verileri Kullanılarak Hesaplanan Kombinasyon İndeksleri (CI)

IC ₅₀ Yüzdesi	Dozlar (Ago+Cis)	Kombinasyon İndeksi (CI)
%10	0.06 mM + 5.53 µM	4.20
%20	0.13 mM + 11.06 µM	3.44
%30	0.19 mM + 16.59 µM	3.37
%40	0.26 mM + 22.12 µM	1.24
%50	0.32 mM + 27.65 µM	1.14
%75	0.48 mM + 41.48 µM	0.94
%100	0.65 mM + 55.31 µM	0.71

Şekil 4.3

Agomelatin ve Sisplatin'in IC₅₀ Dozları Üzerinden Farklı Yüzdelerde Oluşturulan Kombinasyonlarının SKOV-3 Ovaryum Kanseri Hücre Hatlarındaki Sitotoksosite Verileri Kullanılarak Hesaplanan Kombinasyon İndeksleri (CI < 1 (Sinerjist), CI =1 (Aditif), CI > 1(Antagonist))



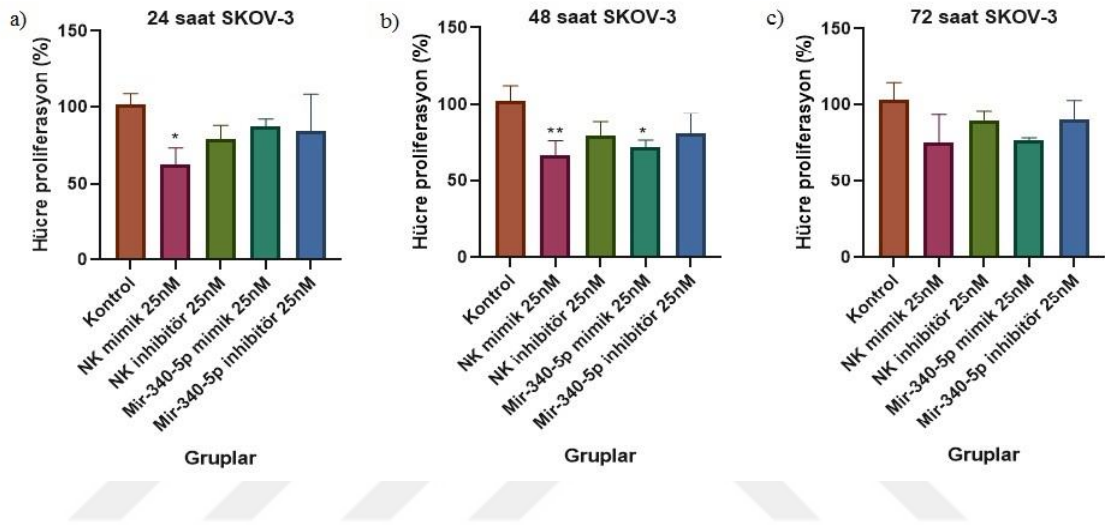
4.4 miR-340-5p Mimik ya da İnhibitörün Farklı Dozlarının Proliferasyon Üzerine Etkisi

SKOV-3 hücrelerinin E-platelere ekimi yapıldıktan sonra, 24 saat RTCA cihazında inkübasyona bırakılıp, okuma alınmıştır. İnkübasyondan sonra, miR-340-5p mimik, miR-340-5p inhibitör ya da negatif kontrol miRNA'ların farklı konsantrasyonları (25, 30 veya 50 nM) ile hücreler 72 saat cihaz içerisinde transfeksiyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon süresi boyunca her 15 dakika aralıklarla ölçüm yapılarak, CI belirlenmiştir. Deneyin analiz sonuçları transfeksiyon yapıldığı süreye göre normalize edilerek CI

değerleri hesaplanmıştır. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Kontrol grubu % 100 kabul edilerek 24, 48 veya 72 saatlerine göre alınmış CI değerlerinden proliferasyonu oranları hesaplanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.4-4.6'da verilmiştir.

Şekil 4.4

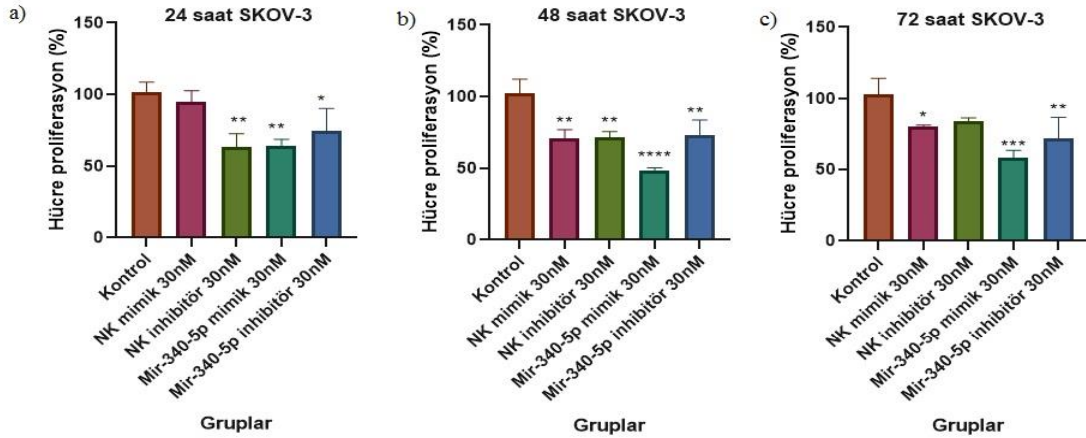
25 nM miR-340-5p Mimik, miR-340-5p İnhibitiör ve Negatif Kontrolleri ile Transfekte Edilen SKOV-3 Hücrelerinin Proliferasyon Oranları (n=3)



25 nM miR-340-5p mimik ya da inhibitiör uygulaması sonrasında tüm zaman aralıklarında SKOV-3 hücrelerinde proliferasyon oranında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.4).

Şekil 4.5

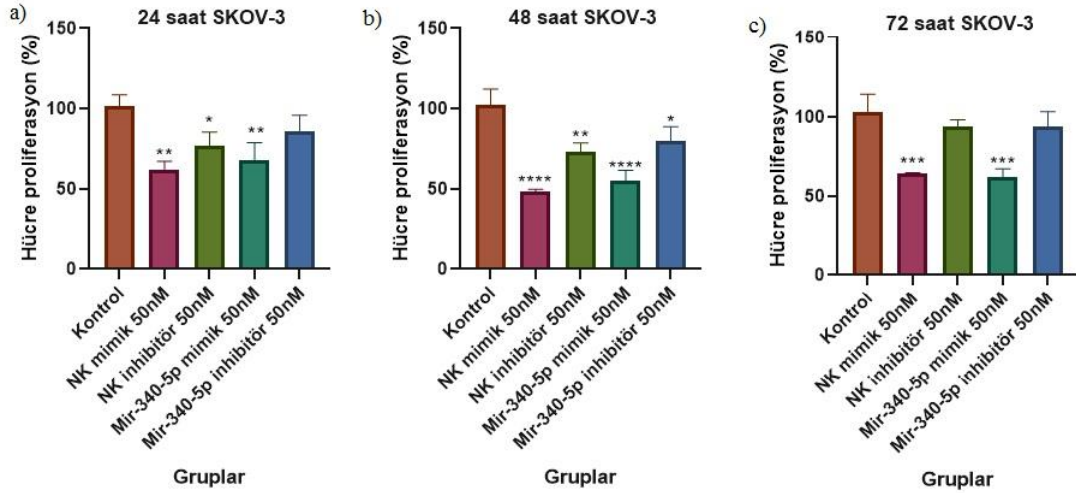
30 nM miR-340-5p Mimik, miR-340-5p İnhibitiör ve Negatif Kontrolleri ile Transfekte Edilen SKOV-3 Hücrelerinin Proliferasyon Oranları (n=3)



30 nM miR-340-5p mimik 24 saat uygulama sonrasında kontrol hücrelerine kıyasla proliferasyonu oranında istatistiksel olarak düşüş göstermiştir (% 63.41) ($p \leq 0.01$). 48 saat uygulama sonrasında ise, kontrol hücrelerine ve 24 saat inkübasyon süresine kıyasla proliferasyonu oranı anlamlı bir şekilde bir düşüş (% 48.66) ($p \leq 0.0001$) göstermiştir. 72 saat inkübasyon süresinde ise % 58.13 oranında proliferasyonu oranı istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir ($p \leq 0.001$). 48 saatte 30 nM miR-340-5p inhibitör uygulamasında ise proliferasyonu oranı % 73.30, 72 saatte ise % 71.86 olarak bulunmuştur (Şekil 4.5).

Şekil 4.6

50 nM miR-340-5p Mimik, miR-340-5p İnhibitör ve Negatif Kontrolleri ile Transfekte Edilen SKOV-3 Hücrelerinin Proliferasyon Oranları (n=3)



50 nM miR-340-5p mimik 24 saat uygulaması sonrasında % 68.07, 48 saatte ise proliferasyonu oranı % 55 olarak bulunurken, miR-340-5p inhibitör uygulaması sonrasında sırasıyla % 86.13 ve % 79.73 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.6).

SKOV-3 hücrelerinin 30 nM miR-340-5p mimik negatif kontrol ile 48 saat inkübasyonu sonrasında ise proliferasyonu oranı % 70.54 olarak belirlenmiştir. Aynı zaman aralığında 30 nM miR-340-5p inhibitör negatif kontrol uygulaması ise % 71.46 proliferasyon olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda, 30 nM miR-340-5p mimik 48 saat uygulaması sonrasında hücre proliferasyonu etkili bir şekilde düştüğü ve aynı konsantrasyonda inhibitör uygulamasının ise kontrol hücrelere kıyasla proliferasyonu oranında bir etki göstermediği görülmektedir. 30 nM miR-340-5p'nin

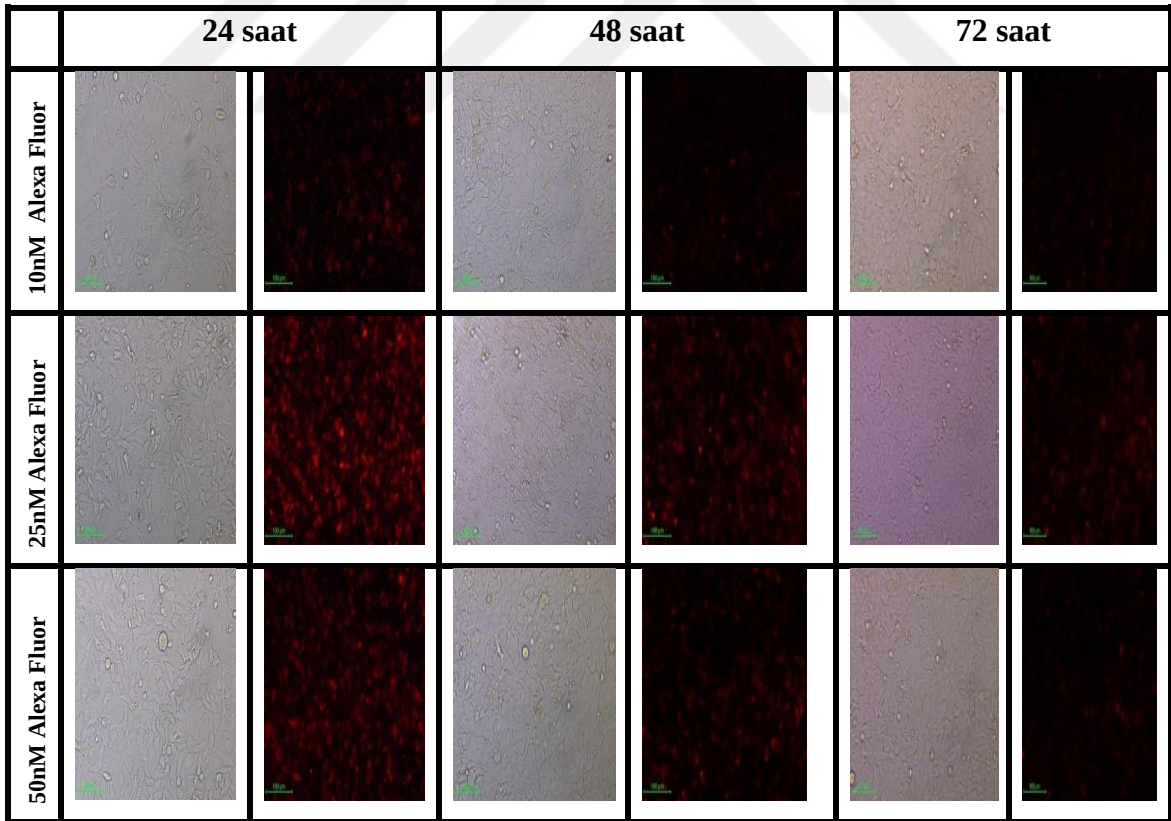
SKOV-3 hücre proliferasyonu üzerine baskılayıcı bir etkiye sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.5).

4.5 miR-340-5p Transfeksiyon Verimliliğinin BLOCK-iT Alexa Fluor Kırmızı Floresan ile Belirlenmesi

SKOV-3 hücrelerinin 24 kuyucuklu plakalara ekimi yapıldıktan sonra, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda ayrı kuyucuklara BLOCK-iT Alexa Fluor Kırmızı Floresan'ın farklı konsantrasyonları (10 nM, 25 nM veya 50 nM) ile hücreler transfekte edilmiş ve elde edilen sayısal sonuçlar kullanılarak transfeksiyon verimliliği hesaplanmıştır. Transfeksiyondan 24, 48 veya 72 saat sonra hücre besiyeri PBS ile değiştirilerek, üç farklı hücre alanları hem ışık hem de floresan mikroskobu ile görüntülenmiş ve hücre sayımı yapılarak ortalama değerleri hesaplanmıştır. Görsel sonuçlar Şekil 4.7'de sayısal sonuçlar ise Tablo 4.2'de verilmiştir.

Şekil 4.7

BLOCK-iT Alexa Fluor Floresan Boyası ile Transfeksiyon Verimliliği



Görüntüler (20×) olarak ışık ve floresan mikroskobu ile çekilmiştir.

25 nM ve 50 nM Alexa fluor ile 48 saat transfekte edilen hücrelerin transfeksiyon verimliliği sırasıyla % 97 ve % 94.6 olarak belirlenmiştir. Bu oran transfeksiyon süresinin 72 saate çıkarılması ile % 94.3 ve % 92.9'a düşmüştür.

Tablo 4.2

SKOV-3 Ovaryum Kanseri Hücrelerinde BLOCK-iT Alexa Fluor Kırmızı Floresan ile Farklı Konsantrasyon (10 nM, 25 nM, 50 nM) ve Zamanda (24 saat, 48 saat ve 72 saat) Hesaplanan Transfeksiyon Verimliliği

Transfeksiyon verimliliği (%)	24 saat	48 saat	72 saat
10 nM Alexa Fluor	% 93.4	% 86.7	% 79.2
25 nM Alexa Fluor	% 97.2	% 97	% 94.3
50 nM Alexa Fluor	% 96.6	% 94.6	% 92.9

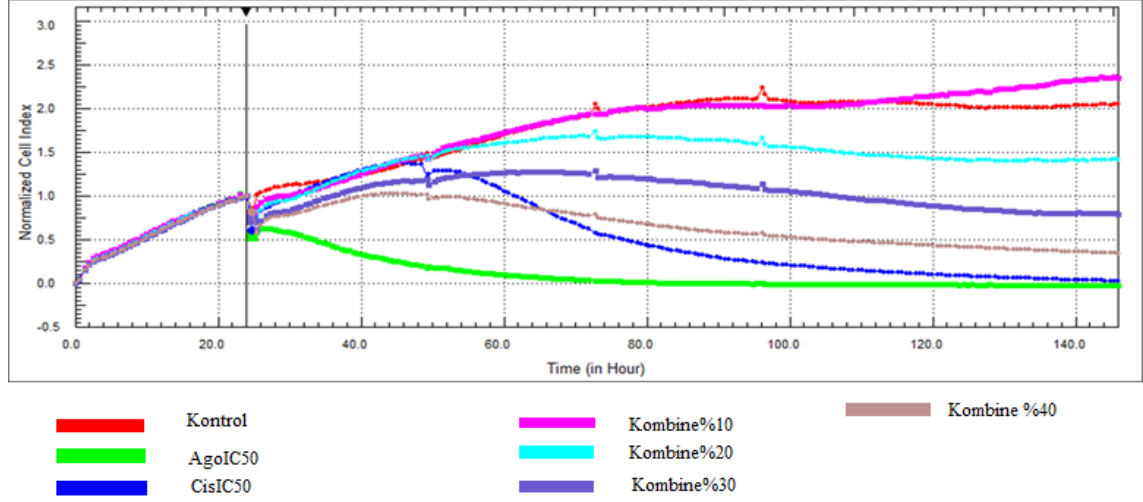
Elde edilen deneyler sonucunda, BLOCK-iT Alexa-Fluor kırmızı floresan boyasını absorbe eden hücrelerde transfeksiyon işleminin gerçekleştiği kabul edilmiştir. Hesaplanan transfeksiyon % verimliliğine göre 25 ve 50 nM'da BLOCK-iT Alexa-Fluor kırmızı floresan boyasının geçirgenliği daha iyi olduğundan dolayı ara konsantrasyon olan 30 nM deneysel çalışmalar için seçilmiştir. “Bulgular ve Yorum” 4.4’de yapılan miRNA transfeksiyonunun farklı dozlardaki proliferasyonu deney çalışmalarını da desteklemektedir.

4.6 Agomelatin, Sisplatin veya Kombine İlaç Uygulamalarının SKOV-3 Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

SKOV-3 hücrelerinin agomelatin IC₅₀ (0.65 mM), sisplatin IC₅₀ (55.31 µM) veya kombine (% 10, % 20, % 30, % 40) konsantrasyonları ile muamele edilmesi için öncelikle E-plakalara hücre ekimi yapılmış olup, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. RTCA cihazında her 15 dakikada bir, 120 saatlik inkübasyon süresi boyunca ölçüm alınmıştır. Deneyin analiz sonuçları ilaçların eklendiği süreye göre normalize edilerek CI değerleri hesaplanmıştır. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Kontrol grubu % 100 kabul edilerek 24, 48, 72 veya 96 saatlerine göre alınmış, CI değerlerinden hücre proliferasyonu oranları hesaplanmıştır. Sonuçlar 2 bağımsız deney şeklinde ve her deneyde dört kuyunun ortalaması alınarak verilmiştir. RTCA cihazından alınan normalize CI’ye karşı zaman grafiği Şekil 4.8 ve hücre proliferasyonu sonuçları ise Şekil 4.9’da verilmiştir.

Şekil 4.8

SKOV-3 Hücrelerine E-plakalarda Agomelatin IC_{50} , Sisplatin IC_{50} ve Kombine (%10, %20, %30, %40) Uygulamasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi



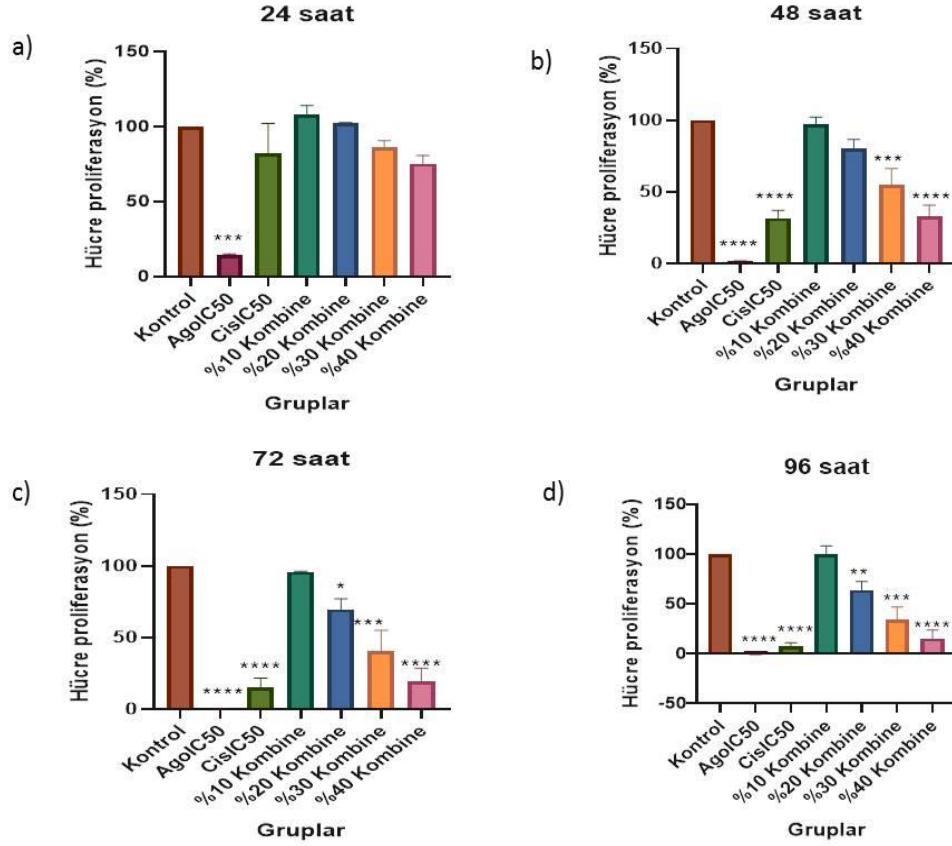
İki bağımsız deneyden temsili olarak bir tekrar alınmıştır (her deneyde n=4).

60 saat inkübasyon süresi sonrasında % 10 ilaç kombinasyonu muamelesi yapılmış SKOV-3 hücre proliferasyonu oranının kontrol grubu hücrelerle benzer şekilde seyrettiği görülmektedir. Daha sonra sırasıyla, % 20, % 30 ve % 40 ilaç kombinasyonları hücre proliferasyonunda düşüşe neden olmuştur. Agomelatin IC_{50} ve sisplatin IC_{50} etkileri karşılaştırıldığında ise, agomelatinin 120 saat inkübasyon süresine kadar hücre proliferasyonunu sisplatine göre daha yüksek oranda baskıladığı görülmektedir (Şekil 4.8).

Hücre indeks verileri kullanılarak hazırlanan % proliferasyonu grafikleri Şekil 4.9'da verilmiştir.

Şekil 4.9

SKOV-3 Hücrelerine Agomelatin IC_{50} , Sisplatin IC_{50} ve Kombine Doz Uygulamalarının SKOV-3 Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi



Hücre proliferasyon oranları ortalama $\pm$ SEM' dir. Analiz one-way Anova ile gerçekleştirilmiştir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, $n = 8$.

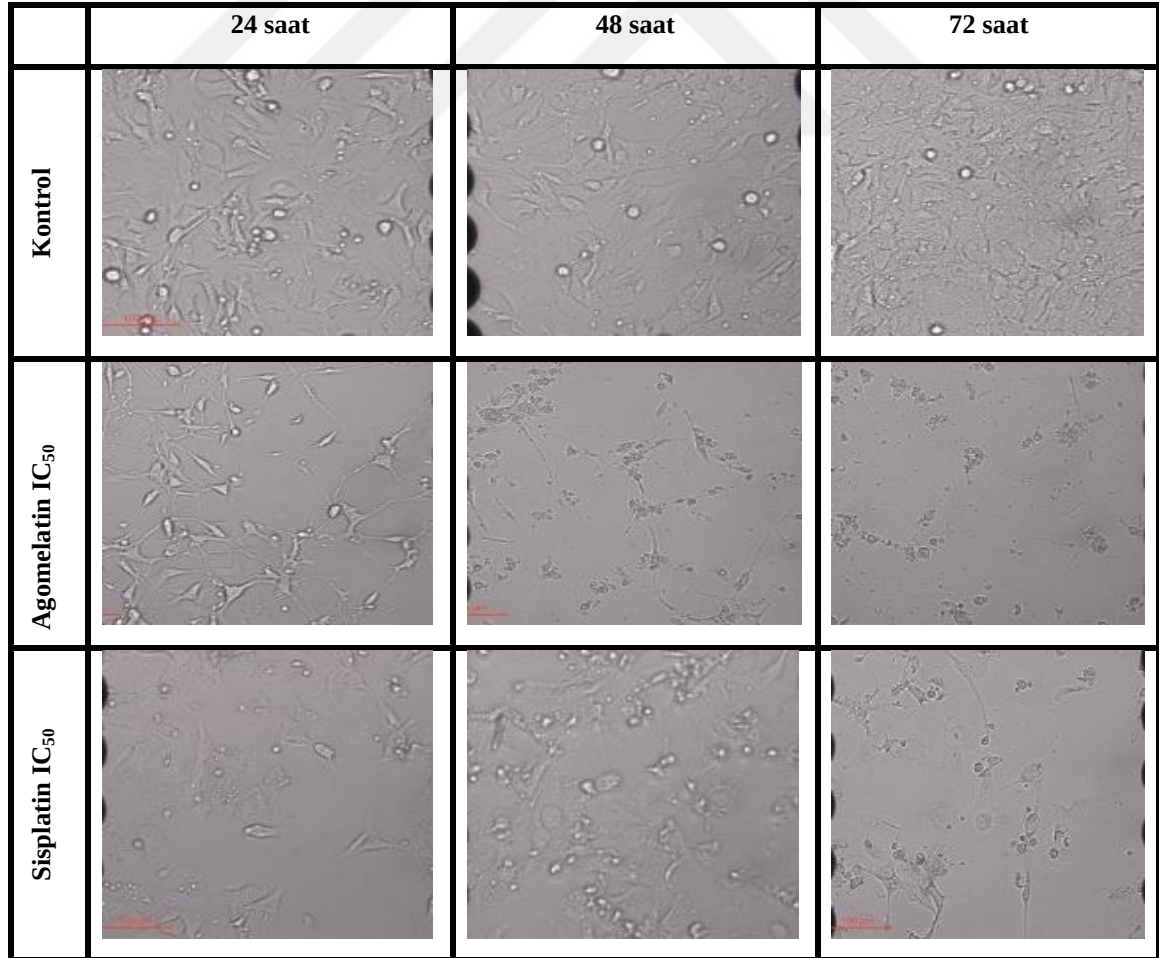
Elde edilen sonuçlar, 24 saat inkübasyon sonrasında agomelatin uygulaması, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde baskıerken (%14.25) ($p < 0.001$), agomelatin uygulaması dışındaki tüm uygulamalarda 24 saat inkübasyon sonrasında SKOV-3 hücre proliferasyonu üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin olmadığını göstermektedir (Şekil 4.9a). İnkübasyon süresinin 48 saate uzatılması ile hücre proliferasyonunun agomelatin IC_{50} (0.65 mM) uygulaması sonrasında kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde baskılandığı görülmektedir (% 1.83) ($p < 0.0001$) (Şekil 4.9b). 55.31 μ M sisplatin uygulaması ise, hücre proliferasyonunu % 31.81'e ($p < 0.0001$) kadar düşürmüştür. Kombine %30 ve kombine %40 ilaç uygulamaları sonrasında ise hücre proliferasyonu doza bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş göstermiştir (Şekil 4.9b).

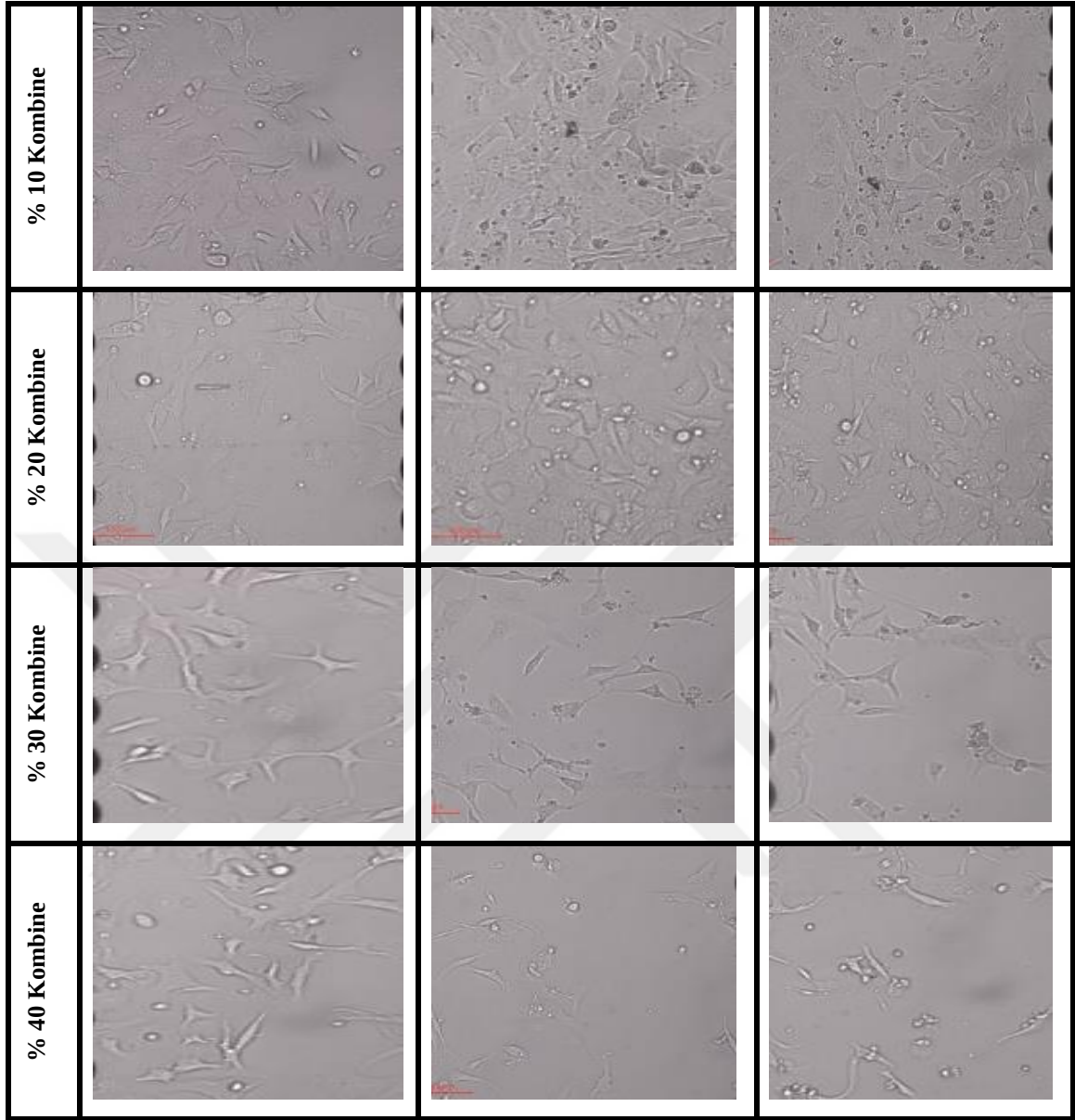
72 saat inkübasyon sonrasında ise, 0.65 mM agomelatin uygulaması hücre proliferasyonunu tamamen inhibe ederken, sisplatin uygulaması sonrasında hücre proliferasyonu % 15.47 olarak bulunmuştur ($p<0,0001$). Hücre proliferasyonu % 10 ilaç kombinasyonu varlığında değişmezken, % 20 ilaç kombine uygulaması sonrasında hücre proliferasyonu % 69.83, % 30 kombine uygulaması sonrasında % 40.38 hücre proliferasyonu ve % 40 kombine uygulaması sonrasında ise % 19.65 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.9c). İnkübasyon süresinin 96 saate uzatılması ile uygulamaların 72 saate göre hücre proliferasyonunu daha etkin bir şekilde baskılandığı görülmektedir (Şekil 4. 9d).

Tüm uygulamalanan işlemlerden 24 saat sonrasında her deney grubundan ışık mikroskobu ile görüntüler alınmıştır. Görüntüler Şekil 4.10’da verilmiştir.

Şekil 4.10

SKOV-3 Hücrelerine Agomelatin IC₅₀, Sisplatin IC₅₀ ve Kombine Doz Uygulamalarının Işık Mikroskobu Görüntüleri





Görüntüler ışık mikroskopunda (20×) olarak çekilmiştir.

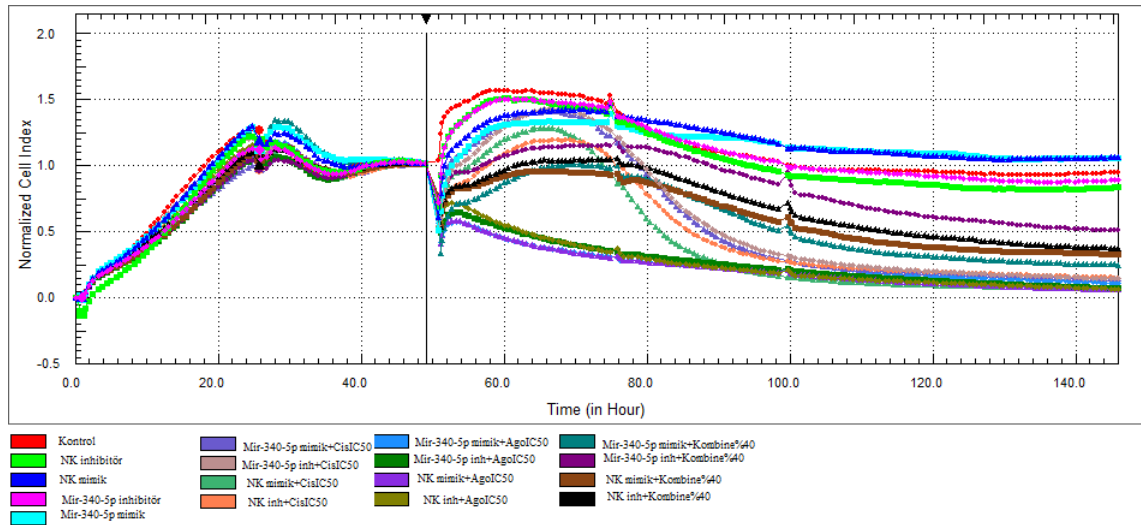
Şekil 4.10'da gösterildiği gibi agomelatin IC_{50} , sisplatin IC_{50} ve % 40 kombine uygulanan hücre grupları kontrol grubuna kıyasla hücre sayılarında azalma olduğu görülmektedir. Agomelatin IC_{50} uygulamasının 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerindeki hücre sayısındaki azalma oldukça belirgindir. Kombine hücre gruplarında ise, % 40 ve % 30 kombine uygulanan hücre gruplarının, % 20 ve % 10 kombine uygulanan hücre gruplarına kıyasla hücre sayısında daha fazla azalma olduğu görülmektedir. Bu görüntülerde Şekil 4.9'da verilen hücre proliferasyondaki azalmayı destekler niteliktedir.

4.7 miR-340-5p Transfekte SKOV-3 Hücre Proliferasyonu Üzerine Agomelatin, Sisplatin ve Kombine İlaç Uygulamasının Etkilerinin Belirlenmesi

Hücrelerin miR-340-5p mimik, miR-340-5p inhibitör ve negatif kontrollerinin transfeksiyon işlemi ile muamele edilmesi için öncelikle plakalara hücre ekimi yapılmış olup, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonrasında transfeksiyon uygulaması yapılmıştır ve yine 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Transfeksiyon sonrasında agomelatin IC₅₀ (0.65 mM), sisplatin IC₅₀ (55.31 µM) veya kombine % 40 ilaç dozları her bir kuyucuğa eklenmiştir. Hücreler daha sonra 72 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. RTCA cihazında her 15 dakikada bir ölçüm alınmıştır. Deneyin analiz sonuçları ilaçların eklendiği süreye göre normalize edilerek CI değerleri hesaplanmıştır. Kontrol hücre grubuna herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Kontrol grubu % 100 kabul edilerek 24, 48 ve 72 saatlerine göre alınmış CI değerlerinden hücre proliferasyonu oranları hesaplanmıştır. Sonuçlar 2 bağımsız deney şeklinde her deneyde 3 kuyunun ortalaması alınarak verilmiştir. RTCA cihazından alınan normalize CI'e karşı zaman grafiği Şekil 4.11 ve % hücre proliferasyonu sonuçları ise Şekil 4.12-14'de verilmiştir.

Şekil 4.11

SKOV-3 Hücrelerine E-plakalarda miR-340-5p Mimik, miR-340-5p İnhibitör ve Negatif Kontrollerinin Transfeksiyonu Sonrasında Agomelatin IC₅₀, Sisplatin IC₅₀ veya Kombine % 40 Uygulamasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

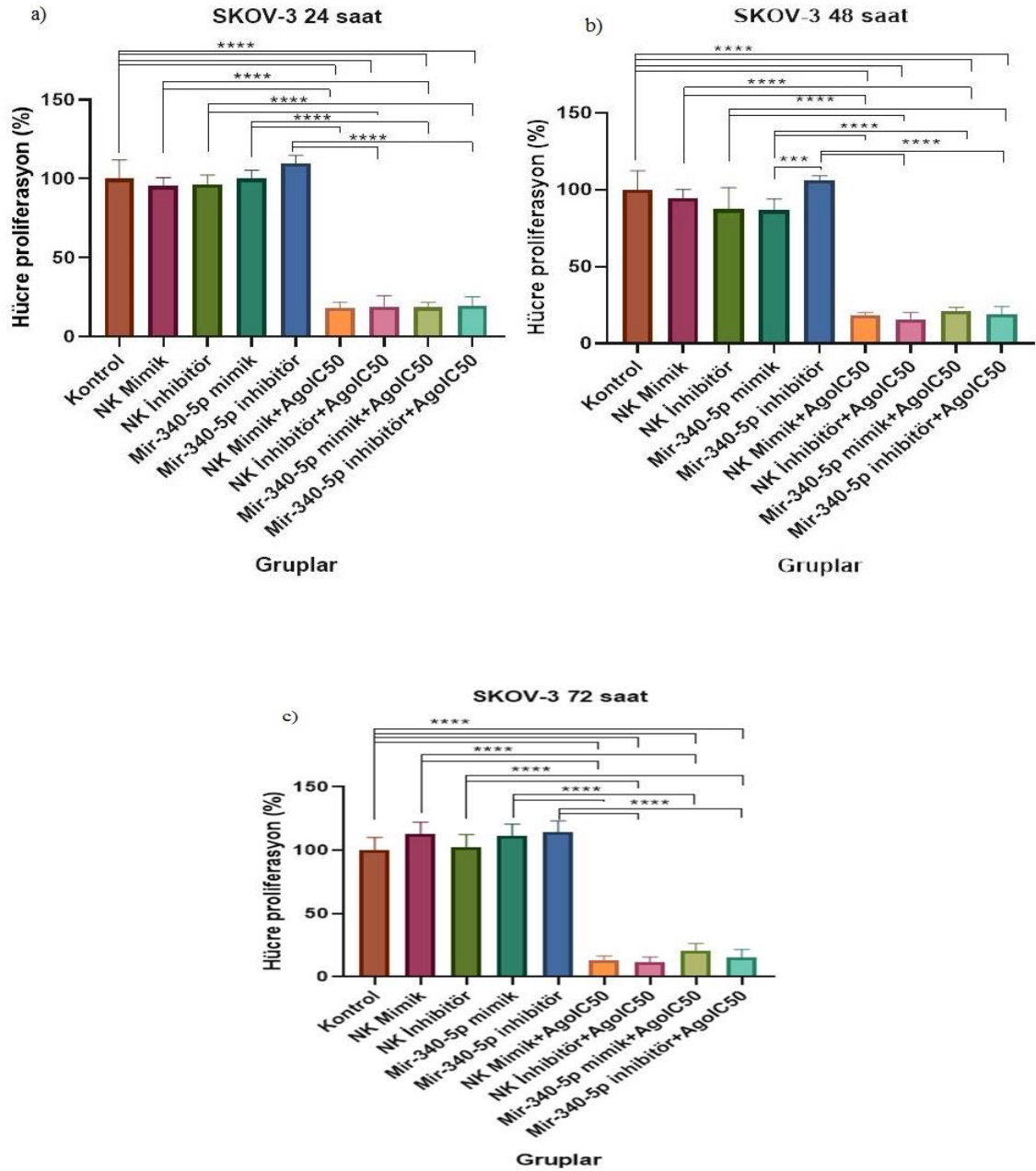


İki bağımsız deneyden temsili olarak bir tekrar alınmıştır (her deneyde n=3).

Hücrelerin miR-340-5p mimik ya da inhibitör ile transfeksiyonu sonrasında, 0.65 mM agomelatin (Şekil 4.12), 55.31 μ M sisplatin (Şekil 4.13) ya da % 40 kombine (Şekil 4.14) ilaç uygulaması sonrasında hücre proliferasyonu oranları hücre indeks değerleri kullanılarak % olarak hesaplanmıştır.

Şekil 4.12

SKOV-3 Hücrelerine miR-340-5p ve Agomelatin IC₅₀ Uygulamasının Zamana Bağlı Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi



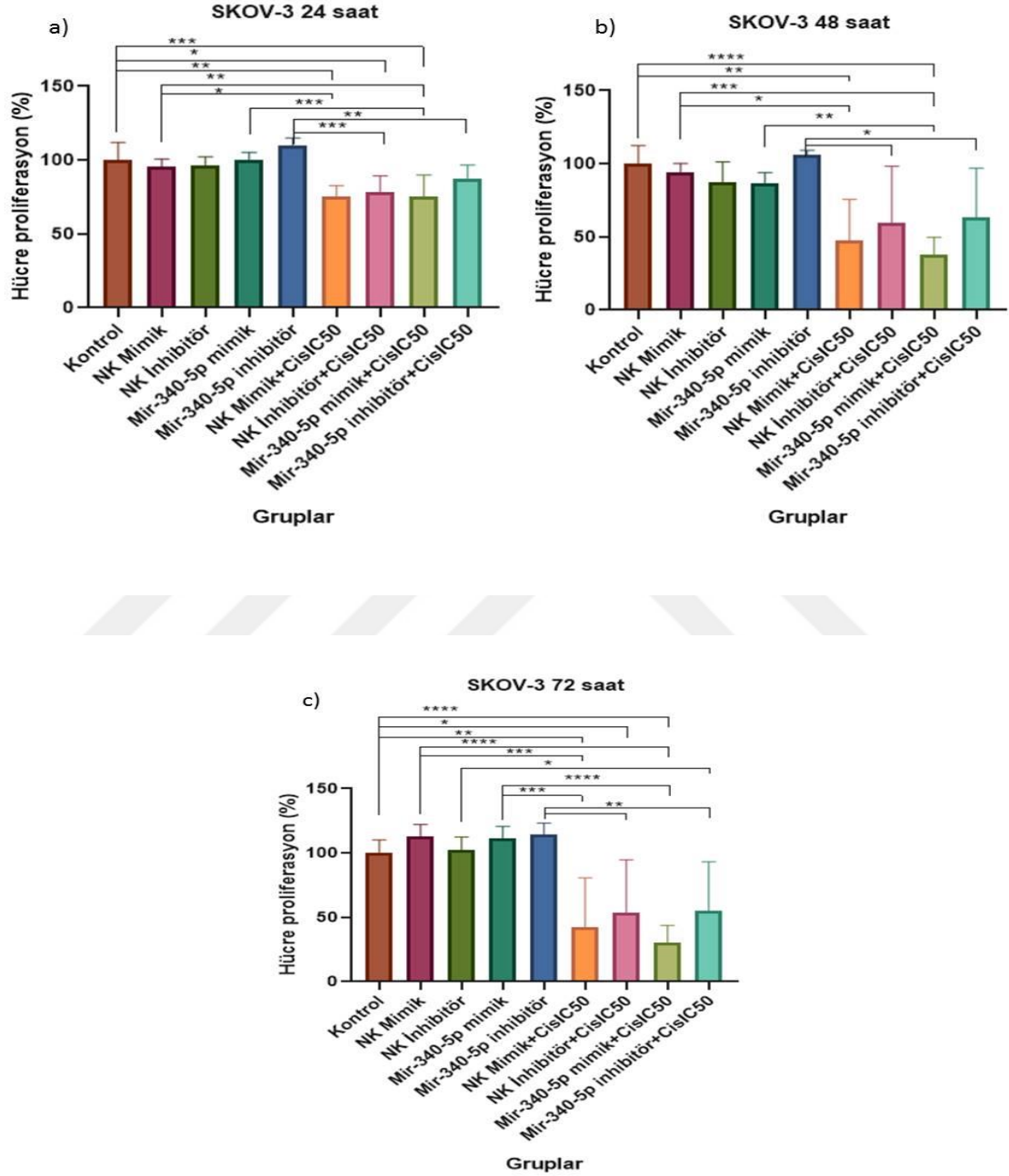
Hücre proliferasyonu oranları ortalama $\pm$ SEM, n=6.

Hücrelerin miR-340-5p mimik ya da inhibitör transfeksiyonu sonrasında 0.65 mM agomelatin eklenmesi hücre proliferasyonu oranı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.12). 24 saat inkübasyon sonrasında miR-340-5p mimik ya da inhibitör transfekte hücrelerde proliferasyonu oranı, kontrol ve negatif kontrol hücre gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim bulunmamıştır. Agomelatin IC₅₀ eklenmesi ile birlikte hücre proliferasyonu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalarak, mimik hücre grubu proliferasyonu oranı % 18.73, inhibitör hücre grubunda ise % 19.74 olarak bulunmuştur ($p \leq 0.0001$). Benzer etkilerde, negatif kontrol hücre gruplarına agomelatin IC₅₀ eklenmesi ile de negatif kontrol mimik hücre grubu % 18.35, negatif kontrol inhibitör hücre grubunda ise proliferasyonu oranı % 19 olarak, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.12a) ($p \leq 0.0001$). 48 saat inkübasyon sonrasında miR-340-5p mimik transfekte hücrelerde proliferasyonu oranı % 86.59 olarak bulunmuştur. Bu oran agomelatin IC₅₀ eklenmesi ile kontrol ve negatif kontrol mimik hücre gruplarına göre anlamlı bir şekilde düşüş göstermiştir (% 21.07) ($p \leq 0.0001$). miR-340-5p mimik ve inhibitör hücre gruplarında ise proliferasyonu oranlarında istatistiksel olarak anlamlı fark oluşmuştur ($p \leq 0.001$). miR-340-5p inhibitör ile miRNA ekspresyonunun baskılanması sonrasında SKOV-3 hücre proliferasyonu % 106.37 olarak bulunmuştur. Agomelatin IC₅₀ eklenmesi sonrasında ise bu oran % 19.16'ya kadar düşmüştür (Şekil 4.12b). 72 saat inkübasyon süresi sonrasında da benzer etkiler bulunmuştur (Şekil 4.12c).

miR-340-5p mimik ve inhibitörün negatif kontrolleri de hücre proliferasyonu üzerine benzer etkiye sahiptir. Bu nedenden dolayı miR-340-5p ekspresyonunu artışı ya da baskılanması SKOV-3 hücre proliferasyonu üzerine spesifik bir etkiye neden olmadığı düşünülmektedir. Ancak, agomelatin IC₅₀ eklenmesi ile birlikte, tüm hücre gruplarında proliferasyon oranları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır. 24 saat agomelatin uygulamasının SKOV-3 hücre proliferasyonu üzerinde önemli bir etkisinin olabileceği görülmektedir.

Şekil 4.13

SKOV-3 Hücrelerine miR-340-5p ve Sisplatin IC₅₀ Uygulamasının Zamana Bağlı Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi



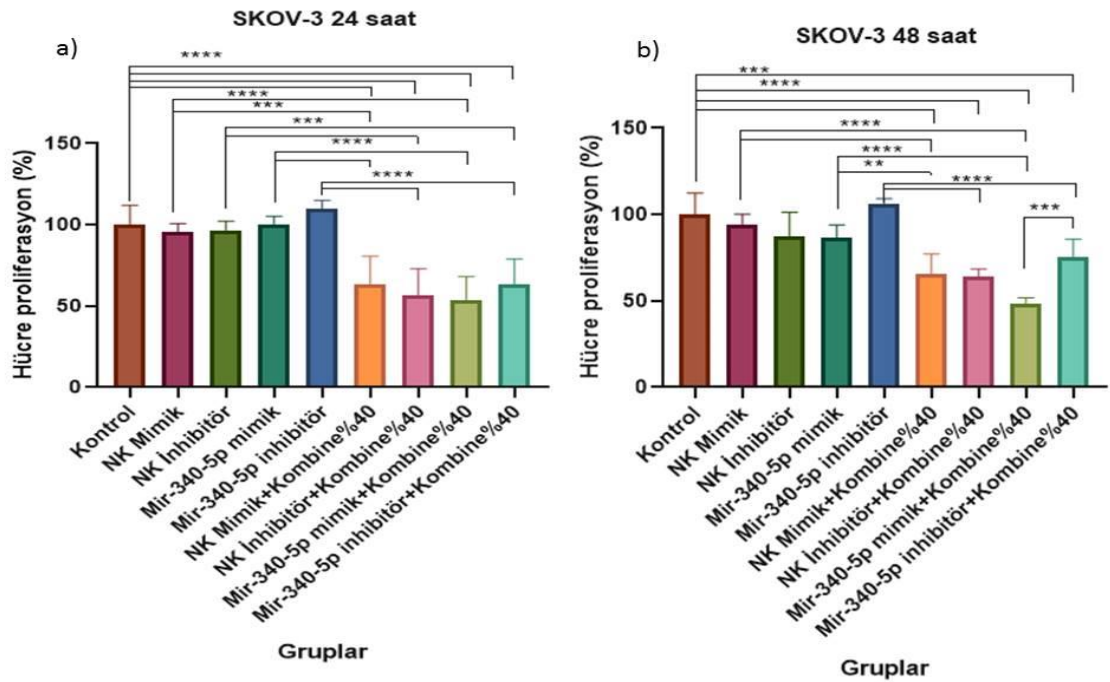
Hücre proliferasyonu oranları ortalama $\pm$ SEM, n=6.

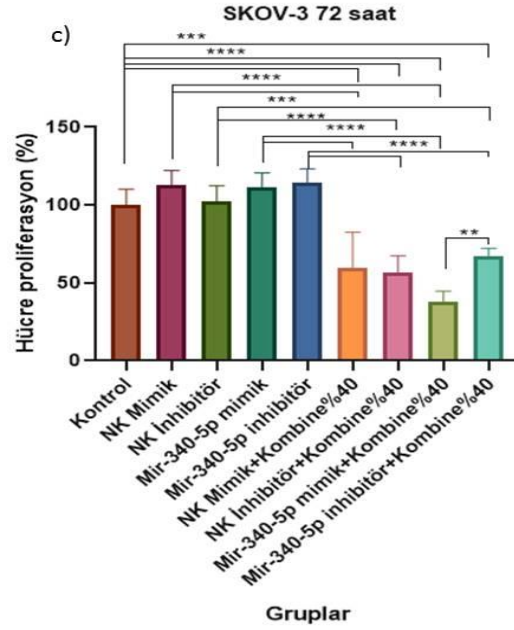
miR-340-5p transfeksiyonu sonrasında 24 saat sisplatin uygulaması hücre proliferasyonu üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermiştir ($p < 0.001$). miR-340-5p mimik ile transfekte hücrelere sisplatin IC₅₀ eklenmesiyle hücre

proliferasyonu % 75.15 bulunmuştur. miR-340-5p inhibitör uygulanan hücelere sisplatin eklenmesi ile de proliferasyon oranı % 87.72 olarak bulunmuştur ($p<0.01$) (Şekil 4.13a). 48 saat inkübasyon sonrasında miR-340-5p mimik transfekte hücelere sisplatin IC_{50} 'nin eklenmesi ile hücre proliferasyonu % 37.93 olarak bulunmuştur ($p<0.01$) (Şekil 4.13b). miR-340-5p inhibitör uygulaması sonrasında, sisplatin IC_{50} 'nin eklenmesiyle proliferasyonu oranı % 63.06 olarak tespit edilmiştir ($p<0.1$). 48 saat inkübasyon, negatif kontrol mimik (% 94.32) ve negatif kontrol inhibitör (% 87.29) uygulaması sonrasında sisplatin IC_{50} eklenmesiyle hücre proliferasyonu oranları sırasıyla % 47.42, % 63.06 olarak tespit edilmiştir ve bu oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). Hücre proliferasyon oranları zamana bağlı olarak azalmıştır (Şekil 4.13).

Şekil 4.14

SKOV-3 Hücrelerine miR-340-5p ve Kombine % 40 Uygulamasının Zamana Bağlı Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi





Hücre proliferasyonu oranları ortalama $\pm$ SEM, n=6.

miR-340-5p transfeksiyonu sonrasında 24 saat % 40 kombine uygulaması hücre proliferasyonu üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermiştir ($p < 0.0001$) (Şekil 4.14a). Ancak, bu değişim miR-340-5p ekspresyon seviyesi ile ilişkilendirilememiştir. miR-340-5p mimik ile transfekte hücrelere % 40 kombine eklenmesiyle hücre proliferasyonu % 53.94 bulunmuştur. miR-340-5p inhibitör uygulanan hücrelere % 40 kombine eklenmesi ile de proliferasyon oranı % 63.39 olarak tespit edilmiştir ($p < 0.0001$). Benzer etkilerde, negatif kontrol hücre gruplarına % 40 kombine eklenmesi ile de negatif kontrol mimik hücre grubu % 63.34, negatif kontrol inhibitör hücre grubunda ise proliferasyonu oranı % 56.8, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.14a) ($p \leq 0.0001$). Transfekte edilen hücrelerde kombine ilaç uygulaması ayrı ayrı ilaç uygulamasına göre sisplatin göre daha etkili görülmektedir. Özellikle 24 saat inkübasyon sonrasında miR-340-5p mimik transfeksiyonu ve % 40 kombine ilaç uygulaması sonrasında hücre proliferasyonu % 53.94 olarak bulunmuşken (Şekil 4.14a), sisplatin uygulaması sonrasında bu oran % 75.15 olarak (Şekil 4.13a) ve agomelatin uygulaması sonrasında ise % 18.72 olarak bulunmuştur (Şekil 4.12a).

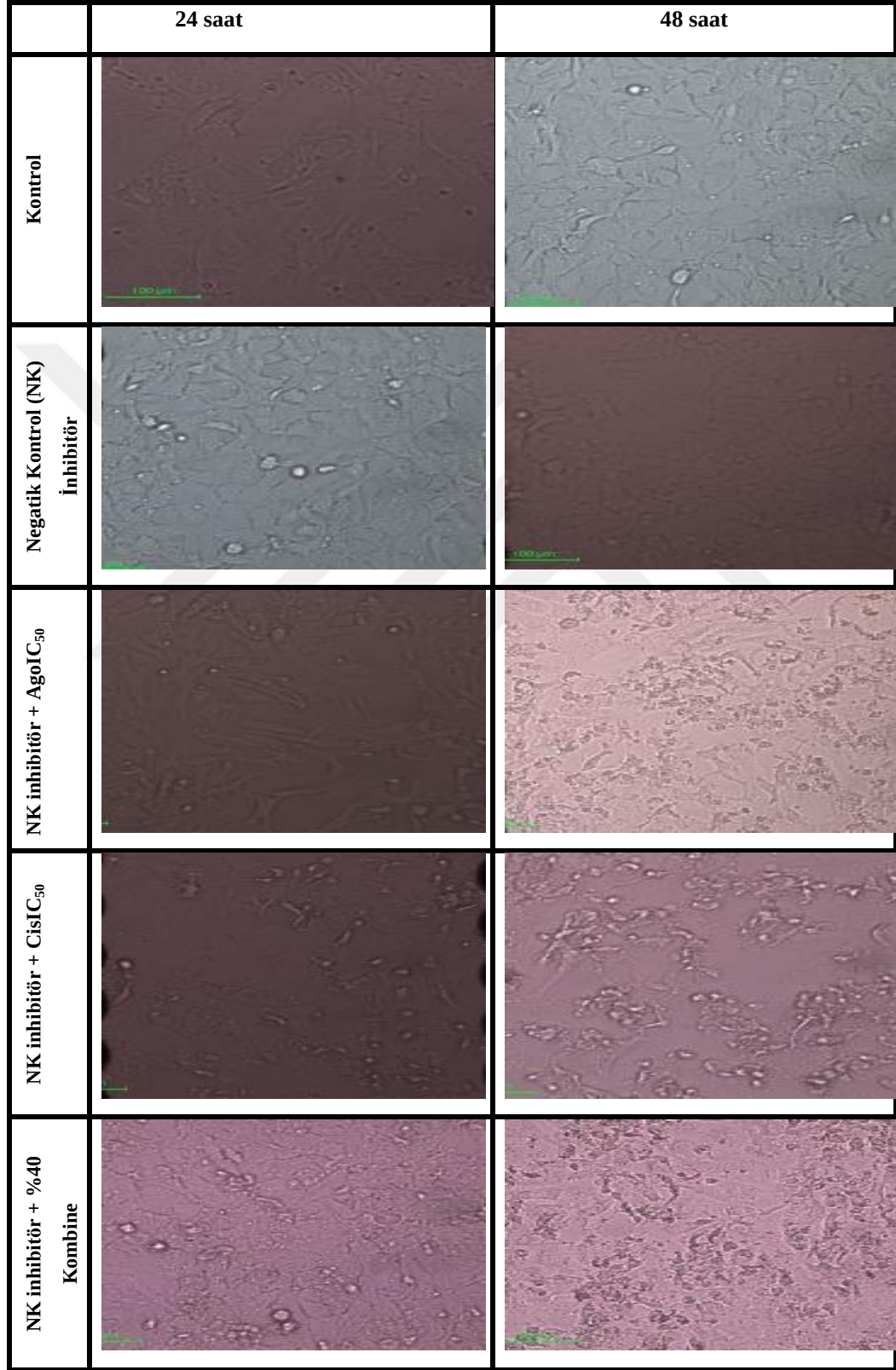
İnkübasyon süresinin 48 saate uzatılmasıyla miR-340-5p inhibitör transfeksiyonu sonrası % 40 kombine ilaç uygulanan hücre grubunda, hücre proliferasyonu oranında (% 75.52) artış olmasına rağmen kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş bulunmuştur (Şekil 4.14b). Ayrı ayrı ilaç uygulaması sonrasında miR-340-5p

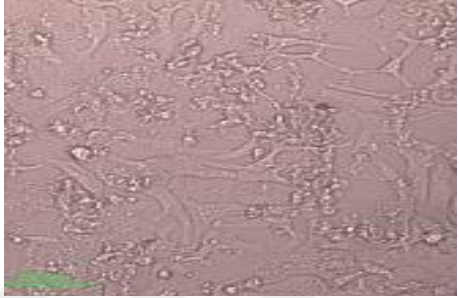
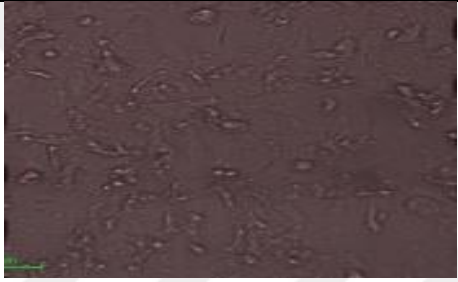
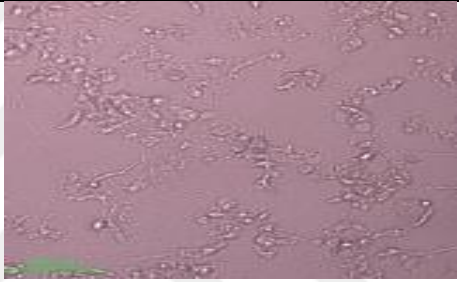
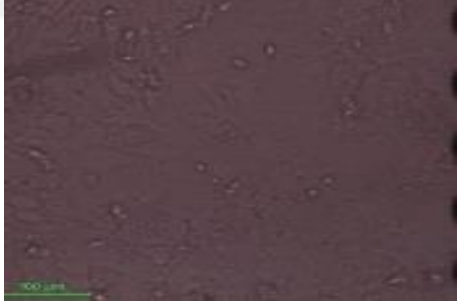
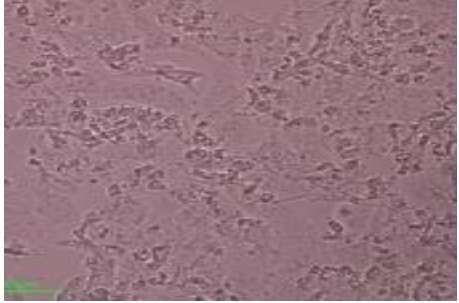
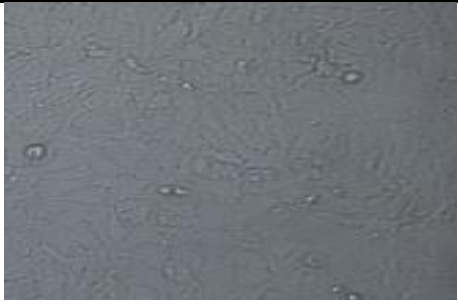
mimik ya da inhibitör etkisinin benzer olmasına rağmen, miR-340-5p mimik transfeksiyonu ve % 40 kombine ilaç uygulaması sonrasında hücre proliferasyonu % 48.29 iken, mimik negatif kontrol uygulaması ile bu oran daha yüksek (% 65.33) bulunmuştur. Elde edilen bu sonuç, miR-340-5p transfeksiyonunun ilaç kombinasyonu ile birlikte SKOV-3 hücre proliferasyonu üzerine spesifik olarak inhibisyona neden olduğunu göstermektedir (Şekil 4.14b). İlaçların ayrı ayrı uygulanması sonrasında böyle bir etki gözlenmemiştir. Destekler nitelikte, miR-340-5p mimik ve % 40 kombine ilaç uygulaması hücre proliferasyonunu miR-340-5p inhibitör uygulamasına göre baskılamıştır ve bu etki miR-340-5p mimik uygulamasına spesifik olarak ortaya çıkmıştır (Şekil 4.14b). İnkübasyon süresinin 48 saat ve 72 saatlerinde miR-340-5p mimik ve miR-340-5p inhibitör hücre gruplarına uygulanan % 40 kombine ilaç uygulaması sonrasında hücre proliferasyon oranlarının karşılaştırılması, istatistiksel olarak anlamlı bir farkın oluştuğunu göstermiştir. 48 saat inkübasyon süresinde miR-340-5p mimik ve % 40 kombine ilaç uygulaması hücre proliferasyonu % 48.29 iken, miR-340-5p inhibitör ve % 40 kombine hücre grubunda bu oran % 75.52 ($p<0.001$), 72 saat inkübasyon süresinde bu oranlar sırasıyla % 37.7, % 66.83 ($p<0.01$) olarak bulunmuştur. Zamana bağlı olarak, miR-340-5p mimik ve % 40 kombine ilaç uygulaması SKOV-3 hücre proliferasyon oranını spesifik olarak anlamlı bir şekilde baskılamıştır.

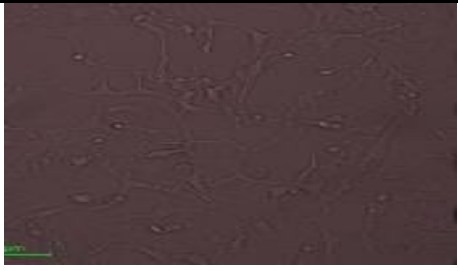
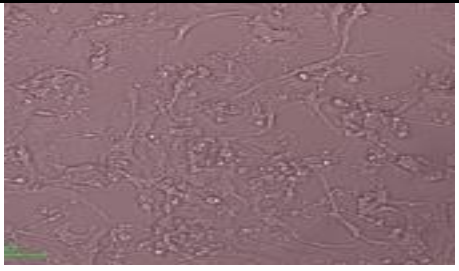
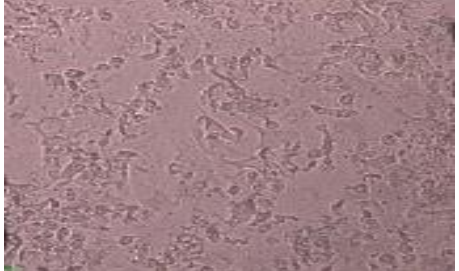
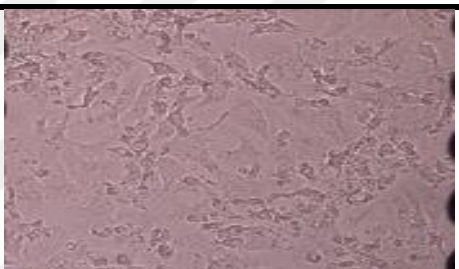
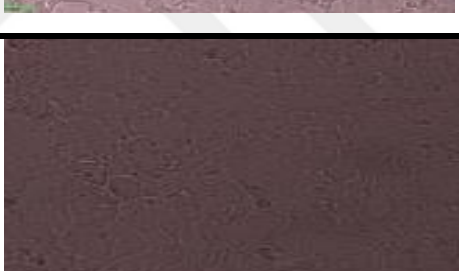
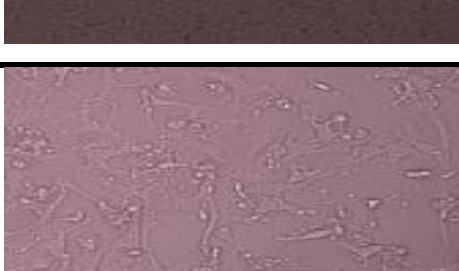
Tüm uygulanan işlemlerden 24 saat sonrasında her deney grubundan ışık mikroskobu ile görüntüler alınmıştır. Görüntüler Şekil 4.15’de verilmiştir.

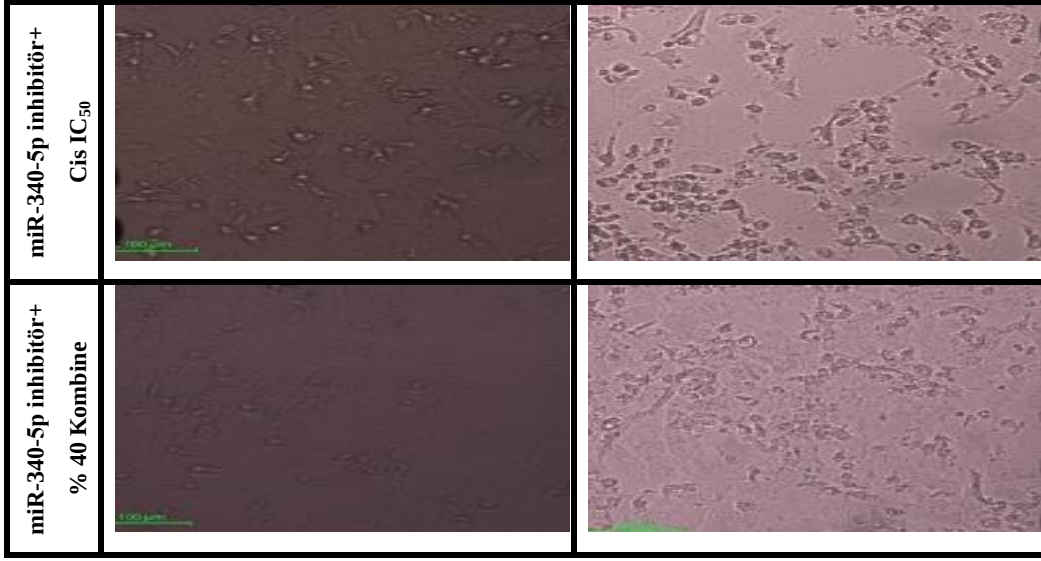
Şekil 4.15

miR-340-5p Transfekte Edilmiş SKOV-3 Hücrelerine Agomelatin IC_{50} , Sisplatin IC_{50} ve % 40 Kombine Doz Uygulamalarının Işık Mikroskobu Görüntüleri (20×)



NK mimik		
NK mimik + Ago IC ₅₀		
NK mimik +Cis IC ₅₀		
NK mimik + %40 Kombine		
miR-340-5p mimik		

miR-340-5p mimik+ Ago IC ₅₀		
miR-340-5p mimik+ Cis IC ₅₀		
miR-340-5p mimik+ %40 Kombine		
miR-340-5p inhibitör		
miR-340-5p inhibitör+ Ago IC ₅₀		



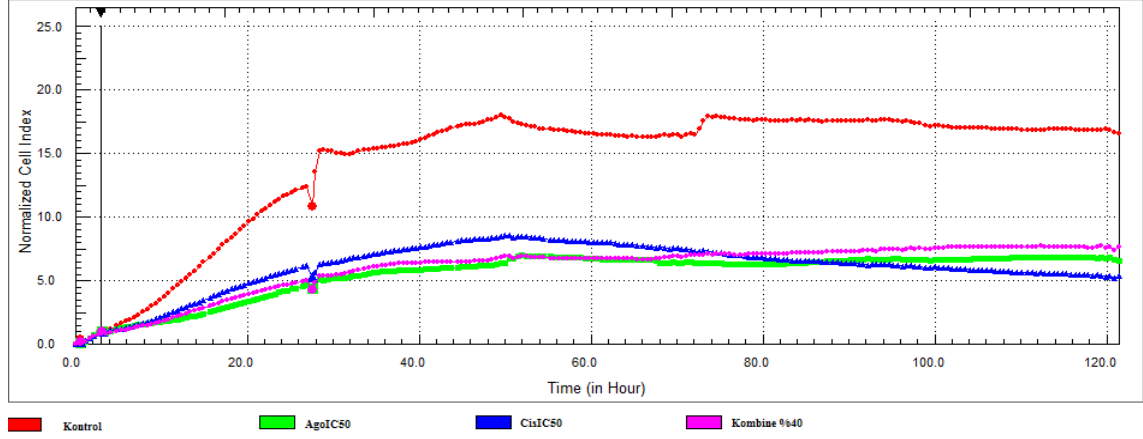
Şekil 4.15’de gösterildiği gibi transfeksiyon uygulanmış hücrelerin kontrol ve negatif kontrol grubuna göre hücre sayısındaki değişim net değildir. miR-340-5p transfeksiyonu sonrası uygulanan agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve % 40 kombine ilaç hücre gruplarındaki SKOV-3 hücre sayısı miktarı kontrol hücre grubuna kıyasla daha az olduğu görülmektedir. Şekil 4.15’deki mikroskop görüntüleri, Şekil 4.12-14’deki hücre proliferasyonlarındaki azalmayı destekler niteliktedir.

4.8 Agomelatin, Sisplatin ve Kombine Doz Uygulamalarının SKOV-3 Hücre Migrasyonu Üzerine Etkisi

SKOV-3 hücrelerinin agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve % 40 kombine ilaç uygulaması sonrasında hücre göç oranları RTCA ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.16’da verilmiştir.

Şekil 4.16

SKOV-3 Hücrelerinin CIM-platelerde Agomelatin IC_{50} , Sisplatin IC_{50} ve Kombine % 40 Uygulama Gruplarının Zamana Karşı Grafiği

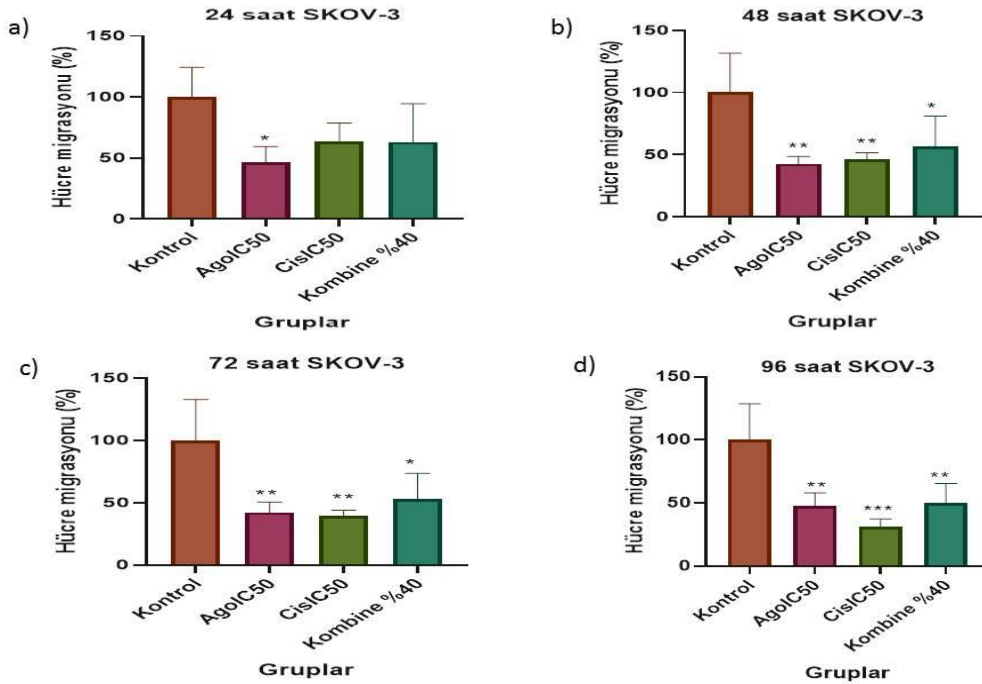


Deneyler iki bağımsız tekrar, her deneyde n=2 yapılmıştır, temsili olarak bir tekrar alınmıştır.

Hücrelerin agomelatin IC_{50} , sisplatin IC_{50} ya da % 40 kombine ilaç muamelesi sonrasında hücre göç oranı kontrol hücre grubuna göre düşük olduğu görülmektedir.

Şekil 4.17

SKOV-3 Hücrelerinin Agomelatin IC_{50} , Sisplatin IC_{50} ve Kombine % 40 Uygulama Sonrası Zamana Bağlı Migrasyon Oranları



Hücre migrasyon oranları ortalama $\pm$ SEM' dir, n=4.

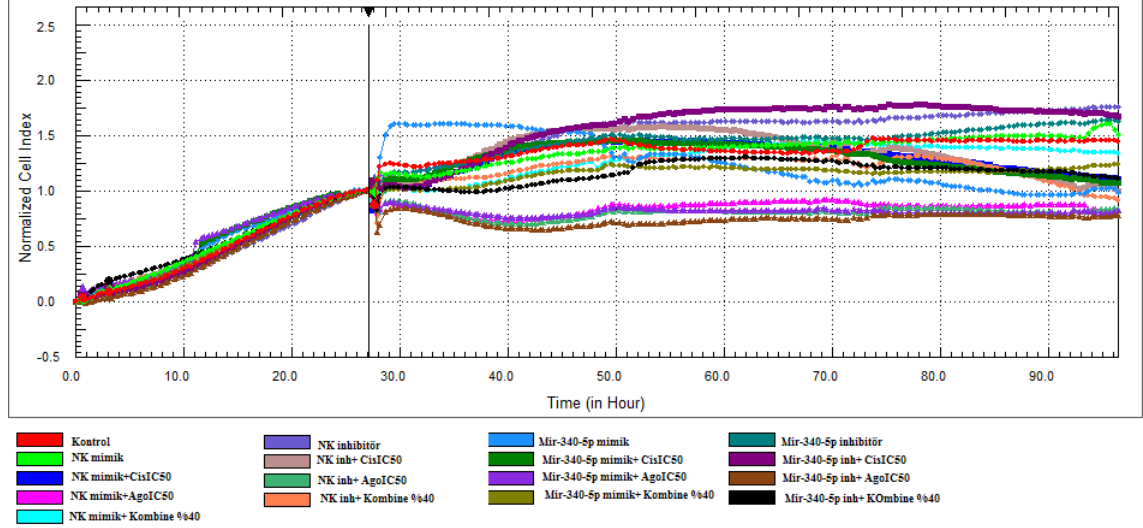
Şekil 4.17’de % SKOV-3 hücre migrasyon oranları verilmiştir. Bu sonuçlara göre, 24 saat agomelatin IC₅₀ (% 46.2) (p<0.05) uygulaması sonrasında kontrol hücrelerine kıyasla anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Bu oran 48 saat sonra % 42.6, 72 saat sonra % 42.1 ve 96 saat sonra ise % 47.4 olarak bulunmuştur. Agomelatin IC₅₀ varlığında hücre göç oranı zamana bağlı olarak bir değişim göstermemiştir (Şekil 4.17). Sisplatin IC₅₀ ile muamele edilen hücre gruplarındaki 24 saatlik hücre migrasyon oranı % 63.3 olarak bulunmuştur. Migrasyon oranında bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak, 48 saat inkübasyon sonrasında sisplatin IC₅₀ uygulanan hücrelerde migrasyon oranı % 46.2 (p<0.01) iken, daha uzun inkübasyon sürelerinde bu oran % 31’e (96 saat) (Şekil 4.17d) kadar düşüş göstermektedir. % 40 kombine ilaç uygulanan hücre grubunda 24 sonra hücre migrasyon oranı % 63.1 olarak bulunmuştur. Bu oran kontrol hücre grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak, % 40 kombine ilaç uygulamasının 48 saat inkübasyonu sonrasında hücre migrasyon oranı % 56.8, 72 saatte % 53 ve 96 saat sonrasında ise % 50.2 olarak tespit edilmiştir ve bu oran kontrol hücre grubuna göre anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.17). Sisplatin IC₅₀ ve % 40 kombine ilaç varlığında hücre göç oranında zamana bağlı olarak değişim göstermektedir. SKOV-3 hücre migrasyonu üzerine en etkili uygulamanın sisplatin IC₅₀ dozunun 96 saatlik inkübasyonu olduğu görülmektedir.

4.9 miR-340-5p ayrı ayrı ya da Agomelatin, Sisplatin ve Kombine İlaç Uygulamaları Sonrasında Hücre Migrasyonu Üzerine Etkileri

SKOV-3 hücrelerinin, plakalara ekimi yapıldıktan sonra, miR-340-5p mimik, miR-340-5p inhibitör ve negatif kontrollerinin transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonrasında agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ veya kombine % 40 ilaç dozları her kuyucuğa eklendikten sonra hücreler 72 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. RTCA cihazında her 15 dakikada bir ölçüm alınmıştır. Deneyin analiz sonuçları, ilaçların eklendiği süreye göre normalize edilerek CI değerleri hesaplanmıştır. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Kontrol grubu % 100 kabul edilerek 24, 48 ve 72 saatlerine göre alınmış CI değerlerinden hücre migrasyon oranları hesaplanmıştır. Sonuçlar, 2 bağımsız deney şeklinde her deneyde 2 kuyunun ortalaması alınarak verilmiştir. RTCA cihazından alınan normalize CI’e karşı zaman grafiği Şekil 4.18 ve % migrasyonu sonuçları ise Şekil 4.19-21’de verilmiştir.

Şekil 4.18

SKOV-3 Hücrelerinin CIM Platelere miR-340-5p Mimik, miR-340-5p İnhibitör ve Negatif Kontrollerinin Transfeksiyonu Sonrasında Agomelatin IC₅₀, Siplatin IC₅₀ ve Kombine % 40 Uygulamasının Hücre Migrasyonu Üzerine Etkisi

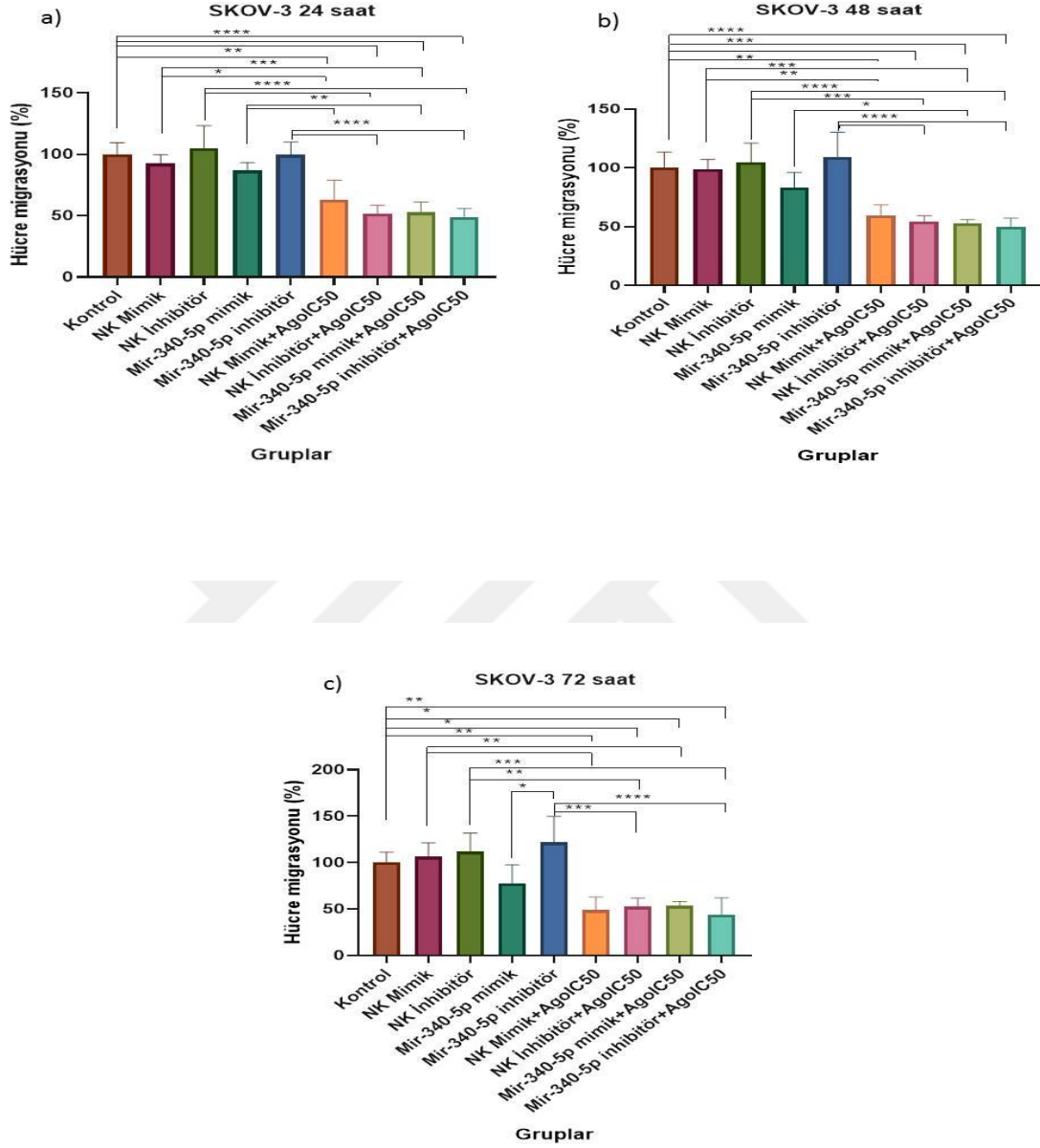


Deneyler iki bağımsız tekrar, her deneyde n=2 yapılmıştır, temsili olarak bir tekrar alınmıştır.

miR-340-5p ile SKOV-3 hücrelerinin transfeksiyonu sonrasında belirlenen migrasyon oranları, agomelatin IC₅₀ ilaç uygulamaları sonrasında belirlenen migrasyon oranları ile zamana bağlı bir şekilde karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.19'da gösterilmiştir.

Şekil 4.19

SKOV-3 Hücrelerine miR-340-5p ve Agomelatin IC₅₀ Uygulamasının Hücre Migrasyonu Üzerine Etkisi



Hücre migrasyon oranları ortalama±SEM' dir, n=4.

Elde edilen sonuçlar, miR-340-5p'nin ekspresyonunun arttırılması ya da baskılanmasının SKOV-3 hücre migrasyonu üzerine etkisini zamana bağlı değişim olduğunu göstermektedir. Hücrelerin miR-340-5p mimik ile 24 saat transfeksiyonu sonrasında migrasyon oranı % 86.6 (Şekil 4.19a), 48 saatte % 82.7 (Şekil 4.19b) ve 72 saatte de % 77.7 (Şekil 4.19c) olarak belirlenmiştir. Hücrelerin miR-340-5p inhibitör ile

24 saatte transfeksiyonu sonrasında ise migrasyon oranları % 99.5 (Şekil 4.19a), 48 saatte % 109 (Şekil 4.19b) ve 72 saatte ise % 121.9 (Şekil 4.20c) olarak zaman bağılı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. Özellikle 72 saatte miR-340-5p mimik uygulaması miR-340-5p inhibitör uygulamasına kıyasla hücre migrasyon oranlarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde baskılamıştır ($p<0.05$). SKOV-3 hücre migrasyon oranı miR-340-5p aşırı ekspresyonu sonrasında inhibisyona uğradığı tespit edilmiştir (Şekil 4.19c).

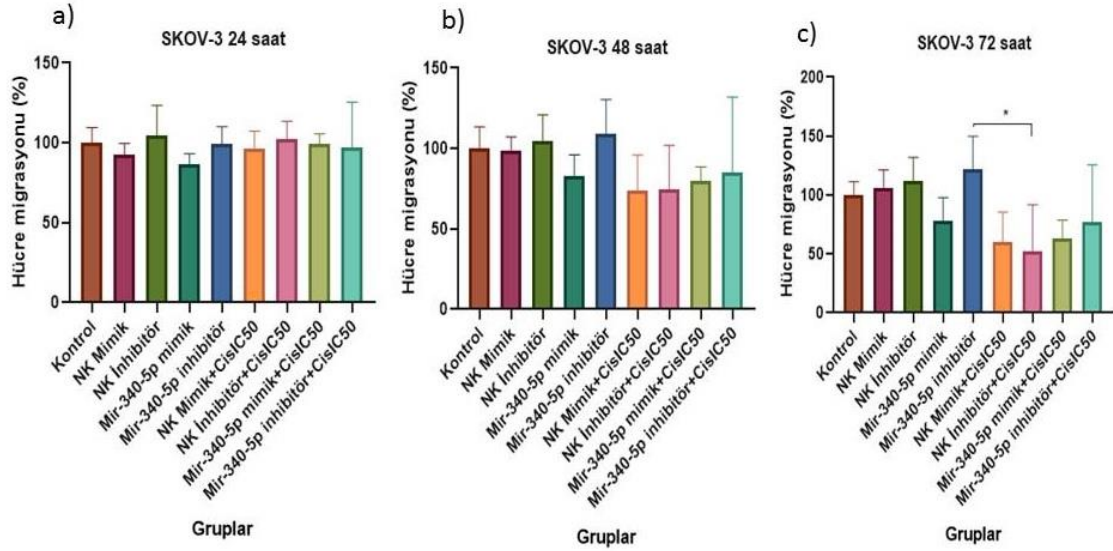
Hücrelerin miR-340-5p mimik ile transfeksiyonu sonrasında, hücre ortamına agomelatin IC₅₀ ilavesi sonrasında ise 24 saat sonra migrasyon oranı % 52.7, 48 saatte % 52.5 ve 72 saatte ise % 53.3 olarak belirlenmiştir. Bu oran yalnızca mimik uygulaması ve negatif kontrol mimik uygulamasına göre oldukça düşük bir orandır. miR-340-5p inhibitör ile transfeksiyon sonrasında hücre ortamına agomelatin IC₅₀ ilavesi sonrasında 24 saatte migrasyon oranı % 48.6, 48 saatte % 50 ve 72 saatte ise % 43.5 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.19). Negatif kontrol mimik ve inhibitör transfeksiyonu sonrasında migrasyon oranları mimik ve inhibitör uygulamalarına benzer etkiyi göstermektedir. Bu nedenle miR-340-5p mimik ya da inhibitör uygulaması agomelatin ilavesi sonrasında SKOV-3 hücre migrasyonu üzerine spesifik bir inhibisyon etkisi göstermediği görülmektedir.

Negatif kontrol mimik transfeksiyonu sonrasında 24 saatteki hücre migrasyon oranı % 92.4, 48 saatte % 98.8 ve 72 saatte de % 106 olarak belirlenmiştir. Hücre ortamına agomelatin IC₅₀ eklenmesiyle bu oranlar sırasıyla % 62.9, % 59.3 ve % 48.7 olarak belirlenmiştir. Negatif kontrol inhibitör transfeksiyonu sonrasında 24 saatteki migrasyon oranı % 104.6 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.19a). İnkübasyon süresinin uzatılmasıyla migrasyon oranları, 48 saatte % 104.4 ve 72 saatte ise % 111.7 olarak tespit edilmiştir. Hücre ortamına agomelatin IC₅₀ eklenmesiyle birlikte bu oranlar sırasıyla % 51.4, % 54.6 ve % 52.6 olarak belirlenmiştir. Hücrelerin miR-340-5p transfeksiyonu ve agomelatin IC₅₀ uygulaması sonrasında tespit edilen % migrasyonlarında farklılık olduğu görülmektedir.

miR-340-5p ile SKOV-3 hücrelerini transfeksiyonu sonrasında belirlenen migrasyon oranları cisplatin IC₅₀ ilaç uygulamaları sonrasında belirlenen migrasyon oranları ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.20'de gösterilmiştir.

Şekil 4.20

SKOV-3 Hücrelerine miR-340-5p ve Sisplatin IC₅₀ Uygulamasının Hücre Migrasyonu Üzerine Etkisi



Hücre migrasyon oranları ortalama $\pm$ SEM' dir, n=4.

Hücrelerin miR-340-5p ile transfeksiyonu sonrasında ise hücre migrasyon oranlarında kontrol hücrelerine ve negatif kontrol grubuna göre bir değişim olmadığı görülmektedir (Şekil 4.20).

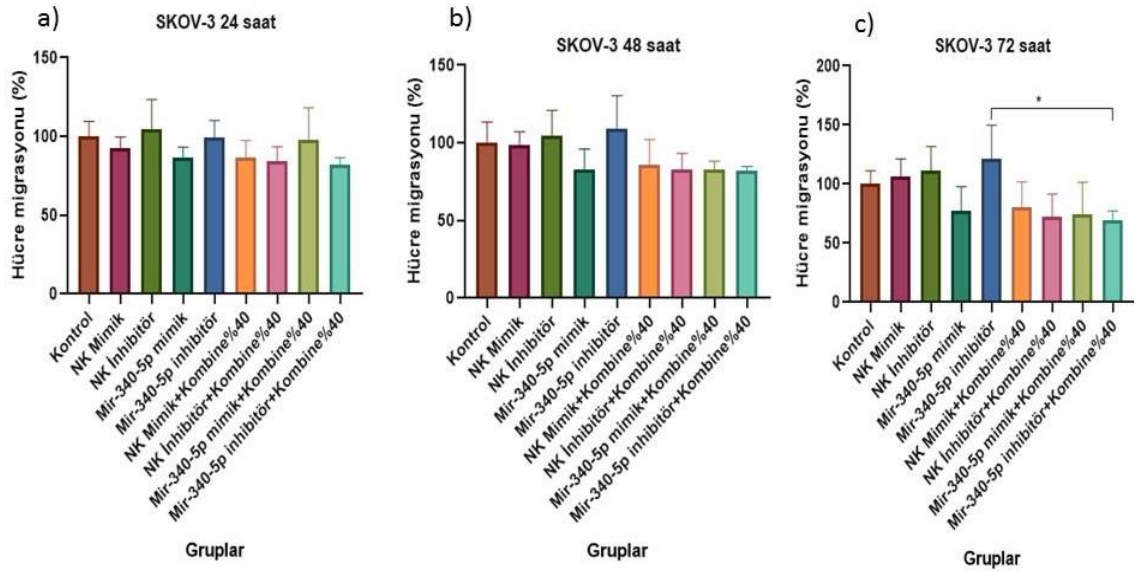
Hücrelerin miR-340-5p mimik ile 24 saat transfeksiyonu sonrasında migrasyon oranı % 86.8 olarak belirlenmiş olup, hücre ortamına, sisplatin IC₅₀ muamelesi sonrasında % 99 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.20a). İnkübasyon süresinin 48 saate uzatılması ile migrasyon oranları sırasıyla % 82.7 ve % 79.6 (Şekil 4.20b), 72 saatte uzatılmasıyla % 77.7 ve % 63.4 (Şekil 4.20c) olarak görülmektedir. Hücrelerin miR-340-5p inhibitör ile transfeksiyonu sonrasında 24 saatteki migrasyon oranı % 99.5 olarak belirlenmiş olup, ortama sisplatin IC₅₀ muamelesi ile hücre migrasyon oranı % 96.9 olarak bulunmuştur. 48 saatlik inkübasyon süresinde ise sırasıyla % 109 ve % 85.4, 72 saatte ise % 121.9 ve % 77.2 olarak belirlenmiştir. Hücrelerin migrasyon oranlarında düşüş olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Negatif kontrol mimik ve inhibitör transfeksiyonu sonrasında migrasyon oranları mimik ve inhibitör uygulamalarına kıyasla farklılık göstermemiştir. Ancak negatif kontrol inhibitör transfeksiyonu ve sisplatin IC₅₀ uygulaması sonrasında tespit edilen % migrasyonu (% 52.2) ile miR-340-5p inhibitör etkisi (% 121.9) karşılaştırıldığında farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). miR-340-5p transfeksiyonu ve sisplatin IC₅₀ uygulamasının

SKOV-3 hücre migrasyonu üzerine spesifik inhibisyon etkisine sahip olmadığı görülmektedir.

miR-340-5p ile SKOV-3 hücrelerini transfeksiyonu sonrasında belirlenen migrasyon oranları % 40 kombine ilaç uygulamaları sonrasında belirlenen migrasyon oranları ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.21’de gösterilmiştir.

Şekil 4.21

SKOV-3 Hücrelerine miR-340-5p ve Kombine % 40 Uygulamasının Hücre Migrasyonu Üzerine Etkisi



Hücre migrasyon oranları ortalama $\pm$ SEM’ dir, n=4.

Hücrelerin miR-340-5p mimik ile 24 saat transfeksiyonu sonrasında migrasyon oranı % 86.8 olarak belirlenmiş olup, hücre ortamı % 40 kombine ilaç muamele sonrasında % 97.7 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.21a). 48 saatlik inkübasyon süresinde migrasyon oranları sırasıyla % 82.7 ve % 82.5 (Şekil 4.21b), 72 saatlik inkübasyon süresinde ise % 77.7 ve % 74 (Şekil 4.21c) olarak görülmektedir. miR-340-5p inhibitör ile 24 saat transfeksiyonu sonrasında migrasyon oranı % 99.5 belirlenmiş olup, ortama eklenen % 40 kombine ilaç muamelesi sonrası migrasyon oranı ise % 82.2 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.21a). İnkübasyon süresinin 48 saate uzatılmasıyla migrasyon oranları sırasıyla % 109 ve % 82.3 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.21b). Migrasyon oranlarında düşüş olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak, 72 saat inkübasyon sonrasında miR-340-5p inhibitör transfekte hücrelerin migrasyon oranları (% 121.9) ile transfekte hücrelere % 40 kombine eklenmesi ile migrasyon oranlarındaki (% 69.2) düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.21c) ($p<0.05$). Bu etkinin % 40

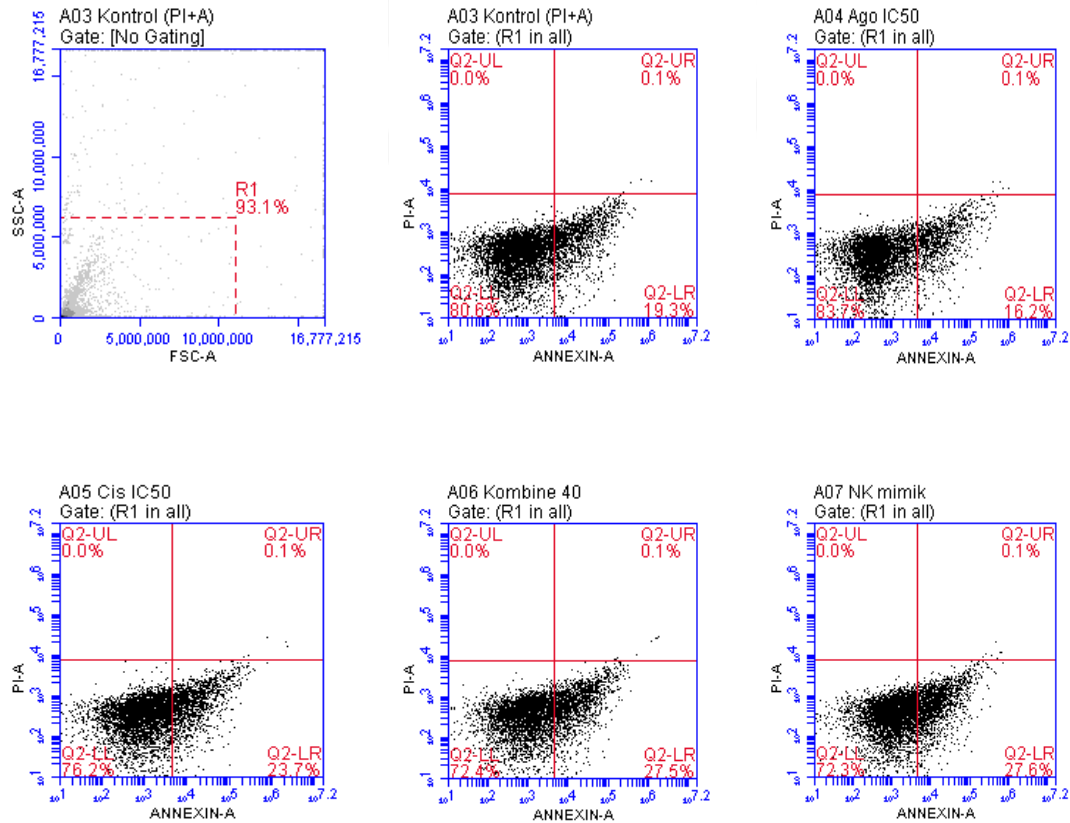
kombine ilaç etkisinden çok agomelatinin etkisinden olduğu görülmektedir. Negatif kontrol mimik ve inhibitör transfeksiyonu sonrasında migrasyon oranları mimik ya da inhibitör uygulamalarına kıyasla farklılık göstermemiştir. miR-340-5p transfeksiyonu ve % 40 kombine ilaç uygulamasının SKOV-3 hücre migrasyonu üzerine spesifik inhibisyon etkisine sahip olmadığı görülmektedir.

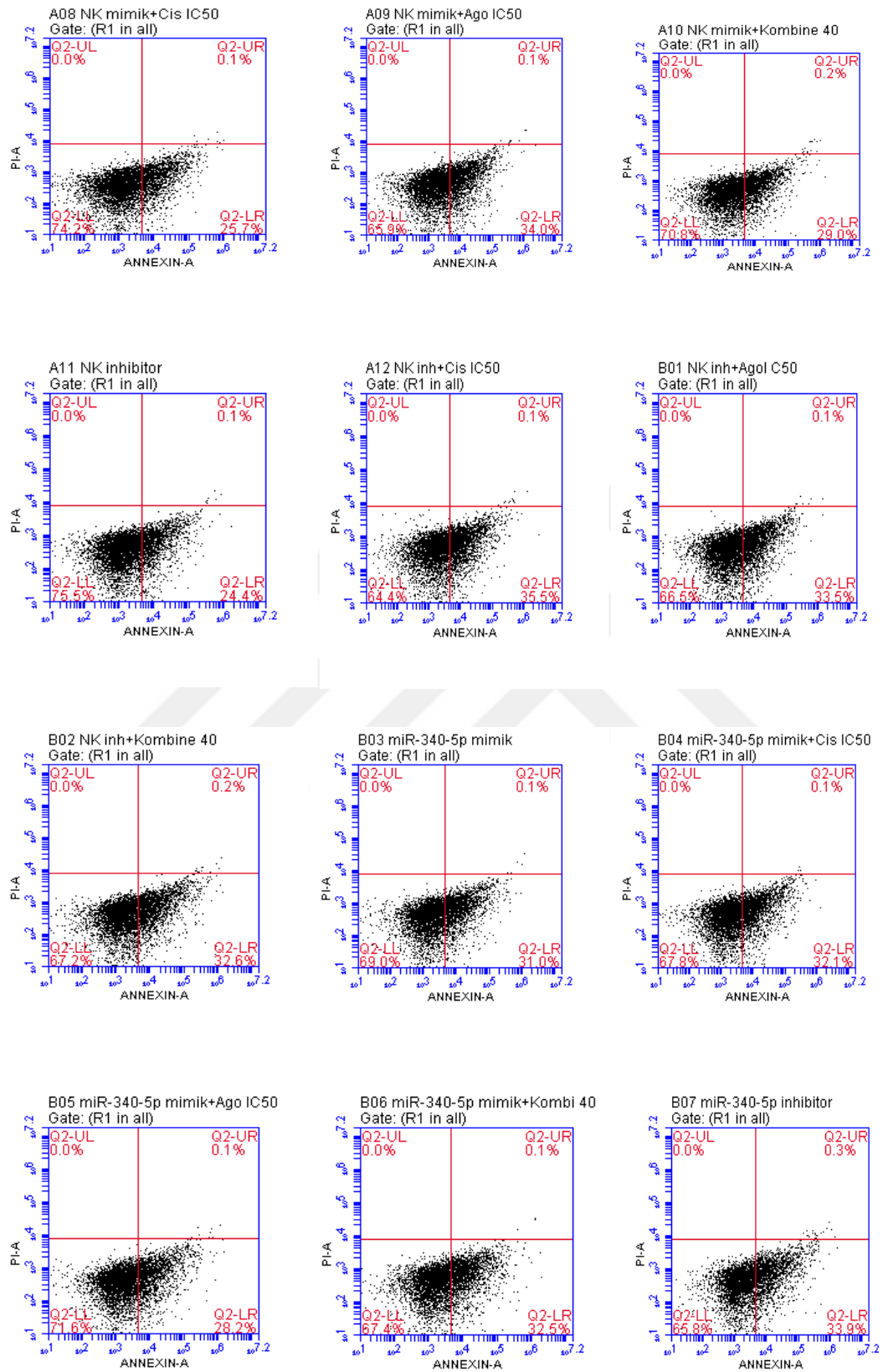
4.10 Apoptoz Düzeylerinin Akım Sitometrisi ile Belirlenmesi

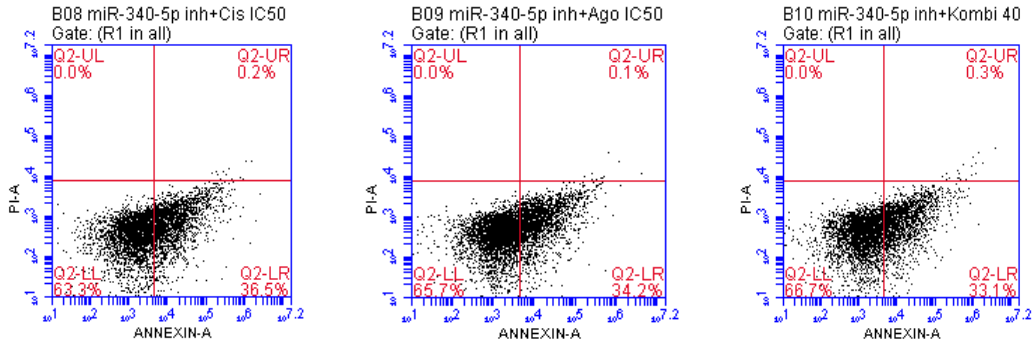
SKOV-3 ovaryum kanseri hücre gruplarındaki erken apoptoz düzeyleri, yapılan miR-340-5p mimik, miR-340-5p inhibitör ve negatif kontrollerinin transfeksiyonu ve agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve kombine % 40 ilaç uygulamaları sonrasında 24 ve 48 saat sonra FITC Anneksin-V apoptoz belirleme kiti (BD) aracılığıyla saptanmıştır (Şekil 4.22-23).

Şekil 4.22

SKOV-3 Hücrelerinde 24 Saatlik Apoptoz Düzeylerinin Akım Sitometri Cihazıyla Belirlenmesi







(LL:Canlılık, LR:Erken Apoptoz, UR:Geç Apoptoz, UL:Nekroz)

SKOV-3 ovaryum kanseri hücre hatlarında yapılan 24 saatlik inkübasyon sonrasında erken apoptoz düzeyleri Şekil 4.22’de verildiği gibi kontrol hücre grubuyla kıyaslandığında sisplatin IC₅₀ ilaç ilave edilen hücre gruplarında erken apoptoz hücre oranının daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.3

SKOV-3 Hücrelerinde miR-340-5p Transfeksiyonu Sonrasında Agomelatin IC₅₀, Sisplatin IC₅₀ ve Kombine %40 Uygulaması Sonrası 24 Saatlik Erken ve Geç Apoptoz % Oranları

Gruplar	Canlılık (%)	Erken Apoptoz (%)	Geç Apoptoz (%)
Kontrol	80.6	19.3	0.1
Ago IC ₅₀	83.6	16.2	0.1
Cis IC ₅₀	76.2	23.7	0.1
Kombine % 40	72.4	27.5	0.1
NK mimik	72.3	27.6	0.1
NK mimik+ Cis IC ₅₀	74.2	25.7	0.1
NK mimik+ Ago IC ₅₀	65.9	34	0.1
NK mimik+ Kombine %40	70.8	29	0.2
NK inhibitör	75.5	24.4	0.1
NK inh+ Cis IC ₅₀	64.4	35.5	0.1
NK inh+ Ago IC ₅₀	66.5	33.5	0.1
NK inh+ Kombine %40	67.2	32.6	0.2
miR-340-5p mimik	69	31	0.1
miR-340-5p mimik+Cis IC ₅₀	67.8	32.1	0.1
miR-340-5p mimik+ Ago IC ₅₀	71.6	28.2	0.1
miR-340-5p mimik+Kombine %40	67.4	32.5	0.1
miR-340-5p inhibitör	65.8	33.9	0.3
miR-340-5p inh+Cis IC ₅₀	63.3	36.5	0.2
miR-340-5p inh+Ago IC ₅₀	65.7	34.2	0.1
miR-340-5p inh+ Kombine %40	66.7	33.1	0.3

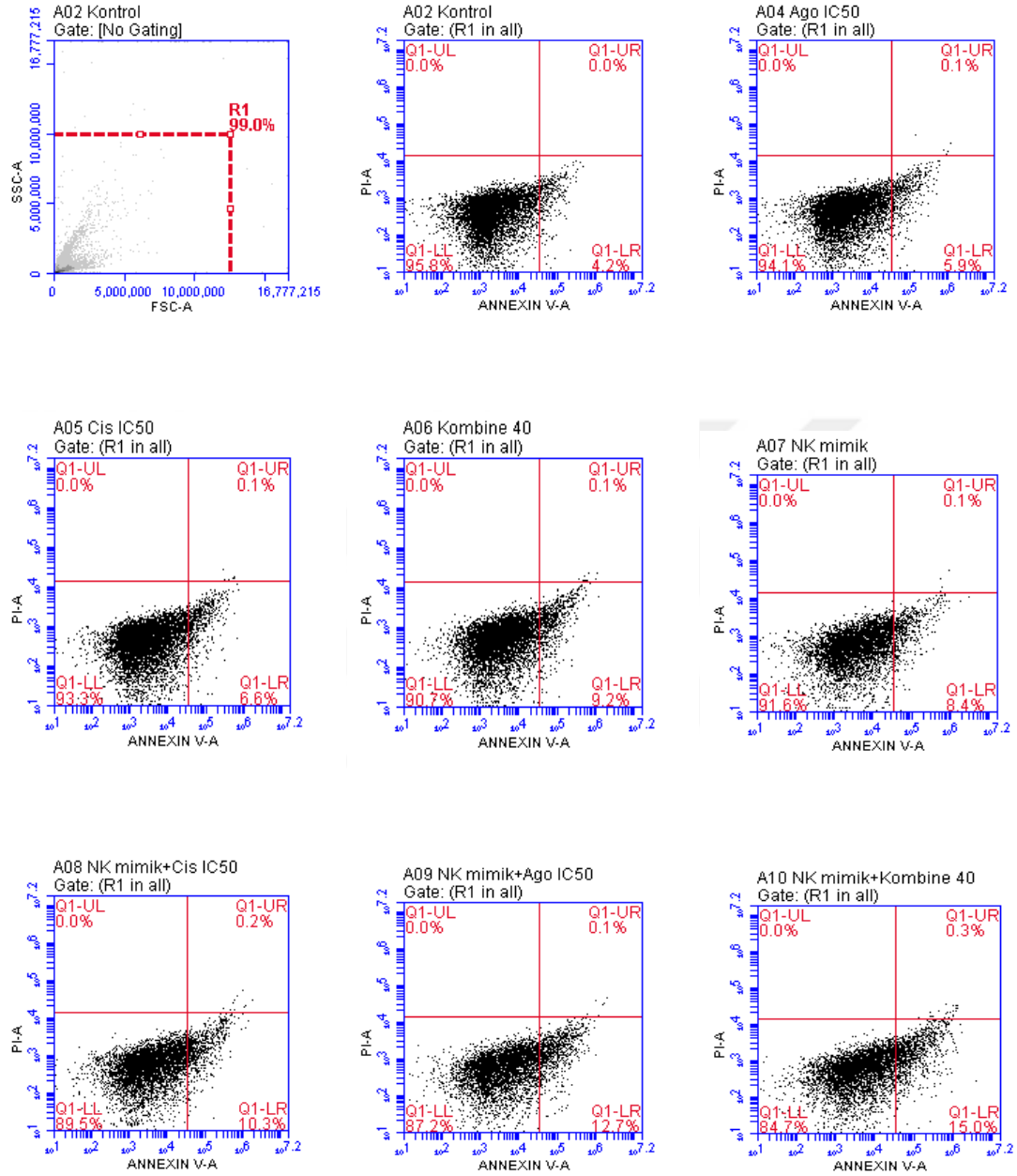
Şekil 4.22 ve Tablo 4.3’de görüldüğü üzere, SKOV-3 hücrelerindeki 24 saat inkübasyon sonrasındaki erken apoptoz % oranlarında, kontrol hücre grubuna kıyasla diğer hücre

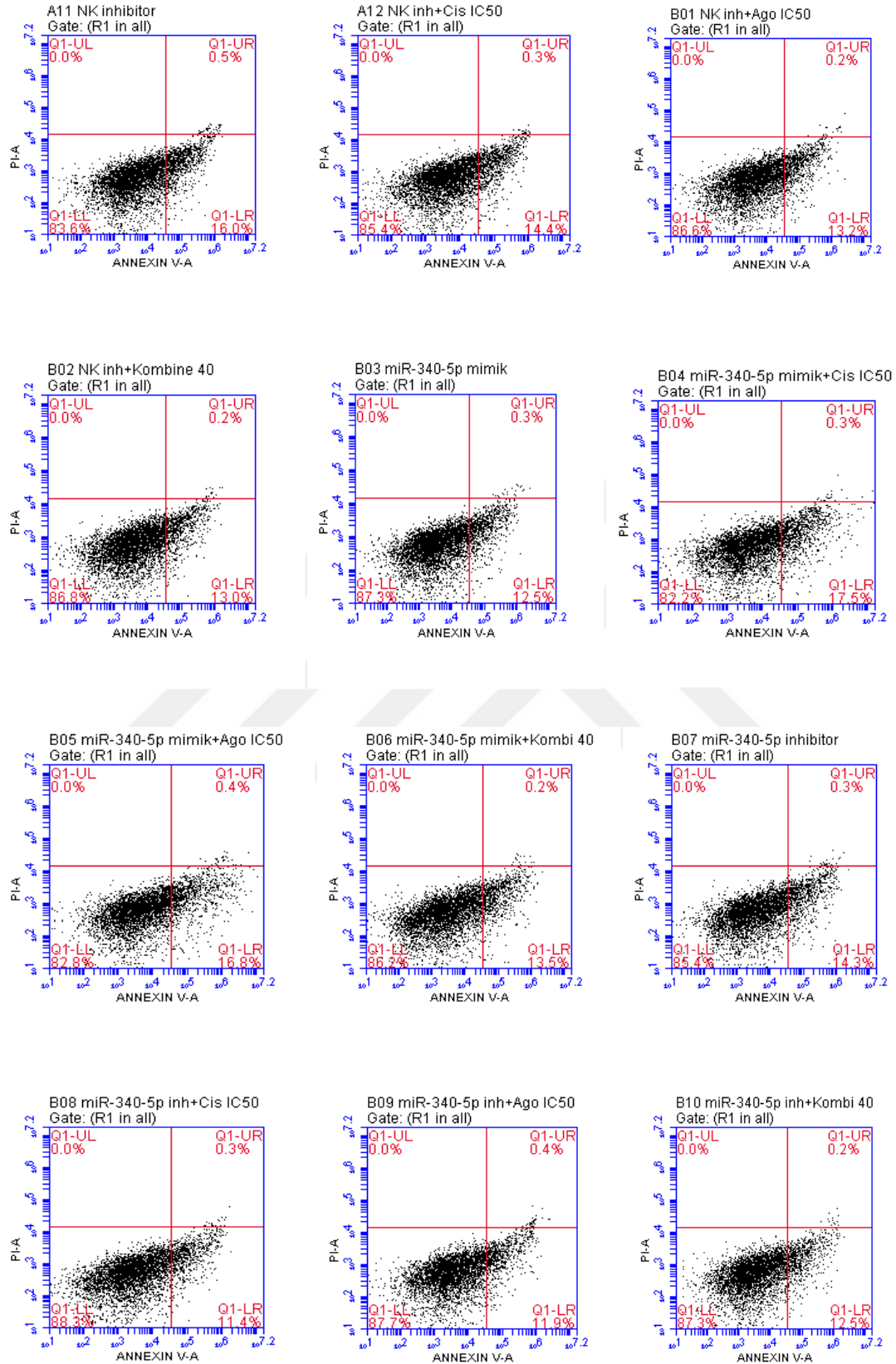
gruplarında erken apoptoz hücre oranları karşılaştırılmıştır. Agomelatin IC₅₀ (% 16.2), sisplatin IC₅₀ (%23.7) ve kombine % 40 (% 27.5) ilaç grubu eklenen hücreler, kontrol hücre grubuna (% 19.3) göre karşılaştırılığında en yüksek erken apoptoz % oranını, kombine % 40 hücre grubunda (% 27.5) olduğu görülmektedir. miR-340-5p mimik transfeksiyonu sonrası erken apoptoz % 31 iken agomelatin IC₅₀ eklenmesiyle bu oran % 28.2, sisplatin IC₅₀ eklenmesiyle % 32.1 ve kombine % 40 ilaç grubunun eklenmesiyle de % 32.5 olarak bulunmuştur. NK mimik transfer edilen hücre grubunda ise erken apoptoz oranı % 27.6, agomelatin IC₅₀ eklenmesiyle % 34, sisplatin IC₅₀ eklenmesiyle % 25.7 ve kombine % 40 ilaç grubunun eklenmesiyle de % 29 olarak bulunmuştur. miR-340-5p mimik transfeksiyon grubunun (% 31), NK mimik (% 27.6) ve kontrol (% 19.3) hücre gruplarına göre daha fazla erken apoptoz oluşturduğu görülmektedir. miR-340-5p inhibitör hücre grunda ise erken apoptoz oranı % 33.9 iken agomelatin IC₅₀ eklenmesiyle % 34.2, sisplatin IC₅₀ eklenmesiyle % 36.5 ve kombine % 40 ilaç grubu eklenmesiyle % 33.1 olarak bulunmuştur. NK inhibitör transfer edilen hücre grubunda erken apoptoz oranı % 24.4 , agomelatin IC₅₀ eklenmesiyle % 33.5, sisplatin IC₅₀ eklenmesiyle % 35.5, kombine % 40 ilaç grubunun eklenmesiyle de % 32.6 olarak bulunmuştur. miR-340-5p inhibitör transfeksiyon grubunun (% 33.9), NK inhibitör (% 24.4) ve kontrol (% 19.3) hücre gruplarına göre daha fazla erken apoptoz oluşturduğu görülmektedir. miR-340-5p mimik (% 31) ve miR-340-5p inhibitör (% 33.9) hücre grupları karşılaştırıldığında ise inhibitör hücre grubunun daha fazla erken apoptoz meydana getirdiği görülmektedir. miR-340-5p mimik+Ago IC₅₀ (% 28.2), miR-340-5p inhibitör+Ago IC₅₀ (% 34.2), miR-340-5p mimik+Cis IC₅₀ (% 32.1), miR-340-5p inhibitör+Cis IC₅₀ (% 34.2), miR-340-5p mimik+Kombine % 40 (% 32.5), miR-340-5p inhibitör+Kombine % 40 (% 33.1) hücre grupları karşılaştırıldığında ise miR-340-5p inhibitör hücre gruplarına agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve kombine % 40 eklenen hücre gruplarının miR-340-5p mimik hücre gruplarına agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve kombine % 40 eklenen hücre gruplarına kıyasla daha fazla erken apoptoz meydana geldiği görülmektedir.

miR-340-5p mimik, miR-340-5p inhibitör ve negatif kontrollerin transfeksiyonu sonrasında ilave edilen agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve kombine % 40 hücre gruplarında, transfeksiyon yapılmayan hücre gruplarına kıyasla erken apoptoz oranları daha fazla olduğu görülmektedir. Agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve kombine % 40 hücre gruplarının eklenmesiyle erken apoptoz % oranları da artmaktadır.

Şekil 4.23

SKOV-3 Hücrelerinde 48 Saatlik Apoptoz Düzeylerinin Akım Sitometri Cihazıyla Belirlenmesi





(LL:Canlılık, LR:Erken Apoptoz, UR:Geç Apoptoz, UL:Nekroz)

SKOV-3 ovaryum kanseri hücre hatlarında 48 saat inkübasyon sonrasında yapılan erken apoptoz düzeyleri Şekil 4.23’ de verildiği gibi agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀, kombine % 40 hücre grupları kontrol grubuyla kıyaslandığında, kombine % 40 ilaç ilave edilen hücre grubunda erken apoptoz oranının agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ilaç ilave edilen hücre grubuna göre daha fazla erken apoptoza gittiği gözlenmiştir. Şekil 4.22’de verildiği gibi 24 saat inkübasyon sonrasında yapılan erken apoptoz düzeyleri Şekil 4.23’de verilen 48 saat inkübasyon sonrasında yapılan erken apoptoz düzeyleri karşılaştırıldığında tüm hücre gruplarında zamana bağlı olarak azalma görülmektedir. 24 saat inkübasyon süresinde en yüksek erken apoptoz % miktarı miR-340-5p inhibitör+ CisIC₅₀ (% 36.5) iken 48 saatte bu oran % 11.4 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.4

SKOV-3 Hücrelerinde miR-340-5p Transfeksiyonu Sonrasında Agomelatin IC₅₀, Sisplatin IC₅₀ ve Kombine %40 Uygulaması Sonrası 48 Saatlik Erken ve Geç Apoptoz % Oranları

Gruplar	Canlılık (%)	Erken Apoptoz (%)	Geç Apoptoz (%)
Kontrol	95.8	4.2	0
Ago IC ₅₀	94.1	5.9	0.1
Cis IC ₅₀	93.3	6.6	0.1
Kombine % 40	90.7	9.2	0.1
NK mimik	91.6	8.4	0.1
NK mimik+ Cis IC ₅₀	89.5	10.3	0.2
NK mimik+ Ago IC ₅₀	87.2	12.7	0.1
NK mimik+ Kombine %40	84.7	15	0.3
NK inhibitör	83.6	16	0.5
NK inh+ Cis IC ₅₀	85.4	14.4	0.3
NK inh+ Ago IC ₅₀	86.6	13.2	0.2
NK inh+ Kombine %40	86.8	13	0.2
miR-340-5p mimik	87.3	12.5	0.3
miR-340-5p mimik+Cis IC ₅₀	82.2	17.5	0.3
miR-340-5p mimik+ Ago IC ₅₀	82.8	16.8	0.4
miR-340-5p mimik+Kombine %40	86.2	13.5	0.2
miR-340-5p inhibitör	85.4	14.3	0.3
miR-340-5p inh+Cis IC ₅₀	88.3	11.4	0.3
miR-340-5p inh+Ago IC ₅₀	87.7	11.9	0.4
miR-340-5p inh+ Kombine %40	87.3	12.5	0.2

Şekil 4.23 ve Tablo 4.4’de görüldüğü üzere, SKOV-3 hücrelerindeki 48 saat inkübasyon sonrasındaki erken apoptoz % oranlarında, kontrol hücre grubuna kıyasla diğer hücre gruplarında erken apoptoz hücre oranları karşılaştırılmıştır. Agomelatin IC₅₀ (% 5.9), sisplatin IC₅₀ (% 6.6) ve kombine % 40 (% 9.2) ilaç grubu eklenen hücreler, kontrol hücre grubuna (% 4.2) göre karşılaştırılığında en yüksek erken apoptoz % oranının, kombine % 40 hücre grubunda (% 9.2) olduğu görülmektedir. miR-340-5p mimik

transfeksiyonu sonrası erken apoptoz % 12.5 iken, agomelatin IC₅₀ eklenmesiyle bu oran % 16.8, sisplatin IC₅₀ eklenmesiyle % 17.5 ve kombine % 40 ilaç grubunun eklenmesiyle de % 13.5 olarak bulunmuştur. NK mimik transfer edilen hücre grubunda ise erken apoptoz oranı % 8.4, agomelatin IC₅₀ eklenmesiyle % 12.7, sisplatin IC₅₀ eklenmesiyle % 10.3 ve kombine % 40 ilaç grubunun eklenmesiyle de % 15 olarak bulunmuştur. miR-340-5p mimik transfeksiyon grubunun (% 12.5), NK mimik (% 8.4) ve kontrol (% 4.2) hücre gruplarına göre daha fazla erken apoptoz oluşturduğu görülmektedir. miR-340-5p inhibitör hücre grunda ise erken apoptoz oranı % 14.3 iken, agomelatin IC₅₀ eklenmesiyle % 11.9, sisplatin IC₅₀ eklenmesiyle % 11.4 ve kombine % 40 ilaç grubu eklenmesiyle % 12.5 olarak bulunmuştur. NK inhibitör transfer edilen hücre grubunda erken apoptoz oranı % 16, agomelatin IC₅₀ eklenmesiyle % 13.2, sisplatin IC₅₀ eklenmesiyle % 14.4, kombine % 40 ilaç grubunun eklenmesiyle de % 13 olarak bulunmuştur. miR-340-5p inhibitör transfeksiyon grubunun (% 14.3), NK inhibitör (% 16) ve kontrol (% 4.2) hücre gruplarına göre kıyaslandığında NK inhibitör hücre grubunda daha fazla erken apoptoz oluşturduğu görülmektedir. miR-340-5p mimik (% 12.5) ve miR-340-5p inhibitör (% 14.3) hücre grupları karşılaştırıldığında ise inhibitör hücre grubunun daha fazla erken apoptoz meydana getirdiği görülmektedir. miR-340-5p mimik+ Ago IC₅₀ (% 16.8), miR-340-5p inhibitör+ Ago IC₅₀ (% 11.9), miR-340-5p mimik+ Cis IC₅₀ (% 17.5), miR-340-5p inhibitör+ Cis IC₅₀ (% 11.4), miR-340-5p mimik+Kombine % 40 (% 13.5), miR-340-5p inhibitör+ Kombine % 40 (% 12.5) hücre grupları karşılaştırıldığında ise miR-340-5p mimik hücre gruplarına agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve kombine % 40 eklenen hücre gruplarının miR-340-5p inhibitör hücre gruplarına agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve kombine % 40 eklenen hücre gruplarına kıyasla daha fazla erken apoptoz meydana geldiği görülmektedir.

48 saat inkübasyon sonrasında, miR-340-5p mimik, miR-340-5p inhibitör ve negatif kontrollerin transfeksiyonu sonrasında ilave edilen agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve kombine % 40 hücre gruplarında, transfeksiyon yapılmayan hücre gruplarına kıyasla erken apoptoz oranları daha fazla olduğu görülmektedir. Agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve kombine % 40 hücre gruplarının eklenmesiyle erken apoptoz % oranları da artmaktadır.

Tablo 4.4’de verilen apoptoz yüzde oranlarında da görüldüğü gibi 48 saat inkübasyon süresi sonunda miR-340-5p mimik, miR-340-5p inhibitör ve negatif kontrollerinin

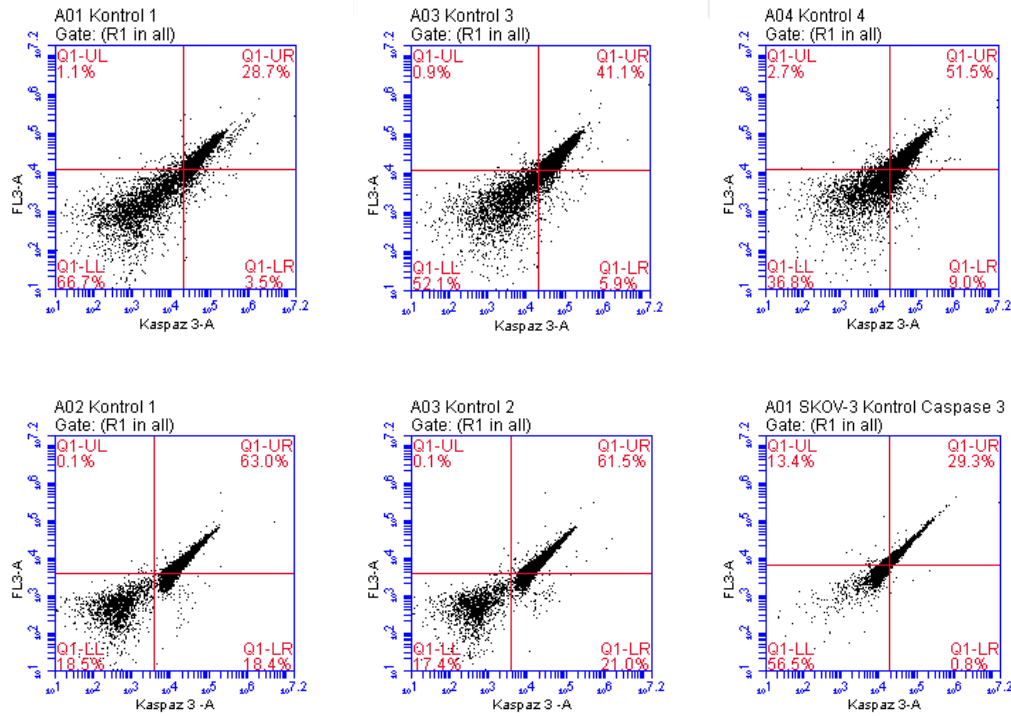
sonrasında ilave edilen agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve kombine % 40 ilaç grupları sonrası hücre gruplarındaki erken apoptoz oranları kontrol grubuna kıyasla en yüksek miR-340-5p mimik + Cis IC₅₀ (% 17.5) hücre grubunda gözlenmiştir. miR-340-5p mimik transfeksiyon edilen hücre gruplarında erken apoptoz miktarı, miR-340-5p inhibitör transfeksiyonu yapılan gruba kıyasla daha fazladır. Elde edilen verilerde, SKOV-3 ovaryum kanseri hücrelerine miR-340-5p mimik transfeksiyonu yapılması hücrelerin apoptoza gitmesini artırmaktadır. 24 ve 48 saatlik veriler karşılaştırıldığında ise 24 saatlik inkübasyon süresinde erken apoptoz oranlarının daha fazla olduğu görülmektedir.

4.11 Kaspaz-3 Aktivasyonunun Belirlenmesi

Kaspaz 3 aktivasyonunun değerlendirilmesinde FITC Aktif Kaspaz-3 apoptoz kiti (BD) kullanılarak saptanmıştır (Şekil 4.24).

Şekil 4.24

SKOV-3 Hücrelerinde Kaspaz 3 Aktivitelerinin Akım Sitometri Cihazıyla Belirlenmesi



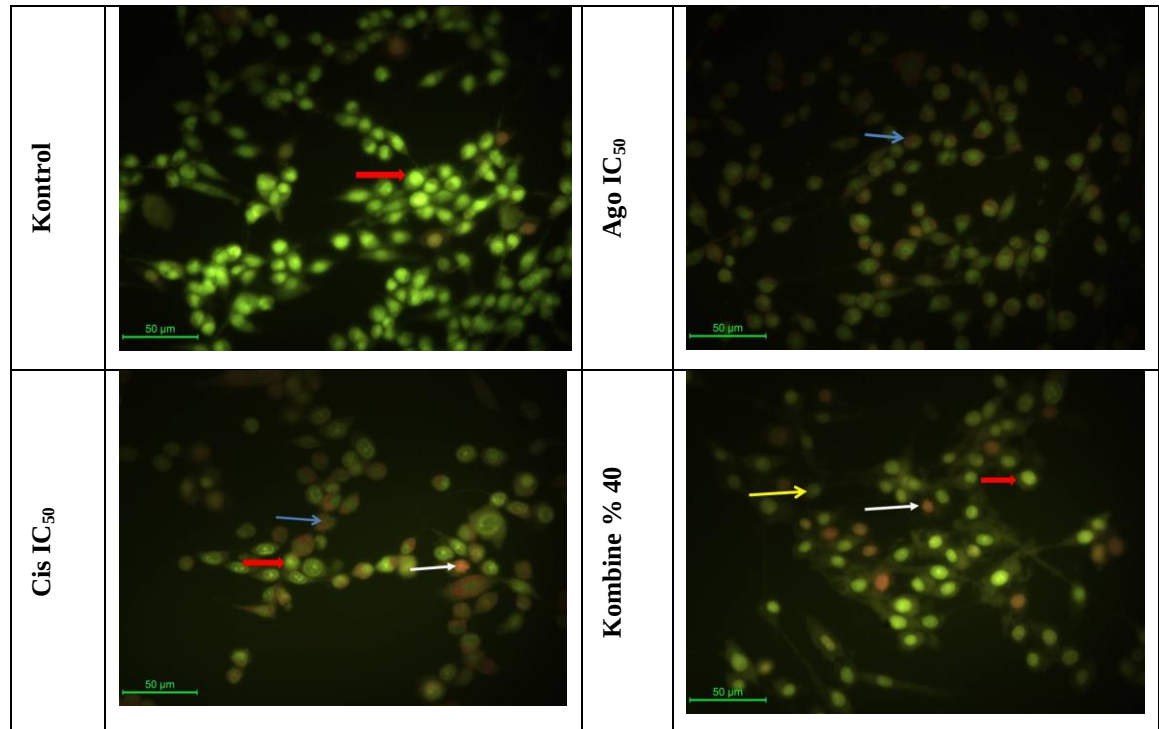
SKOV-3 ovaryum kanseri hücrelerinde, FITC Aktif Kaspaz-3 apoptoz kitiyle yapılan kontrol deneylerinde kontrol grubunun % canlılık oranlarının (LL) Şekil 4.24'de görüldüğü gibi çok düşük çıkması sebebiyle deneylere devam edilememiştir.

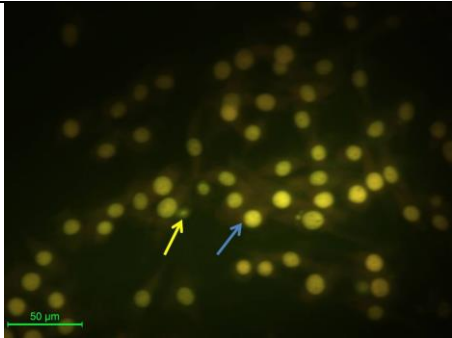
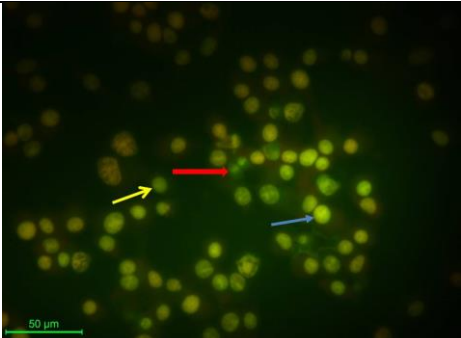
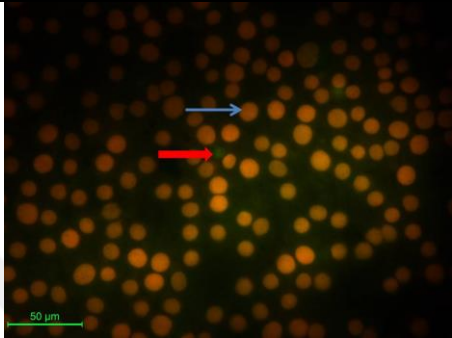
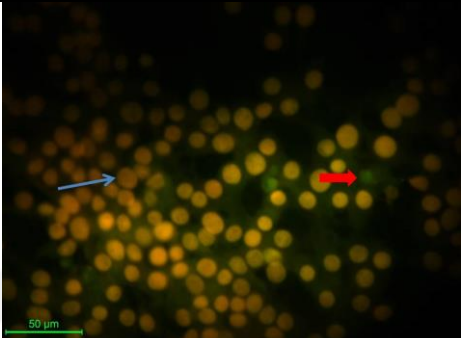
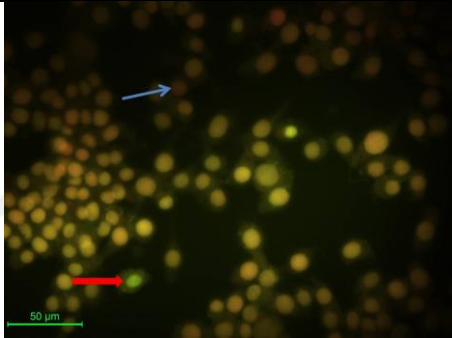
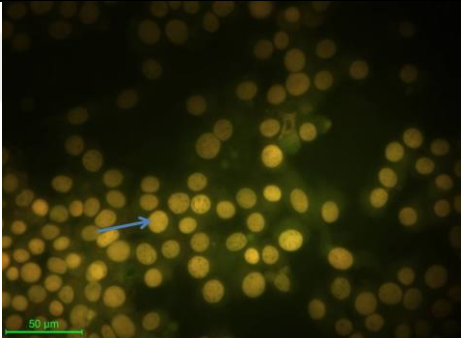
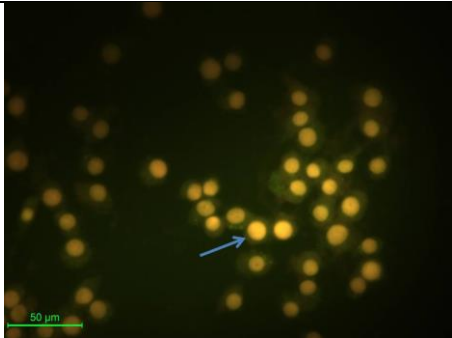
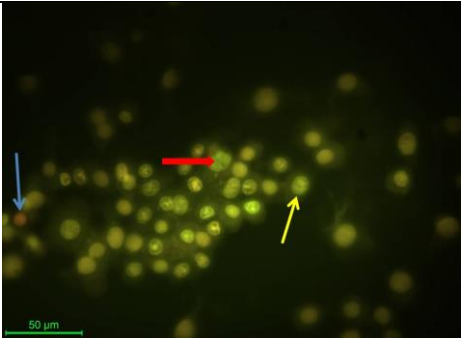
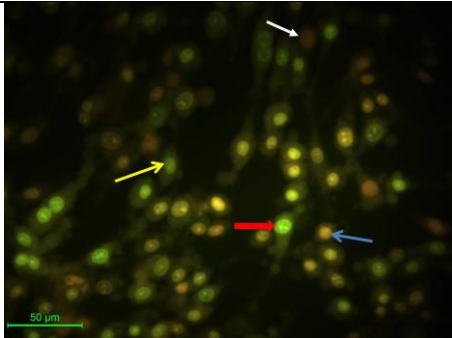
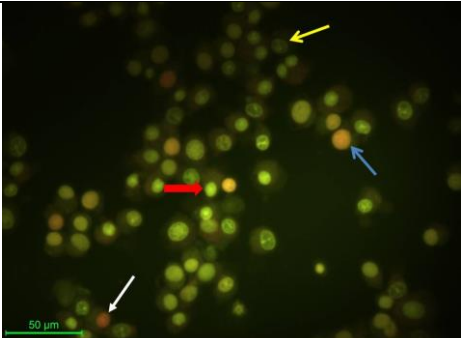
4.12 Akridin Oranj (AO) ve Etidyum Bromür (EB) Boyama ile Apoptozun Belirlenmesi

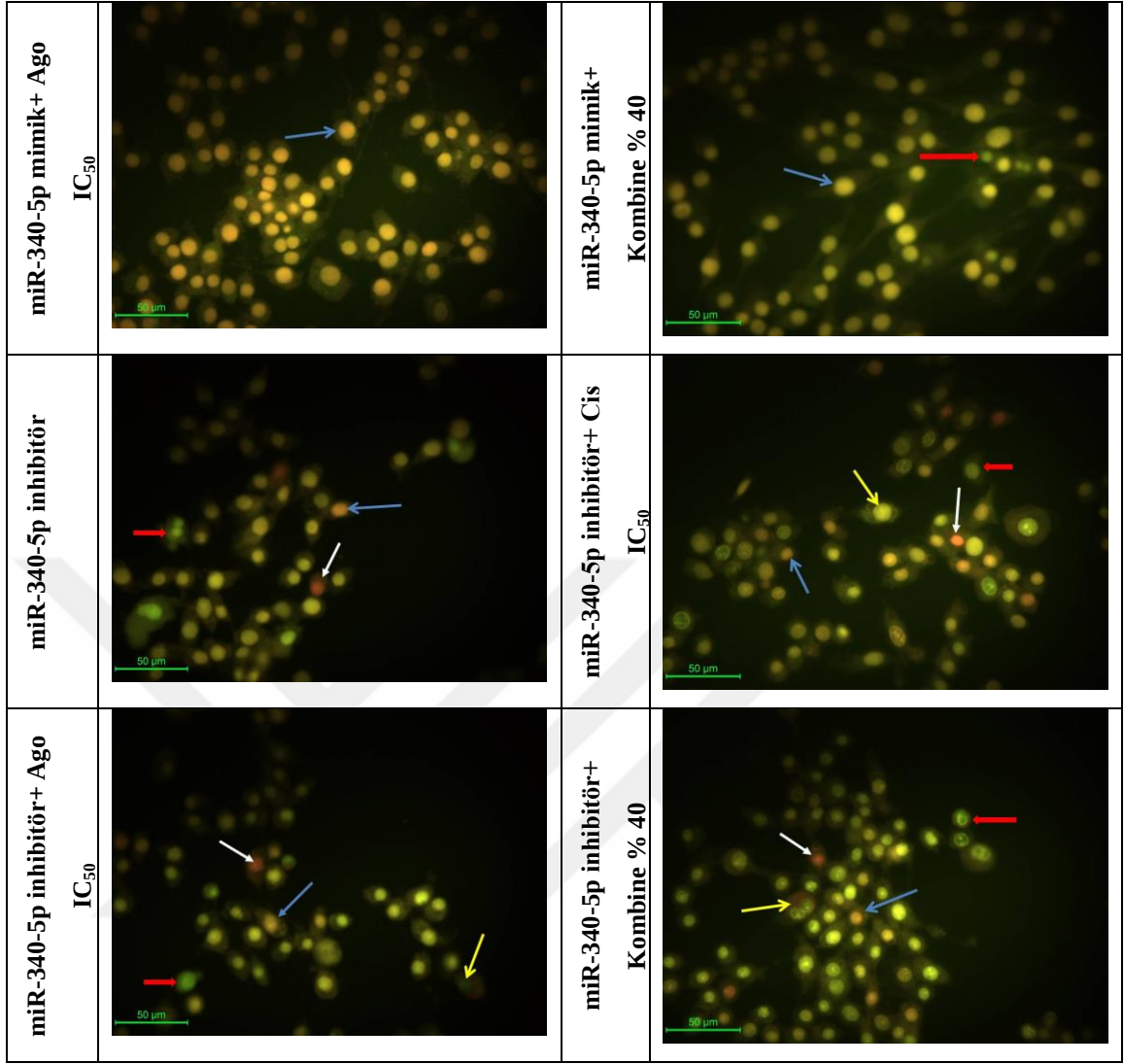
Apoptotik hücrelerin görüntüleri akridin oranj/etidyum bromür boyaması yapılarak alınmıştır. SKOV-3 hücreleri 24 kuyulu plakalara ekildikten sonra, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonrasında miR-340-5p mimik, miR-340-5p inhibitör ve negatif kontrolleriyle transfeksiyon işlemleri yapılarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Transfeksiyon süresi sonrasında besiyerleri uzaklaştırılarak, agomelatin IC_{50} , sisplatin IC_{50} ve kombine % 40 ilaç uygulamaları kuyucuklara eklenerek, 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda erken ve geç apoptotik hücreleri belirleyebilmek için 1:1 oranında hazırlanan EB+AO boya karışımı 100 μ l hücrelere eklenerek, PBS ortamında floresan mikroskopta (Leica DMI 4000B, Almanya) FITC filtresi kullanılarak görüntüleme işlemi yapılmıştır. Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'de SKOV-3 hücrelerinde zamana bağlı olarak meydana gelen apoptotik hücreler gösterilmektedir.

Şekil 4.25

SKOV-3 Hücrelerine miR-340-5p Transfeksiyon Sonrasında Agomelatin IC_{50} , Sisplatin IC_{50} ve Kombine % 40 Uygulamalarından 24 Saat Sonra AO/EB ile Boyanmış Canlı ve Apoptotik Hücre Görüntüleri (40 $\times$).



NK mimik		NK mimik+ Cis IC ₅₀	
NK mimik+ Ago IC ₅₀		NK mimik+ Kombine %40	
NK inhibitör		NK inhibitör+ Cis IC ₅₀	
NK inhibitör+ Ago IC ₅₀		NK inh+ Kombine % 40	
miR-340-5p mimik		miR-340-5p mimik+ Cis IC ₅₀	



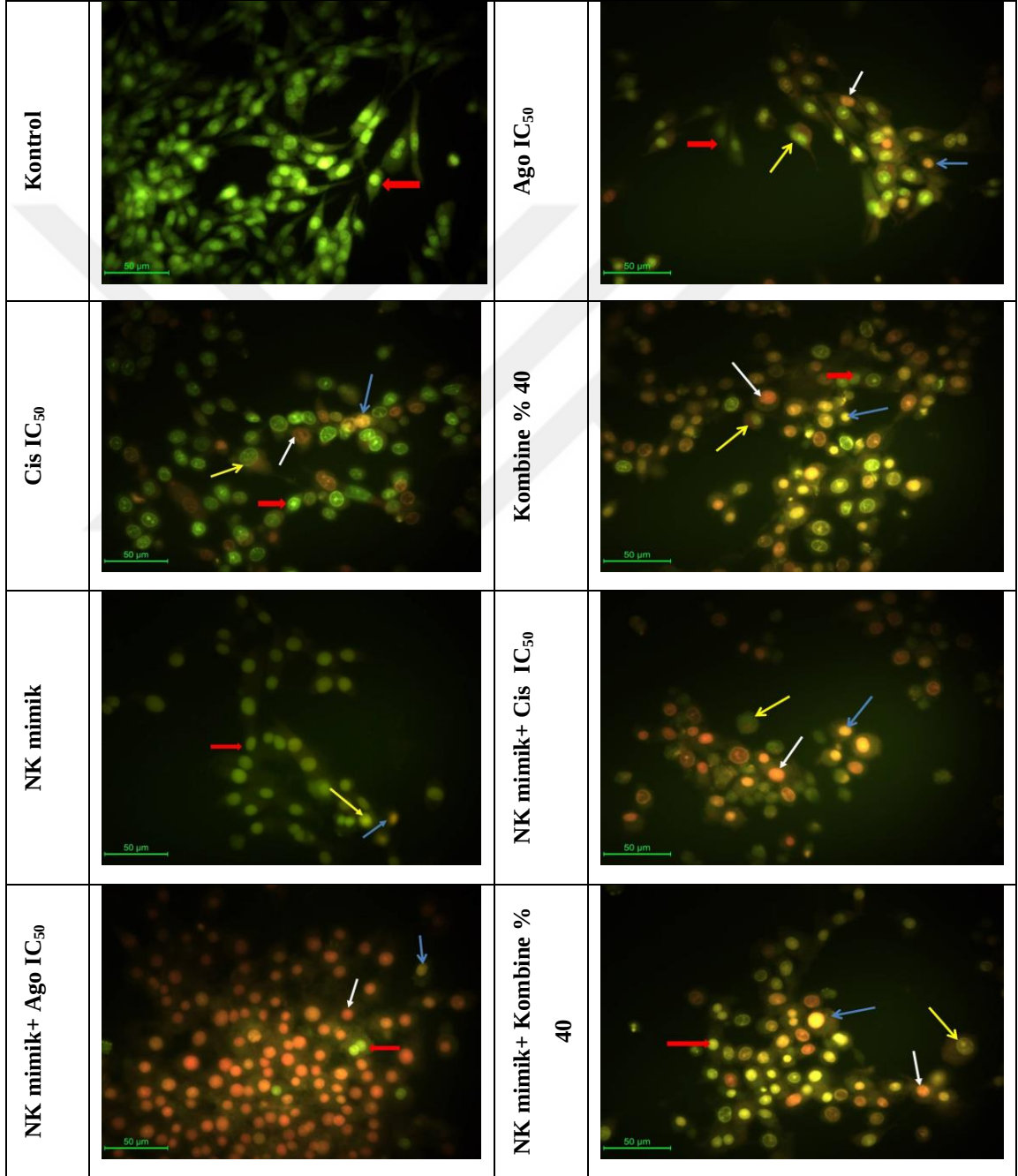
(Kırmızı ok: canlı hücre, Sarı ok: erken apoptotik hücre, Mavi ok: geç apoptotik hücre, Beyaz ok: nekroz).

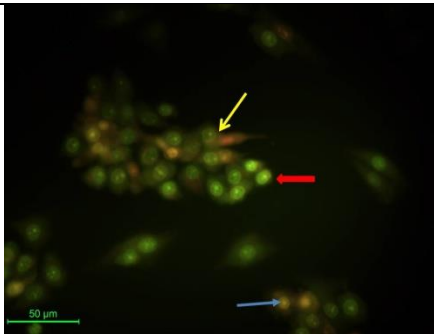
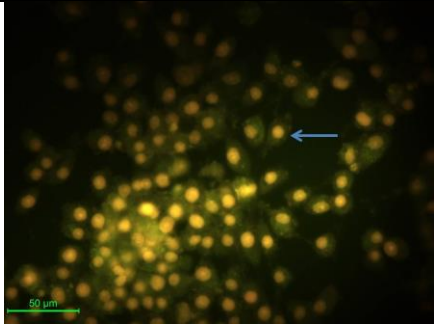
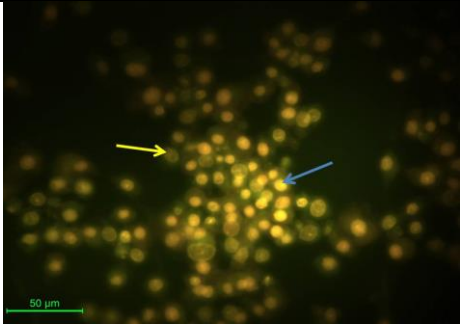
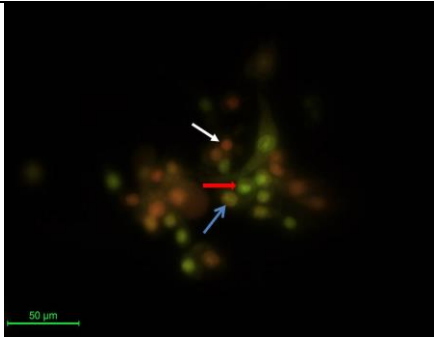
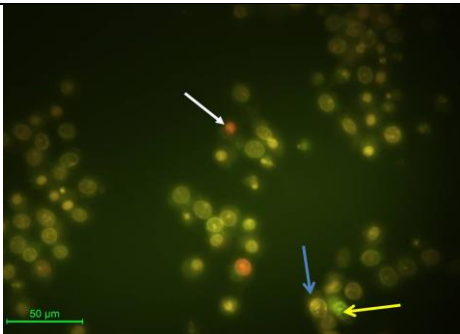
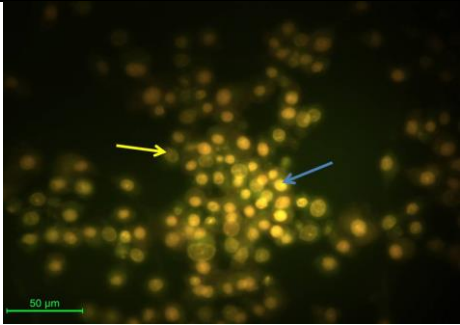
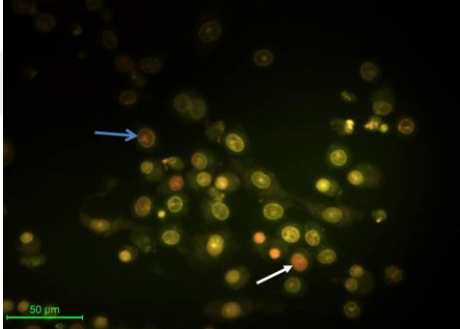
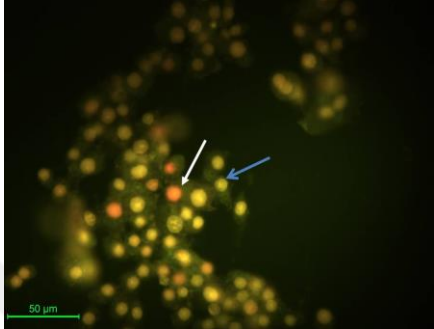
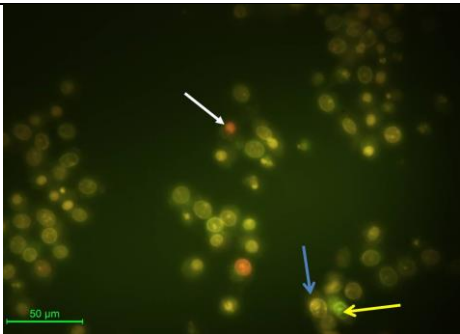
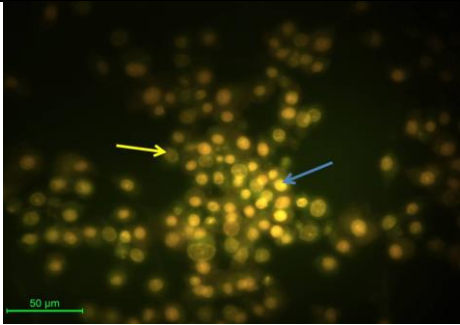
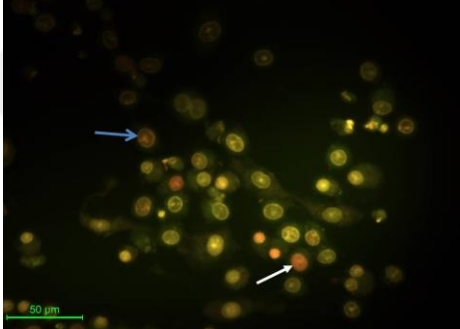
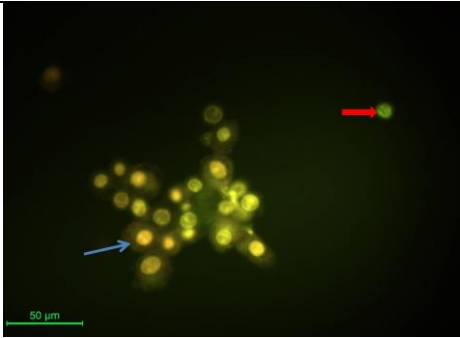
SKOV-3 ovaryum kanseri hücrelerinin AO/EB boyama görüntülerinden elde edilen verilerde canlı ve apoptotik hücreler değerlendirildiğinde, apoptotik hücrelerin, hücre morfolojilerinde hücre membran kabarması ve kromatin kondensasyonu görülmektedir. 24 saatlik agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀, kombine % 40 ilaç grubu ve transfeksiyon işlemleri yapılmayan kontrol hücre grubunda canlı hücrenin daha yoğun olduğu gözlenmiştir. Agomelatin IC₅₀ eklenen hücre gruplarında ise daha fazla membran bütünlüğü bozulmuş ve turuncu renkte hücreler olduğu gözlenmiştir. Sisplatin IC₅₀ ve kombine % 40 ilaç ilave edilen hücre gruplarında da aynı etkiler gözlenirse de en fazla turuncu renk agomelatin IC₅₀ hücre gruplarında gözlenmiştir. miR-340-5p mimik ve inhibitör transfeksiyon uygulamalarında ise, miR-340-5p mimik ile transfekte olan hücre gruplarında daha fazla oranda sarı-turuncu renkte hücreler olduğu gözlenmiştir.

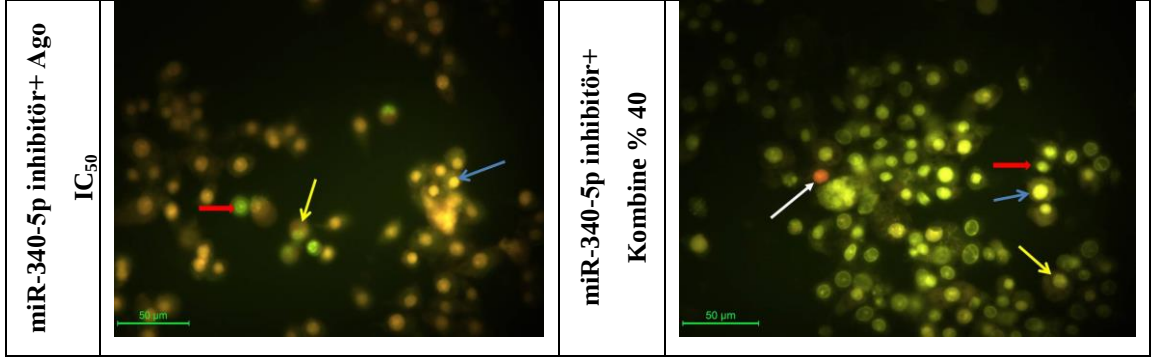
Apoptotik hücre miktarının özellikle agomelatin IC_{50} ilave edilen hücre gruplarında yüksek oranda gözlenmesi daha fazla hücrenin apoptoza gittiğini göstermektedir.

Şekil 4.26

SKOV-3 Hücrelerine miR-340-5p Transfeksiyon Sonrasında Agomelatin IC_{50} , Sisplatin IC_{50} ve Kombine % 40 Uygulamalarından 48 Saat Sonra AO/EB ile Boyanmış Canlı ve Apoptotik Hücre Görüntüleri (40×).



miR-340-5p inhibitor		miR-340-5p mimik+ Ago IC ₅₀		miR-340-5p mimik+ Cis IC ₅₀		NK inhibitor	
miR-340-5p inhibitor+ Cis IC ₅₀		miR-340-5p mimik+ Kombine % 40		miR-340-5p mimik+ Cis IC ₅₀		NK inh+ Ago IC ₅₀	
miR-340-5p inhibitor+ Cis IC ₅₀		NK inh+ Kombine % 40		miR-340-5p mimik+ Cis IC ₅₀		NK inhibitor+ Cis IC ₅₀	



(Kırmızı ok: canlı hücre, Sarı ok: erken apoptotik hücre, Mavi ok: geç apoptotik hücre, Beyaz ok: nekroz)

SKOV-3 ovaryum kanseri hücrelerinde miR-340-5p mimik, miR-340-5p inhibitör ve negatif kontrollerinin transfeksiyonu sonrasında 48 saatlik agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve kombine % 40 ilaç uygulaması sonrasında yapılan AO/EB boyama yöntemi aracılığıyla, apoptotik ve canlı hücre görüntüleme işleminde elde edilen verilerde, apoptotik hücrelerin morfolojik görüntülerinde hücre membran kabarması ve kromatin kondensasyonu görülmektedir. Kontrol hücre grubun 48 saatlik inkübasyon ile 24 saat inkübasyon sonrasındaki hücre grubuyla kıyaslandığında daha fazla yeşil renkte olduğu ve kontrol grubunda inkübasyon süresinin uzamasıyla apoptotik hücre oranının azaldığı gözlenmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonrasında agomelatin IC₅₀, siplatin IC₅₀ ve kombine % 40 ilaç uygulanan hücre gruplarındaki sarı-turuncu hücre sayılarının 24 saatlik inkübasyon sonrasındaki hücre gruplarıyla karşılaştırıldığında daha fazla olduğu, apoptotik hücre sayısının arttığı gözlenmiştir. Kombine % 40 ilaç uygulanan hücre grubundaki turuncu renkli hücre sayısı, sisplatin IC₅₀ uygulanan hücre grubuyla kıyaslandığında daha fazla olduğu gözlenmiştir. miR-340-5p mimik ve inhibitör transfeksiyonu uygulamalarında ise, miR-340-5p mimik ile transfekte olan hücre grubunda daha fazla turuncu renkte hücreler gözlenmiştir. Transfeksiyon sonrasında eklenen agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve kombine % 40 ilaç uygulamalarında ise agomelatin IC₅₀ ve kombine % 40 ilaç uygulanan hücre gruplarındaki turuncu renkli hücrelerin sisplatin IC₅₀ eklenen hücre grubuna kıyasla daha fazla olduğu gözlenmiştir. Apoptotik hücre miktarının, turuncu boyanan hücre sayısına göre, yine agomelatin IC₅₀ ilave edilen hücre gruplarında yüksek oranda gözlenmesi daha fazla hücrenin apoptoza gittiğini göstermektedir. Ancak, apoptotik hücrelerin daha ileri deneysel çalışmalar ile belirlenmesi gerekmektedir.

5 SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

5.1 Sonuç

Tez çalışmamızda, agomelatin ve sisplatinin farklı doz uygulamaları sonrasında SKOV-3 ovaryum kanseri hücre hattında 24 saatteki IC₅₀ dozları sırasıyla 0.65 mM ve 55.31 µM olarak bulunmuştur. Agomelatin ve sisplatin kombinasyon çalışmaları sonucunda ise en etkili dozun % 40 kombine olduğu tespit edilmiştir.

miR-340-5p transfeksiyonu yapılan SKOV-3 ovaryum kanseri hücre hattına agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve kombine % 40 dozları uygulanarak, RTCA yöntemi ile hücre proliferasyonu ve migrasyonuna etkisi incelenmiştir. miR-340-5p ekspresyonunun artışı ya da baskılanması SKOV-3 hücre proliferasyonu üzerine spesifik bir etkiye neden olmadığı düşünülmektedir. Ancak, agomelatin IC₅₀ eklenmesi ile birlikte, tüm hücre gruplarında proliferasyon oranları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır. 24 saat agomelatin uygulamasının SKOV-3 hücre proliferasyonu üzerinde önemli bir etkisinin olabileceği görülmektedir. Transfekte edilen hücrelerde sisplatin IC₅₀ ve kombine % 40 ilaç eklenmesiyle hücre proliferasyonu oranları zamana bağlı olarak azalmıştır, ancak kombine % 40 ilaç uygulaması ayrı ayrı ilaç uygulamasına göre daha etkili bulunmuştur. Zamana bağlı olarak, miR-340-5p mimik ve % 40 kombine ilaç uygulaması SKOV-3 hücre proliferasyon oranını spesifik olarak anlamlı bir şekilde baskılamıştır. Hücre migrasyonu etkisinde ise, miR-340-5p'nin ekspresyonunun artırılması ya da baskılanmasının SKOV-3 hücre migrasyonu üzerine etkisini zamana bağlı değişim olduğunu göstermektedir. SKOV-3 hücre migrasyon oranı miR-340-5p aşırı ekspresyonu sonrasında inhibisyona uğradığı tespit edilmiştir. Hücrelerin miR-340-5p transfeksiyonu ve agomelatin IC₅₀ uygulaması sonrasında tespit edilen % migrasyon oranlarında farklılık olduğu bulunmuştur. miR-340-5p transfeksiyonu ve sisplatin IC₅₀ veya % 40 kombine ilaç uygulamasının SKOV-3 hücre migrasyonu üzerine spesifik inhibisyon etkisine sahip olmadığı tespit edilmiştir.

Elde edilen deneysel sonuçlar, miR-340-5p transfekte edilmiş SKOV-3 hücre hatlarında agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve kombine % 40 ilaç uygulanan hücre gruplarında proliferasyon oranını düşürdüğü, migrasyon oranının ise agomelatin IC₅₀ ilaç uygulanan hücre gruplarında düştüğü belirlenmiştir.

Apoptoz hücre oranları Annexin V-FITC kiti ve akrinin oranj/etidyum bromür boyama yöntemi ile, miR-340-5p transfekte edilen ve agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve kombine

% 40 doz uygulamasında SKOV-3 hücre hatlarında apoptotik hücre sayısında artış gösterdiği saptanmıştır. Akım sitometrisi ile elde edilen hücre apoptoz oranlarında, SKOV-3 ovaryum kanseri hücrelerine miR-340-5p mimik transfeksiyonu yapılması hücrelerin apoptoza gitmesini artırmaktadır. 24 ve 48 saatlik veriler karşılaştırıldığında ise, 24 saatlik inkübasyon süresinde erken apoptoz oranlarının daha fazla olduğu görülmektedir. SKOV-3 ovaryum kanseri hücrelerinin AO/EB boyama görüntülerinden elde edilen verilerde ise 24 saatlik agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀, kombine % 40 ilaç grubu ve transfeksiyon işlemleri yapılmayan kontrol hücre grubunda canlı hücrenin daha yoğun olduğu gözlenmiştir. Agomelatin IC₅₀ eklenen hücre gruplarında ise daha fazla membran bütünlüğü bozulmuş ve geç apoptotik hücreler olduğu tespit edilmiştir. Sisplatin IC₅₀ ve kombine % 40 ilaç ilave edilen hücre gruplarında da aynı etkiler gözlenirse de en fazla apoptotik hücre agomelatin IC₅₀ eklenen hücre gruplarında gözlenmiştir. miR-340-5p mimik ve inhibitör transfeksiyon uygulamalarında ise, miR-340-5p mimik ile transfekte olan hücre gruplarında daha fazla oranda apoptotik hücreler olduğu gözlenmiştir. Apoptotik hücre miktarının özellikle agomelatin IC₅₀ ilave edilen hücre gruplarında yüksek oranda gözlenmesi daha fazla hücrenin apoptoza gittiğini sonucuna varılmaktadır. 48 saat sonrasındaki apoptotik hücre miktarında ise, transfeksiyon sonrasında eklenen agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve kombine % 40 ilaç uygulamalarında, agomelatin IC₅₀ ve kombine % 40 ilaç uygulanan hücre gruplarındaki apoptotik hücrelerin, sisplatin IC₅₀ eklenen hücre grubuna kıyasla daha fazla olduğu gözlenmiştir. Apoptotik hücre miktarının, yine agomelatin IC₅₀ ilave edilen hücre gruplarında yüksek oranda gözlenmesi daha fazla hücrenin apoptoza gittiğini göstermektedir.

5.2 Tartışma

Ovaryum kanseri, jinekolojik kanserler arasında en yaygın ve en yüksek ölüm oranına sahip kanserlerden biridir. Tedavideki gelişmelere rağmen ovaryum kanserinde ölüm oranının yüksek olmasının sebebi, tümörün gizli büyümesi, gecikmiş semptom başlangıcı ve tarama eksikliğinden dolayı hastalığın ileri evrelerde teşhis edilmesinden kaynaklanmaktadır. Geç tanı hastalığın sağkalım oranını en çok etkileyen faktör olduğu için yeni belirteç ve tedavi uygulamalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

SKOV-3 ovaryum kanseri hücrelerinde agomelatin ve sisplatinin ayrı ayrı ve kombine sitotoksik dozları belirlenmiş olup daha sonra, miR-340-5p mimik, inhibitör ve negatif

kontrollerinin transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Aşırı miR-340-5p ekspres eden ve miR-340-5p'nin baskılandığı hücre grupları agomelatin, sisplatin ile ayrı ayrı ya da kombine uygulamalar sonrasında hücre proliferasyonu, migrasyonu ve apoptoz üzerine etkileri incelenmiştir.

Çalışmamızdaki gibi kanser hücrelerinde antikanser özelliklerin olabileceği vurgulanan bir çalışmada da agomelatinin, prostat ve ovaryum kanseri hücre hatlarına karşı güçlü bir sitotoksik etkisinin bulunduğu, IC₅₀ değeri 0.80 mM olarak bulunmuştur (Tekin, 2017).

Kolorektal kanser tedavisinde yapılan *in vitro* ve *in vivo* araştırmada ise agomelatinin 0.25 mM ve 0.5 mM konsantrasyonlarda tedaviye yanıtları incelenmiş ve en iyi yanıtın 0.5 mM konsantrasyonda olduğu bulunarak antitümör etkisi vurgulanmıştır (Moreno-SanJuan vd., 2023).

Agomelatin, 2000'li yılların ortalarında sentezlenmiş, melatonin hormonunun sentetik analogu olan antidepresan ilaçtır (Guardiola-Lemaitre vd., 2014). Melatoninin kimyasal yapısındaki indol grubu yerine naftalen bioizostere grubu ve NH grubu içerir (Uzbay, 2012). Kardiyovasküler hastalığı olan hastalarda majör depresyon tedavisinde, agomelatinin etkinliğinin araştırıldığında depresif bozukluklar ve semptomları giderici ideal bir tedavi yöntemi olduğu gösterilmiştir (Medvedev, 2017). 2000-2018 yılları arasında agomelatin ile ilgili yapılan literatür taramasında parkinson hastalığı, kardiyovasküler hastalık, tip II diyabet, bipolar depresyon gibi hastalıklardaki depresyonda semptomları iyileştirmede spesifik bir etkiye sahip olabileceği vurgulanmıştır (Norman vd., 2019).

Agomelatinin antidepresan etkileri dışında antioksidan özelliklerinin olduğu ve kanser tedavisinde etkili olabileceği düşünülen çalışmalar mevcuttur (Akaras vd., 2017; Liu vd., 2016). Ratlarda yapılan bir çalışmada gentamisin'in sebep olduğu nefrotoksisiteyi, agomelatinin koruyucu etkisi vurgulanarak, oksidatif stresi, inflamasyonu ve doku hasarını baskılayarak azalttığı gösterilmiştir (Mahmoud vd., 2021). Ratlarda yapılan başka bir çalışmada ise, agomelatinin, kadmiyum (Cd) kaynaklı kardiyotoksisite üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda agomelatinin miyokardiyal hasarı ve oksidatif stresi önleyerek HSP70 ve TLR-4/NF-κB yolunu düzenleyerek Cd toksitesine karşı agomelatinin etkisi gösterilmiştir (Alruhaimi vd., 2023).

Kolorektal kanserde alternatif bir tedavi olarak agomelatinin kullanımı ile ilgili *in vitro* ve *in vivo* bir çalışmada, kolorektal kanser hücrelerinde, hücre büyümesini inhibe ettiği, kaspaz bağımlı apoptotik hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir (Moreno-SanJuan vd., 2023).

Agomelatin ve melatoninin insan prostat ve ovaryum kanseri hücre hatlarına karşı güçlü sitotoksik ve antitümör özelliklerinin olduğunu belirten çalışmalar azda olsa mevcuttur (Tekin, 2017).

Bu çalışma kapsamında, sisplatinin de 24 saat inkübasyonu sonucunda SKOV-3 hücrelerindeki IC₅₀ dozu 55.31 µM, 48 saat inkübasyonu sonucunda IC₅₀ dozu ise 32.59 µM olarak bulunmuştur.

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde, sisplatinin IC₅₀ konsantrasyonlarının değişebildiği görülmüştür (Bae vd., 2020; Borzdziłowska vd., 2022; Xu, vd., 2021; Zhu vd., 2022). Sisplatine dirençli ya da dirençsiz ovaryum kanseri hücre hatlarında (SKOV-3 ve OVCAR-4), sisplatinin IC₅₀ 64.34 µM değeri ile docamitinibin etkisi incelenerek sinerjist etki sağlandığı vurgulanmış (Xu vd., 2021) . Hücre göçünü de doza bağlı olarak engellediği belirtilmiştir. Başka bir çalışmada ise, ovaryum kanserinde hücre hatlarında (SKOV-3 ve A2780) limoninin ve sisplatinin (IC₅₀ 9.99 µM) etkileri, sisplatin dirençli ve dirençsiz hücrelerde karşılaştırılarak, limoninin sisplatin direncini azalttığı vurgulanmıştır (Bae vd., 2020).

Sisplatinin antikanser etkisi bilinmektedir ve tüm kanser hastalarının % 10-20'sinin tedavilerinin bir bölümünde sisplatin kullanılmaktadır (Dasari vd., 2014). Sisplatinin kanser tedavisinde tek başına veya diğer ajanlarla kombinasyon halinde kullanımı oldukça yaygındır. Ovaryum kanserinin ileri evrelerinde platin bazlı kemoterapi kombinasyonları önerilmektedir (Berek vd., 2021). Ovaryum kanserinde sisplatin ile agomelatinin kombine uygulamasına literatürde rastlanmamaktadır.

Oksidatif stres, sisplatin sitotoksitesinde çok yaygın bir mekanizmadır. Sisplatin, hidroksil radikalleri, süperoksit gibi reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturarak oksidatif strese neden olmaktadır (Ghosh, 2019).

Sisplatin 1978 yılında FDA tarafından onay almış bugüne kadar yumurtalık, testis, mesane, akciğer ve kolorektal kanser gibi birçok kanser türünde etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Ghosh, 2019; Liu vd., 2023; Yang vd., 2024; Zoń vd., 2023). Ancak,

ovaryum kanserinin de içerisinde bulunduğu birçok kanser türünde sisplatine karşı direnç meydana gelmekte ve bu da aşılması gereken önemli bir problem oluşturmaktadır. Bu direncin aşılması için de kombine tedaviler önerilmektedir.

Çalışmamızda agomelatin ve sisplatinin sitotoksik etkileri belirlendikten sonra kombine uygulama çalışmaları sonucunda kombinasyonlarımızın antagonist olduğu saptanmıştır. % 40 kombine doz ilaç grubumuz ileri deneysel çalışmalar için seçilmiştir. Sinerjist etkileşimin en uygun etkileşim olduğu açıktır, fakat ilaçlar sıklıkla sinerjist olmayan etkileşimlere de girerler (Palmer vd., 2017). Son yıllarda ilaçlar arasındaki sinerjinin doğrudan klinik etkili faydaya dönüştüğü düşüncesi çürütülmüştür (Palmer vd., 2017; Pritchard vd., 2013). İki ilaç arasındaki sinerjik etkileşim, daha önce ayrı ayrı kullanılan ilaçlarla proliferasyonları engellenmemiş hücrelerde, proliferasyonun engelleneceği anlamına gelmez. Buna ek olarak, antagonistik bir etkileşim bazı ilaç kombinasyonları için her zaman klinik açıdan olumsuz veya elverişsiz bir durum olarak değerlendirilmemektedir (Richards vd., 2020). MCF-7 hücrelerinde sisplatin ve timokinon kombinasyonunun antiproliferatif etkisi değerlendirilmiş ve farklı kombinasyonlarda denk gelen sinerjistik veya antagonistik etkilerde MCF-7 meme kanseri hücre hattına karşı antiproliferatif etki gösterdiği gözlemlenmiştir (Özkoç vd., 2022). Moleküler profilleri birbirinden farklı dört meme kanseri hücre hattında sisplatin ve kambinolün kombine çalışması yapılmış ve antagonistik bir etkide oldukları bulunmuştur. Her iki ilacın da ayrı ayrı kullanıldığında, hücre apoptozunu indüklediğini ve bunların kombinasyon halinde uygulanmasının, antagonistik etkileşim göstererek tüm meme kanseri hücre hatları için antiproliferatif etkiyi azalttığını gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur (Hałas vd., 2021). Meme kanserinin en agresif alt tipi olan üçlü negatif meme kanserinde hücre hatlarında paklitaksel ve kamolün ile kombine çalışma yapılmış ve bu çalışmada da antagonistik etki bulunmuştur. Ayrı ayrı uygulanan ilaçların hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği, ancak bunların kombinasyon halinde uygulanmasının analiz edilen tüm meme kanseri hatlarında antiproliferatif ve pro-apoptotik etkileri azalttığı gözlemlenen çalışmalar mevcuttur (Wawruzsak vd., 2022). Antagonist ilaç kombinasyonları hastalığı hızlı iyileştirdiği için ilaç direncinin gelişimini azaltabileceği, böylece ilaca dirençli mutasyonların birikmesi için mevcut zaman aralığını sınırlayabildiği ve bileşenlerin toplamından daha az güçlü olan antagonistik ilaç kombinasyonlarının, ilaç direncinin gelişimini sınırladığı çalışmalar literatürde gösterilmiştir (Chait vd., 2007; Hegreness vd., 2008). Bu nedenle,

kombinasyon tedavileri sadece farklı ilaçları birlikte almaktan daha karmaşık olabilir. Antagonistik kombinasyonların sinerjik kombinasyonlara göre avantajı, ilaca dirençli mutantların daha az uyum kazanmasının bir sonucudur (Chait vd., 2007; Hegreness vd., 2007; Michel vd., 2008). Antagonistik tedaviler tek ilaca karşı direnç geliştiren hücrelerin rekabet avantajını en aza indirerek yeterli doz limitlerinde direnci geciktirmede üstün bir performans sunmaktadır (Saputra vd., 2018). İnsan epitelyal ovaryum kanseri hücre hatları SKOV-3 ve OVCAR-3 hücre hatlarında yapılan çalışmada, platine dirençli SKOV-3 ve OVCAR-3 hücre hatlarında kannabidiol (CBD)'nin sisplatin veya paksitaksel ile altı farklı kombinasyon çalışması yapılmış, paksitaksel ile tüm etki seviyelerinde antagonistik etki gösterirken, sisplatin ile en yüksek etki seviyelerinde sinerjik etki, diğerlerinde ise antagonistik etki bulunmuştur. Çalışma sonunda kombinasyon tedavisinin tek tek tedaviye kıyasla her iki hücre hattında da, hücre çoğalmasının inhibisyonunu azalttığını ve ilaç direncinin giderilebileceği gösterilmiştir. Daha düşük konsantrasyonlarda, vücudun ilaçlara maruziyetini azaltacağından antagonistik etkinin faydalı olabileceği belirtilmiştir (Ismail vd., 2025).

SKOV-3 ovaryum kanser hücrelerine miR-340-5p transfeksiyonu sonrası agomelatin IC_{50} , sisplatin IC_{50} ve kombine ilaç uygulanan hücre gruplarının proliferasyonu ve migrasyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar, ilaç uygulanan hücre gruplarında proliferasyon oranının düştüğü, migrasyon oranında ise özellikle miR-340-5p mimik transfekte edilen ve agomelatin IC_{50} uygulanan hücre gruplarında baskılandığı tespit edilmiştir. Kombine ilaç uygulanan SKOV-3 hücrelerinde antagonist etkiye sahip olmasına rağmen, hücre proliferasyonunda ve kısmen migrasyon üzerine de etkili olduğunu gösteren sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmalarda, miR-340-5p'nin çeşitli tümörlerin oluşumunda ve gelişimde tümör baskılayıcı bir etki oynadığını ve tümörlerin hedefli tedavide umut verici hedeflerden biri haline geldiğini göstermektedir (Algaber vd., 2021; Zhang vd., 2020).

Literatürde anti-kanser etkili araştırmalarda, agomelatin ve sisplatin kombinasyonu ile ilgili çalışmalara rastlanılmamıştır. Son yıllarda, agomelatin ve sisplatinin kombine olarak çalışıldığı az da olsa çalışmalar mevcut olmasına rağmen, genellikle agomelatinin antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinden dolayı, sisplatin kaynaklı yan

etkilerin azaltılması amacıyla yapılan çalışmalardır. Ratlarda yapılan bir çalışmada sisplatin kaynaklı nefrotoksisitenin agomelatinin etkisiyle önlenileceği gösterilmektedir (Dil vd., 2023).

In vitro ve *in vivo* olarak yapılan başka bir çalışmada ise, agomelatinin sisplatin kaynaklı nörotoksisite üzerinde koruyucu rolü olduğu gösterilmiştir. Oksidatif stres ve inflamasyonun sebep olduğu nöronal hasarın, agomelatinin etkisi aracılığıyla sağlandığı vurgulanmıştır (Cankara vd., 2023).

Kanserli dokular ve normal dokular arasındaki miRNA ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi kanser patogeneğinde önemlidir. miR-340'ın ovaryum kanserindeki biyolojik rolü hakkında çok az şey bilinmektedir.

Yapılan araştırmalar sonucunda, miR-340-5p'nin çeşitli tümörlerin oluşumunda ve gelişiminde tümör baskılayıcı bir etki oynadığı ve tümör tedavisi için umut verici hedeflerden biri haline geldiği vurgulanmaktadır (Algaber vd., 2021; Zhang vd., 2020).

Ovaryum kanserinde miR-340'ın moleküler fonksiyonu ve ovaryum kanserindeki düzenleyici mekanizması üzerine yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmada, miR-340'ın aşırı ekspresyonunun, WNT sinyal yolağında yer alan FHL-2, β -katenin ve siklin D1 dahil olmak üzere önemli onkojenik genleri modüle ettiğini, bu kaskadın, hücre döngüsü geçişini ve EMT ile ilişkili genleri baskılayarak hücre büyümesini ve metastazı azaltarak hücre apoptozunu teşvik ettiği, hücre göçünü engellediği gösterilmiştir. miR-340 ile transfekte edilen SKOV-3 ve A2780 hücrelerinde, akım sitometrisinde yapılan hücre apoptozunun miR-negatif kontrol (NK) hücreleriyle karşılaştırıldığında miR-340 ile aşırı ekspresyonlu hücrelerde belirgin şekilde arttığı vurgulanmıştır. Ayrıca miR-340 aşırı ekspresyonunun p21, p27 ve kaspaz-3 seviyelerini artırdığı gösterilmiştir (Huang vd., 2019). Ayrıca, ovaryum kanserinde miR-340'ın baskılanmasının moleküler mekanizması hala net olmamasına rağmen, miR-340'ın aşırı ekspresyonunun SKOV-3 hücrelerinin canlılığını inhibe ettiğini, ancak apoptozu indüklediği bulunmuş, bu da miR-340'ın yumurtalık kanserinde tümör baskılayıcı olarak görev yapabileceği ön görülen çalışmalar mevcuttur (Qu vd., 2017). miR-340-5p'nin aşırı ekspresyonu SKOV-3 hücre canlılığını inhibe edici bir etki gösterdiği bu tez çalışması kapsamında da gösterilmiştir. miR-340-5p'nin aşırı ekspresyonunun yanı sıra agomelatin IC₅₀ ile 48 saat inkübasyonu hücre proliferasyonu ve hücre migrasyonu üzerine etkili olduğu tespit

edilmiştir. Ancak, miR-340-5p'nin aşırı ekspresyonu ve agomelatinin birlikte uygulanması sonrasında elde edilen SKOV-3 hücre proliferasyonu ve migrasyonu üzerine etkilerinin *in vivo* çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen miR-340-5p transfeksiyonu için üç farklı konsantrasyon (25 nM, 30 nM, 50 nM) ve bu konsantrasyon aralıklarına da denk gelebilecek ara konsantrasyonlar (10nM, 25nM, 50nM) da oluşturularak, transfeksiyon verimliliği BLOCK-iT Alexa Fluor kırmızı floresan kontrolü yapılarak belirlenmiştir. Herhangi bir gene homoloji göstermediğinden dolayı Alexa dizisinin hücreye girişinden kaynaklanan hücresel olayları da indüklediği için tercih edilmiştir. Transfeksiyon verimliliğinin yüksek olduğu 25 nM ve 50 nM belirlenmiş ve ara değer olan 30 nM, yapılan RTCA deneyleri ile de desteklenerek seçilmiştir. BLOCK-iT Alexa Fluor kırmızı floresan kontrolü transfeksiyon sonrasında SKOV-3 hücrelerinde morfolojik olarak bir değişiklik gözlenmemiştir.

Transfeksiyon verimliliğini belirlemede BLOCK-iT Alexa Fluor Kırmızı Floresan (Invitrogen) kontrolü kullanılan çalışmada, golgi proteini (GP) 73'ün apoptoz ve proliferasyonu üzerine etkilerinin belirlenebilmesi için GP73'e spesifik siRNA ile transfeksiyon yapıldıktan 24 saat sonra, HepG2 ve Bel7402 hücrelerinde transfeksiyonun verimliliği % 80'den fazla olarak belirlenmiştir. Transfeksiyon sonrası hücrelerin morfolojileri de incelenmiş ve siRNA'ların hücreler üzerinde bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir (Zhang vd., 2014).

Sisplatinin etkisinin bir diğer hedefi mitokondriyal DNA'dır. Hücresel DNA'da olduğu gibi ilaç, mtDNA'ya bağlanarak adüktlerin ve çapraz bağların oluşumuna ve sonuç olarak hasarına yol açar. Mitokondriyal DNA'daki hasar, mitokondriyal zarların geçirgenliğinde bir değişikliğe neden olur ve bu da organelden sitokrom C ve prokaspaz 9'un salınmasına yol açar. Mitokondriden salınan bileşikler, daha sonra kaspaz 9'un aktive eden bir apoptozom oluşturmak için APAF-1 ve ATP ile bağlanır. Aktive edilmiş kaspaz 9, sonraki kaspazlarla etkileşime girerek hücrenin apoptozunu indükleyen kaspazlar 3, 6, 7'nin aktivasyonuna yol açar (Zon vd., 2023).

Çalışmamızda SKOV-3 ovaryum kanser hücrelerinde apoptoz hücre oranları Annexin V-FITC ve akridin oranj/etidyüm bromür boyama yöntemi ile belirlenmiştir. miR-340-5p transfekte edilen ve agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve kombine % 40 doz uygulamasında SKOV-3 hücre hatlarında apoptotik hücre sayısında artış gösterdiği

bulunmuştur. Akım sitometride yapılan apoptoz oranlarındaki verilerde, SKOV-3 ovaryum kanseri hücrelerine miR-340-5p mimik transfeksiyonu yapılması hücrelerin apoptoza gitmesini artırmaktadır. 24 ve 48 saatlik veriler karşılaştırıldığında ise 24 saatlik inkübasyon süresinde erken apoptoz oranlarının daha fazla olduğu görülmektedir.

Meme kanseri hücre hatlarında miR-340-5p ekspresyon ve ilaç direncindeki rolünün araştırıldığı çalışmada, aşırı ekspresyonlu miR-340-5p'nin hücre çoğalmasını ve docetaksele karşı ilaç direncini inhibe ettiğini ve Wnt/ β -katenin yoluyla LGFR5'i hedef alarak meme kanseri hücrelerinin apoptozunu indüklediği gösterilmiş, miR-340-5p'nin tümör baskılayıcı olarak hizmet edeceği vurgulanmıştır. Apoptoz analizi Annexin V-FITC/PI apoptoz kitiyle akım sitometri cihazıyla analiz edilmiş, miR-340-5p mimik ve negatif kontrolü transfer edilen hücrelerde, miR-340-5p mimiğin negatif kontrol transfer edilen hücre grubuna kıyasla daha fazla apoptotik hücre oranı gözlenmiştir. Bununla birlikte en yüksek apoptotik hücre oranını ise miR-340-5p mimik ve docetaksel eklenen hücre grubunda olduğu vurgulanmıştır (Shi vd., 2019).

Kanserli hücrelerde apoptotik hücrelerin oranlarının belirlenmesi ve apoptoza bağlı olarak da hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikleri belirlemek için AO/EB boyama yöntemi kullanılmaktadır.

Tez çalışmamızda, SKOV-3 hücre hattında miR-340-5p'nin transfeksiyonu sonrasında, agomelatin IC₅₀ ve sisplatin IC₅₀ ayrı ayrı ve kombine % 40 dozlarıyla AO/EB boyama ile transfeksiyon yapılan ve yapılmayan hücre gruplarında oluşan apoptotik hücreler floresan mikroskop ile görüntülenerek belirlenmiştir. SKOV-3 hücrelerinde transfeksiyon ile miR-340-5p ekspresyonunun uyarılmasıyla apoptotik hücrelerde artışa sebep olduğu belirlenmiştir. Transfeksiyon sonrası, agomelatin IC₅₀, sisplatin IC₅₀ ve kombine % 40 dozlarının muamelesi sonucunda ise tüm gruplarda apoptotik hücre sayısında artış olmasına rağmen en fazla artışın agomelatin IC₅₀ eklenen gruplarda olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre miR-340-5p transfeksiyon sonrasında agomelatin, sisplatin ve kombine % 40 hücre gruplarının hücre proliferasyonunu baskıladı ve apoptozu tetiklediği belirlenmiştir.

Akciğer kanseri hücre hatlarında yapılan çalışmada, anti-anjiyojenik ilaç olan apatinibinin, apoptotik hücre ölümünü tetiklediğinin, AO/EB boyama ile hücre ölüm

sayılarının, apatinibin ile tedavi edilen A549 ve H1299 hücrelerinde önemli derecede arttığını göstermiştir (Xie vd., 2021).

Oral kanseri hücre hatlarında, kemoterapide ilaç direncinin miRNA'ların rolüne ait yapılan bir çalışmada, sisplatin dirençli ve farklı hücre hatlarında miRNA-185-5p mimik ve negatif kontrollerinin transfer edilip, sisplatin ile muamele edilmesi sonucunda canlı ve apoptotik hücreler arasındaki ayrımı yapmak için AO/EB boyaması sağlanmıştır. miR-185-5p ve sisplatin kombinasyon tedavisinin sisplatin dirençli hücre hatlarında apoptozu artırdığını belirtmişlerdir (Biswal vd., 2024).

5.3 Öneriler

Agomelatinin SKOV-3 ovaryum kanseri hücreleri üzerine anti-kanser etkilerinin varlığının araştırıldığı tez çalışmamızda, ovaryum kanserinde antiproliferatif ve apoptozu indükleyici özellikleri nedeni ile tedavide kullanılabileceği düşünülmektedir. Ancak agomelatinin kanser üzerine yapılan çalışmalara literatürde azda olsa rastlanılmasına rağmen daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Agomelatin ile sisplatinin kombine olarak uygulanmasının sisplatin kaynaklı hücre sitotoksitesisi üzerine etkilerini azaltabileceği, sisplatinin tek kullanımına kıyasla tedavide daha etkili olabileceği de öngörülmektedir. Kanser patogenezinde etkili olan miR-340-5p'nin agomelatin ve/veya sisplatin ile uyarılan SKOV-3 hücrelerindeki hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, hücre göçü ve apoptozdaki etkilerinin belirlenebilmesi için daha ileri ve detaylı deneysel çalışmalar yapılması gerekmektedir. Bu etkilerin moleküler düzeyde de incelenmesi gerekmektedir. Ovaryum kanser hücrelerinde, miR-340-5p'nin apoptoz sinyal yollarında hangi genlerin ekspresyonunu düzenlemede rol oynayıp oynamadığını araştırmak için mRNA düzeyinde gen ekspresyon çalışmalarının yapılması ve etki mekanizmalarının aydınlatılması sonrasında da kombine uygulamanın *in vivo* çalışmalarının yapılması önerilmektedir.

KAYNAKÇA

- Addadi, Y., Moskovits, N., Granot, D., Lozano, G., Carmi, Y., Apte, R.N., Neeman, M. (2010). p53 status in stromal fibroblast modulates tumor growth in an SDF-1dependent manner. *Cancer Research*, 70(23):9650-8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1146.
- Akbarzadeh, M., Movassaghpour, A.E., Ghanbari, H., & Samadi, N. (2017). The potential therapeutic effect of melatonin on human ovarian cancer by inhibition of invasion and migration of cancer stem cells. *Scientific reports*, 7(1):17062. doi: 10.1038/s41598-017-16940-y.
- Akaras, N. Bal, T. Atilay, H., Selli, J., Halici, M.B. (2017). Protective effects of agomelatine on testicular damage caused by bortezomib. *Biotechnic & Histochemistry*: 92(8): 552-559. doi: 10.1080/10520295.2017.1350748.
- Algaber, A., Madhi, R., Hawez, A., Rönnow, C.F., Rahman, M. (2021). Targeting FHL2-E-cadherin axis by miR-340-5p attenuates colon cancer cell migration and invasion. *Oncology Letters*, 22(2):637. doi: 10.3892/ol.2021.12898.
- Alizadeh, A.M., Shiri, S., Farsinejad, S. (2014). Metastasis review: from bench to bedside. *Tumour biology*, 35(9): 8483-523. doi: 10.1007/s13277-014-2421-z.
- Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S., Sung, B., Aggarwal, B.B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical research*, 25(9):2097-116.
- Angius, F., Floris, A. (2015). Liposomes and MTT cell viability assay: an incompatible affair. *Toxicology in vitro: an international journal published with BIBRA*, 29(2):314-9. doi: 10.1016/j.tiv.2014.11.009.
- Avcı, Ç.B., Süslüer Yılmaz, S., Şığva Doğan, Ö., Söğütü, F., Dündar, M., Gündüz, C. (2013). Rapamisinin prostat kanseri hücre hatlarındaki etkisi. *Ege Tıp Dergisi*, 52(1):7-14.
- Babar, I.A., Cheng, C.J., Booth, C.J., Liang, X., & Slack, F.J. (2012). Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109(26):E1695-E1704. doi: 10.1073/pnas.1201516109.

- Badal, S.S., Danesh, F.R. (2015). MicroRNAs and their applications in kidney diseases. *Pediatric nephrology*, 30(5):727-40. doi: 10.1007/s00467-014-2867-7.
- Bae, J.R., Park, W.H., Suh, D.H., No, H.J., Kim, Y.B., Kim, K. (2020). Role of limonin in anticancer effects of *Evodia rutaecarpa* on ovarian cancer cells. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20:94. doi.org/ 10.1186/s12906-020-02890-y.
- Bahar, M.E., Kim, H.J., Kim, D.R. (2023). Targeting the RAS/RAF/MAPK pathway for cancer therapy: from mechanism to clinical studies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1):455. doi: 10.1038/s41392-023-01705-z.
- Bandera, E. V., Lee, V.S., Qin, B., & Kushi, L.H. (2017). Impact of body mass index on ovarian cancer survival varies by stage. *British Journal of Cancer*, 117(2):282-289. doi: 10.1038/bjc.2017.162. doi: 10.1038/bjc.2017.162.
- Beilankouhi, E.A.V., Sajadi, M.A., Alipourfard, I., Hassani, P., Valilo, M., Safaralizadeh, R. (2023). Role of the ER-induced UPR pathway, apoptosis, and autophagy in colorectal cancer. *Pathology, research and practice*, 248:154706.
- Berek, J.S., Renz, M., Kehoe, S., Kumar, L., Friedlander, M. (2021). Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: 2021 update. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, (Suppl 1):61-85. doi: 10.1002/ijgo.13878.
- Bhat, A.A., Thapa, R., Afzal, O., Agrawal, N., & Gupta, G. (2023). The pyroptotic role of Caspase-3/ GSDME signalling pathway among various cancer: A Review. *International journal of biological macromolecules*, 1;242.
- Bhattacharya, S., Patel, K.K., Dehari, D., Agrawal, A.K., Singh, S. (2019). Melatonin and its ubiquitous anticancer effects. *Molecular and cellular biochemistry*, 462(1-2):133-155. doi: 10.1007/s11010-019-03617-5.
- Biswal, P., Mallick, B. (2024). miR-185-5p rewires cisplatin resistance by restoring miR-203a-3p expression via downregulation of SOX9. *DNA Repair*, 142:103750.
- Blume-Jensen, P. & Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signaling. *Nature*, 411:355-64.

- Bodinat, C., Guardiola-Lemaitre, B., Mocaër, E., Renard, P., Muñoz, C., Millan, M.J. (2010). Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(8):628-42.
- Bohnsack, M.T., Czapinski, K., Görlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10(2):185-191. doi: 10.1261/rna.5167604.
- Borzdziłowska, P., Bednarek, I. (2022). The Effect of α -Mangostin and Cisplatin on Ovarian Cancer Cells and the Microenvironment. *Biomedicines*, 10,1116. doi.org/10.3390.
- Breglio, A.M., Rusheen, A.E., Shide, A.E., Shide, E.D., & Cunningham, L.L. (2017). Cisplatin is retained in the cochlea indefinitely following chemotherapy. *Nature Communications*, 8:1:1654. doi: 10.1038/s41467-017-01837-1.
- Calin, G.A., Dumitri, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., & (2002). Frequent deletions and downregulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States America*, 99(24):15524-9. doi:10.1073/pnas.242606799.
- Cankara, F.N., Günaydın, C., Çelik, Z.B., Şahin, Y., Pekgöz, Ş., Erzurumlu, Y., Gülle, K. (2023). Agomelatine confers neuroprotection against cisplatin-induced hippocampal neurotoxicity. *Metabolic Brain Disease*, 36(2):339-349.
- Cannito, R.A., Moysich, K. (2015). Epithelial Ovarian Cancer and Recreational Physical Activity: A Review of the Epidemiological Literature and Implications for Exercise Prescription. *Gynecol Oncology*, 137(3):559-573. doi: 10.1016/j.ygyno.2015.03.016.
- Carneiro, B.A., El-Deiry, W.S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature reviews. Clinical oncology*, 17(7):395-417. doi: 10.1038/s41571-020-0341-y.
- Chakraborty, A., Patton, D.J., Smith, B.F., Agarwal, P. (2023). miRNAs: Potential as Biomarkers and Therapeutic Targets for Cancer. *Genes (Basel)*, 14(7):1375.

- Chavan, D.D., Bhosale, R.R., Thorat, V.M., Shete, A.S., Patil, S.J., Tiwari, D.D. (2024). Recent Advances in the Development and Utilization of nanoparticles for the Management of malignant Solid Tumors. *Cureus*, 16(9):e70312.
- Chait, R., Craney, A., Kishony, R. (2007). Antibiotic interactions that select against resistance. *Nature*, 446(7136): 668-71. doi: 10.1038/nature05685.
- Chee, J.L., Saidin, S., Lane, D.P., Leong, S.M., Noll, J.E., Neilsen, P.M., Phua, Y.T., Gabra, H., Lim, T.M. (2013). Wild-type and mutant p53 mediate cisplatin resistance through interaction and inhibition of active caspase-9. *Cell Cycle*, 15;12(2):278-88. doi: 10.4161/cc.23054.
- Cheng, B., Rong, A., Zhou, Q., Li, W. (2020). LncRNA LINC00662 promotes colon cancer tumor growth and metastasis by competitively binding with miR-340-5p to regulate CLDN8/IL22 co-expression and activating ERK signaling pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39:5.
- Chumduri, C., Turco, M. Y. (2021). Organoids of the female reproductive tract. *Journal of Molecular Medicine*, 99:531-553. doi: 10.1007/s00109-020-02028-0.
- Chumboatong, W., Khamchai, S., Tocharus, C., Govitrapong, P., Tocharus, J. (2020). Agomelatine protects against permanent cerebral ischaemia via the Nrf2-HO-1 pathway. *European Journal of Pharmacology*, 173028.
- Cui, Z., Du, L., Wang, J., Li, Z., & Wu, Z. (2022). Overexpression of CENPL mRNA potentially regulated by miR-340-3p predicts the prognosis of pancreatic cancer patients. *BMC Cancer*, 22:1354. doi: 10.1186/s12885-022-10450-5.
- Dasari, S., Tchounwou, P.B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740: 364-378. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
- Das, S., Shukla, N., Singh, S.S., Kushwaha, S., Shrivastava, R. (2021). Mechanism of interaction between autophagy and apoptosis in cancer. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 26(9-10):512-533.
- Dev, S.S., Abidin, S.A.Z., Farghadani, R., Othman, L., Naidu, R. (2021). Receptor Tyrosine Kinases and Their Signaling Pathways as Therapeutic Targets of Curcumin in Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 12:772510.

- Dil, E., Topcu, A., Mercantepe, T., Tumkaya, L., Akyildiz, K., Saral, S., Yılmaz, A. (2023). Agomelatine on cisplatin-induced nephrotoxicity via oxidative stress and apoptosis. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 396:2753-2764.
- Doğan, L.A. & Güç, D. (2004). Sinyal iletim mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35:34-42.
- Donzelli, S., Cioce, M., Muti, P., Strano, S., Yarden, Y., Blandino, G. (2016). MicroRNAs: non-coding fine tuners of receptor tyrosine kinase signalling in cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 50: 133-42.
- Du, Z. & Lovly, C. M. (2018). Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Molecular Cancer*, 58: 1-13. doi: 10.1186/s12943-018-0782-4.
- Eitan, R., Kushnir, M., Lithwick-Yanai, G., David, M.B., & Levavi, H. (2009). Tumor microRNA expression patterns associated with resistance to platinum based chemotherapy and survival in ovarian cancer patients. *Gynecology Oncology*, 253-259. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.04.024.
- Fang, Y., Xu, C., Fu, Y. (2015). MicroRNA-17-5p induces drug resistance and invasion of carcinoma cells by targeting PTEN signaling. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 22:12. doi: 10.1186/s40709-015-0035-2.
- Fernandez, S., Risolino, M., Mandia, N., Talotta, F., & Verde, P. (2015). miR-340 inhibits tumor cell proliferation and induces apoptosis by targeting multiple negative regulators of p27 in non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 3240-3250. doi: 10.1038/onc.2014.267.
- Ghafouri-Fard, S., Shoorei, H., Taheri, M. (2020). miRNA profile in ovarian cancer. *Experimental and molecular pathology*, 113:104381.
- Ghosh, S. (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic chemistry*, 88:102925. Doi: 10.1016/j.bioorg.2019.102925
- Gielecińska, A., Kciuk, B., Yahya, E.-B., Ainane, T., Mujwar, S., Kontek, R. (2023). Apoptosis, necroptosis, and pyroptosis as alternative cell death pathways induced by chemotherapeutic agents? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Reviews on Cancer*, 1878(6):189024.

- Guardiola-Lemaitre, B., De Bodinat, C., Delagrangre, P., Millan, M.J., Munoz, C., Mocaër, E. (2014). Agomelatine: mechanism of action and pharmacological profile in relation to antidepressant properties. *British Journal of Pharmacology*, 171(15):3604-3619.
- Green, B. (2011). Focus on agomelatine. *Current medical research and opinion*, 27(4):745-9. doi: 10.1185703007995.2011.554534.
- Hałasa, M., Łuszczki, J.J., Dmoszyńska-Graniczka, M., Baran, M., Okoń, E., Stepulak, A., Wawruszak, A. (2021). Antagonistic Interaction between Histone Deacetylase Inhibitor: Cambinol and cisplatin-An Isobolographic Analysis in Breast Cancer In Vitro Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 9;22(16):8573.
- He, B., Zhenyu, Z., Cai, Q., Zhang, Y., Zhang, P., & Wang, X. (2020). miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer. *International journal of biological sciences*, 16(14):2628-2647.
- He, Y., Sun, M.M., Zhang, G.G., Yang, J., Chen, S.K., Xe, W.W., Li, B. (2021). Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 6(1):425. doi: 10.1038/s41392-021-00828-5.
- Hegreness, M., Shores, N., Damian, D., et al. (2008). Accelerated evolution of resistance in multidrug environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(37): 13977-81.
- Holjencin, C., Jakymiw, A. (2022). MicroRNAs and Their Big Therapeutic Impacts: Delivery Strategies for Cancer Intervention. *Cells*, 11(15):2332.
- Hoxhaj, G., Manning, B.D. (2020). The PI3K-AKT Network at the Interface of Oncogenic Signalling and Cancer Metabolism. *Nat Rev Cancer*, 20(2):74-88.
- Huang, Z., Li, Q., Luo, K., Zhang, Q., Geng, J., Zhou, X., Xu, Y., Qian, M., Zhang, J.A., Ji, L., Wu, J. (2019). miR-340-FHL2 axis inhibits cell growth and metastasis in ovarian cancer. *Cell Death Disease*, 10: 372.
- Huang, Z., Xu, Y., Wan, M., Zeng, X., Wu, J. (2021). “miR-340: A multifunctional role in human malignant diseases.” *International Journal of Biological Sciences*, 17(1):236-246. doi: 10.7150/ijbs.51123.

- Ismail, J., Shebaby, W., Atallah, S.A., Taleb, R.I., Kawrani, S., Faour, W., Mroueh, M. (2025). Combination of Cannabidiol with Cisplatin or Paclitaxel Analysis Using the Chou-Talalay Method and Chemo-Sensitization Evolution in Platinum-Resistant Ovarian Cancer Cells. *Biomedicines*, 13(2):520.
- Islam, S.S., Aboussekhra, A. (2019). Sequential combination of cisplatin with eugenol target ovarian cancer stem cells through the Notch-Hes1 signalling pathway. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 38(1):382.
- Jablonsk, K., Pula, B., Zemla, A., Kobierzycki, C., Kedzia, W., &., Dziegiel, P. (2014). Expression of the MT1 Melatonin Receptor in Ovarian cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12):23074-23089.
- Kelland L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews.Cancer*, 7(8):573-84. doi: 10.1038/nrc2167.
- Keller, F.C., Rao, A., Maguire, A. (2014). Circadian molecular clocks and cancer. *Cancer Letters*, 342(1):9-18. doi: 10.1016/j.canlet.2013.09.040.
- Ketelut-Carneiro, N., Fitzgerald, K.A. (2022). Apoptosis, Pyroptosis, and Necroptosis-Oh My! The Many Ways a Cell Can Die. *Journal of molecular biology*, 434(4):167378.
- Keum, N., Greenwood, D.C., Lee, D.H., &., Giovannucci, E.L. (2015). Adult weight gain and adiposity-related cancers: a dose-response meta-analysis of prospective observational studies. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(2):djv088.
- Kurman, R.J., Shih, L-M. (2010). The origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer-a Proposed Unifying Theory. *Am J Surg Pathol*, 34(3):433-443.
- Kurman, R.J., Carcangiu, M.L., Herrington, C.S., Young, R.H. (2014). WHO Classification of Tumours of Female reproductive Organs. *IARC Press*, No,6.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75(5):843-54. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y.
- Lee, Y., Kim, M., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo Journal*, 23(20):4051-4060.

- Lemmon, M.A. & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141:1117-34. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.011.
- Leung, D., Price, Z.K., Lokman, N.A., Wang, W., Goonetilleke, L., Kadife, E., Oehler, M.K., Ricciardelli, C., Kannourakis, G., Ahmed, N. (2022). Platinum-resistance in epithelial ovarian cancer: an interplay of epithelial-mesenchymal transition interlinked with reprogrammed metabolism. *Journal of translational medicine*, 3;20(1):556.
- Li, C.L., Nie, H., Wang, M., Su, L.P., & &, Liu, B.Y. (2012). microRNA-155 is downregulated in gastric cancer cells and involved in cell metastasis. *Oncology Reports*, 27(6):1960-6. doi: 10.3892/or.2012.1719.
- Li, D., Zhou, J., Yang, B., Yu, Y. (2019). microRNA-340-5p inhibits hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis and oxidative stress in cardiomyocytes by regulating the Act1/NF- κ B pathway. *Journal of cellular biochemistry*, 120(9):14618.
- Li, P., Sun, Y., Liu, Q. (2016). MicroRNA-340 Induces Apoptosis and Inhibits Metastasis of Ovarian Cancer Cells by Inactivation of NF- κ B1. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 38(5):1915-1927.
- Lin, S., Gregory, R. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 15(6):321-33. doi: 10.1038/nrc3932.
- Liu, C., Li, S., Tang, Y. (2023). Mechanism of cisplatin resistance in gastric cancer and associated microRNAs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 92(5):329-340. doi: 10.1007/s00280-023-04572-1.
- Liu, J., Clough, S.J., Hutchinson, A.J. et al. (2016). MT1 and MT2 melatonin receptors: A therapeutic perspective. *Annual Review Pharmacology and Toxicology*; 56:361-383. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010814-124742.
- Liu, J., Wang, F., Luo, F. (2023). The Role of JAK/STAT Pathway in Fibrotic Diseases: Molecular and cellular Mechanisms. *Biomolecules*, 13(1):119.
- Mahmoud, M.D., Abd El-Ghafar, O.A.M., Alzoghaibi, M.A., Hassanein, E.H.M. (2021). Agomelatine prevents gentamicin nephrotoxicity by attenuating oxidative stress

- and TLR-4 signaling, and upregulating PPARgamma and SIRT1. *Life Sciences*, 278:119600.
- Mairesse, S., Silletti, V., Laloux, C., Zuena, A.R., Giovine, A., &., Maccari, S. (2013). Chronic agomelatine treatment corrects the abnormalities in the circadian rhythm of motor activity and sleep/wake cycle induced by prenatal restraint stress in adult rats. *The international journal of neuropsychopharmacology*, 16(2):323-38.
- Manning, G., Whyte, D.B. Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 298:1912-34.
- Matulonis, U.A., Sood, A.K., Fallowfield, L., Howitt, B., Sehouli, J., Karlan, B.Y. (2016). Ovarian cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 2:16061.
- Matz, M., Coleman, M.P., Sant, M., &., Allemani, C. (2017). The histology of ovarian cancer: worldwide distribution and implications for international survival comparisons (CONCORD-2). *Gynecologic oncology*, 144(2):405-413.
- Medvedev, V.E. (2017). Agomelatine in the treatment of mild-to-moderate depression in patients with cardiovascular disease: results of the national multicenter observational study PULSE. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 13:1141-1151. <https://doi.org/102147/NDT.S129793>
- Mei, S., Chen, X., Wang, K., Chen, Y. (2023). Tumor microenvironment in ovarian cancer peritoneal metastasis. *Cancer Cell International*, 23:11.
- Menon, A., Abd-Aziz, N., Khalid, K., Poh, C.L., Naidu, R. (2022). miRNA: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19):11502.
- Michel, J.B., Yeh, P.J., Chait, R., et al. (2008). Drug interactions modulate the potential for evolution of resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39): 14918-23.
- Millan, M.J. (2022). Agomelatine for the treatment of generalized anxiety disorder: focus on its distinctive mechanism of action. *Therapeutic advances in psychopharmacology*, 30:12:20451253221105128.
- Mohd, M., Rizwan, A., Irfan, Q.T., Waleem, A., Sana, S., &., Sidra, I. (2024). Apoptosis: A Comprehensive Overview of Signaling Pathways, Morphological

- Changes, and Physiological Significance and Therapeutic Implications. *Cells*, 13(22):1838. doi: 10.3390/cells13221838.
- Momenimovahed, Z., Tiznobaik, A., Taheri, S., Salehiniya, H. (2019). Ovarian cancer in the World: epidemiology and risk factors. *International Journal of Woman's Health*, 11:287-299.
- Moreno-SanJuan, S., Puentes-Pardo, J.D., Casado, J., & León, J. (2023). Agomelatine, a Melatonin-Derived Drug, as a New Strategy for the Treatment of Colorectal Cancer. *Antioxidants*, 12(4):926.
- Muller, P.A. & Vousden, K.H. (2014). Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell*, 25(3):304-17.
- Norman, T.R., Olver, J.S. (2019). Agomelatine for depression: expanding the horizons? *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 20(6):647-656.
- Oncul, S., & Cho, M.S. (2023). Interactions between Platelets and Tumor Microenvironment Components in Ovarian Clinical Outcomes. *Cancers*, 15(4):1282.
- Özkoç, M., Özbal, B.S., Altundağ, E.M. (2022). Sisplatin ve Timokinon Kombinasyonunun MCF-7 Hücrelerindeki Antiproliferatif Etkisinin Değerlendirilmesi. *Biological diversity and Conservation*, 348-355.
- Palmer, A., sorger P.K. (2017). Combination Cancer Therapy Can Confer Benefit via Patient-to-Patient Variability without Drug Additivity or Synergy. *Cell*, 171:1678-1691. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.009.
- Park, I.S., Kim, S.I., Han, Y., Yoo, J., & Song, Y.S. (2021). Risk of female-specific cancers according to obesity and menopausal status in 2.7 million Korean women: Similar trends between Korean and Western woman. *The Lancet Regional Health-Western Pacific* 11:100146.
- Parmar, M.K., Ledermann, J.A., du Bois, A., Delaloye, J.-F., & Tropé, C. (2003). Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVER-2.2 trial. *The Lancet*, 361(9375):2099-106.

- Peng, Y., Wang, Y., Zhou, C., Mei, W., Zeng, C. (2022). PI3K/Akt/mTOR Pathway and Its Role in Cancer Therapeutics: Are We Making Headway? *Frontiers in oncology*, 12:819128.
- Pritchard, J.R., Bruno, P.M., Gilberta, L.A., Caprona, K.L., Lauffenburger, D.A., Hemann, M.T. (2013). Defining principles of combination drug mechanisms of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110:E170-E179.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 8(4):603-19.
- Qian, Z., Chang, J., Jiang, F., Ge, d., Yang, L., li, Y., Chen, H. (2020). Excess administration of miR-340-5p ameliorates spinal cord injury-induced neuroinflammation and apoptosis by modulating the p38-MAPK signaling pathway. *Brain, behavior, and immunity*, 87:531-542. doi: 10.1016/j.bbi.2020.01.025.
- Qu, F., Wang, X. (2017). microRNA-340 induces apoptosis by downregulation of BAG3 in ovarian cancer SKOV3 cells. *Die Pharmazie*, 72(8):482-486.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., &., Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403, 901-906. doi: 10.1038/35002607.
- Richards, R., Schwartz, H.R., Honeywell, M.E., Stewart, M.S., Cruz-Gordillo, P., Joyce, A.J., Landry, B.D., Lee, M.J. (2020). Drug antagonism and single-agent dominance result from differences in death kinetics. *Nature Chemical Biology*, 16:791-800.
- Roshan Moniri, M., Young, A., Reinheimer, K., Rajat, J., Dai, L.J., Warnock, G.L. (2015). Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA). *Cytotechnology*, 67(2):379-86.
- Saputra, E.C., Huang, L., Chen, Y., Tucker-Kellogg, L. (2018). Combination Therapy and the Evolution of Resistance: The Theoretical Merits of Synergism ant Antagonism in Cancer. *Cancer research*, 78(9):2419-2431. doi: 10.1158/0008-5472.

- Shi, S., Chen, X., Liu, H., Yu, K., Bao, Y., & Zou, L. (2019). LGR5 acts as a target of miR-340-5p in the suppression of cell progression and drug resistance in breast cancer via Wnt/ β -catenin pathway. *Gene*, 683:47-53.
- Shapiro, G.I. (2006). Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *Journal of Clinical Oncology*, 24(11), 1770-83
- Skowron, M.A., Melnikova, M., Van Roermund, J.G.H., Romano, A., & Hoffmann, M.J. (2018). Multifaceted Mechanism of Cisplatin Resistance in Long-Term Treated Urothelial Carcinoma Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2):590.
- Song, L., Duan, P., Gan, Y., Li, P., & Zhou, Q. (2017). MicroRNA-340-5p modulates cisplatin resistance by targeting LPAAT β in osteosarcoma. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 50(5):e6359.
- Stewart, C., Ralyea, C., Lockwood, S. (2019). Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Seminars in oncology nursing*, 35(2):151-156.
- Štuhec, M. (2013). Agomelatine-induced hepatotoxicity. *Wiener klinische Wochenschrift*, 125(7-8):225-6.
- Sun, C., Yang, X., Wang, T., Cheng, M., Han, Y. (2022). Ovarian Biomechanics: From Health to Disease. *Frontiers in oncology*, 11:744257.
- Svoronos, A.A., Engelman, D.M., Slack, F.J. (2016). OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Research*, 76(13):3666-3670.
- Tanaka, K., Shimada, Y., Nishino, K., & Wakai, T. (2021). Clinical significance of mesenteric lymph node involvement in the pattern of liver metastasis in patients with ovarian cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 28(12):7606-13.
- Tavares, V., Marques, I.S., Melo, I.G., & Medeiros, R. (2024). Paradigm Shift: A Comprehensive Review of Ovarian Cancer Management in an Era of Advancements. *International journal of molecular sciences*, 25(3):1845.
- Tekin, S. (2017). İnsan Over ve Prostat Kanseri Hücre Canlılığı Üzerine Etkili Yeni Bir İlaç: Agomelatin. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi*; 31 (3): 131-135.
- Uzday, I.T. (2012). Agomelatin: Genel Bilgiler, Farmakolojisi ve Kullanım Güvenliği. *Klinik Psikiyatri*, 15(Ek-1):9-19.

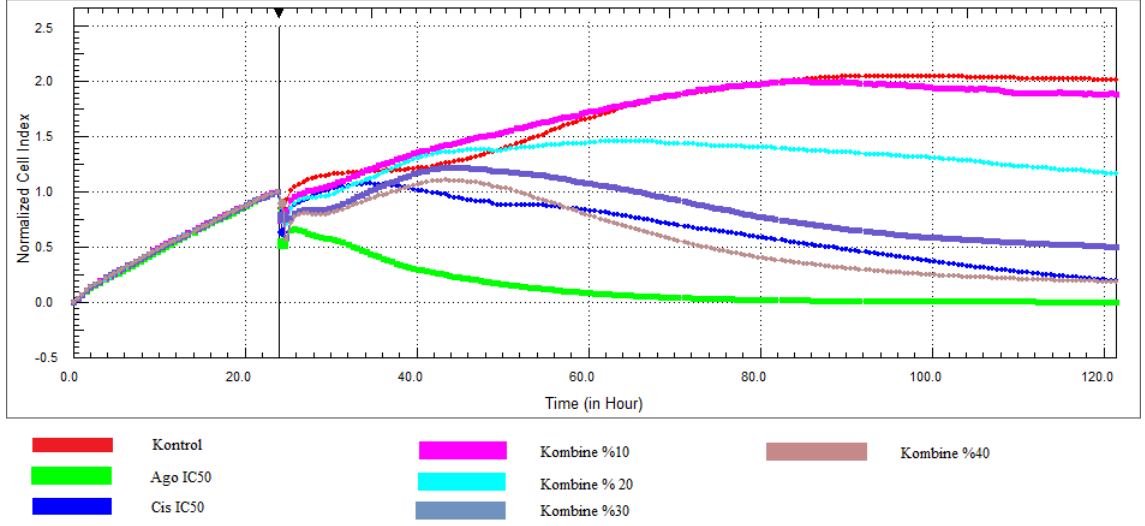
- Wang, X., Zhou, Y., Wang, D., Wang, Y., Zhou, Z., Ma, X., Liu, X., Dong, Y. (2023). Cisplatin-induced ototoxicity: From signaling network to therapeutic targets. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 157:114045.
- Wang, Z., Wang, H., Guo, H., Li, F., Wu, W., Zhang, S., Wang, T. (2020). The circadian rhythm and core gene Period2 regulate the chemotherapy effect and multidrug resistance of ovarian cancer through the PI3K signaling pathway. *Bioscience Reports*, 40(11):BSR20202683.
- Wawruszak, A., Luszczki, J., Okon, E., Czerwonka, A., Stepulak, A. (2022). Antagonistic Pharmacological Interaction between Sirtuin Inhibitor Cambinol and Paclitaxel in Triple-Negative Breast Cancer Cell Lines: An Isobolographic Analysis. *International journal of molecular sciences*, 9;23(12):6458.
- Xiao, Y., Yu, D. (2021). Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacology & therapeutics*, 221:107753.
- Xie, C., Zhou, X., Liang, C., Li, X., Ge, M., Chen, Y., Yin, J., Zhu, J., Zhong, C. (2021). Apatinib triggers autophagic and apoptotic cell death via VEGFR2/STAT3/PD-L1 and ROS/Nrf2/p62 signaling in lung cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research:CR*. 40(1):226.
- Xin, P., Xu, X., Deng, C., Liu, S., Wang, Y., Zhou, X., Ma, H., Wei, D., Sun, S. (2020). The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases. *International immunopharmacology*, 80: 106210.
- Xu, L., Xu, Y., Zheng, J., Zhao, Y., Wang, H., Qi, Y. (2021). Dacomitinib improves chemosensitivity of cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Oncology Letters*, 22(1):569. [https://doi: 10.3892/ol.2021.12830](https://doi.org/10.3892/ol.2021.12830)
- Yang, Y., Li, J., Lei, W., Wang, H., Ni, Y., Yan, H., Tian, Y., Wang, Z., Yang, Z., Yang, S., Yang, Y., Wang, Q. (2023). CXCL12-CXCR4/CXCR7 Axis in Cancer: from Mechanisms to Clinical Applications. *International Journal of biological sciences*, 19(11):3341-3359. doi: 10.7150/ijbs.82317.
- Yang, Z., Zhou, Z., Meng, Q., Chen, Z., Yung, L. &., Rao, S. (2024). Dihydroartemisin Sensitizes Lung Cancer Cells to Cisplatin Treatment by Upregulating ZIP14 Expression and Inducing Ferroptosis. *Cancer Medicine*, 13(19):e70271.

- Ye, Y., Aihui, Z., Anmao, LI. (2022). Celastrol promotes apoptotic cell death in children neuroblastoma cells through caspases dependent pathway. *Journal of traditional Chinese medicine*, 42(6):877-884.
- Yilmaz, I., Demiryilmaz, I., Turan, M.I., Sülayman, B., & Sülayman, H. (2013). The Protective Effect of Melatonin and Agomelatin against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *Latin American Journal of Pharmacy*, 32(8): 1231-5.
- Zhang, H.H., Li, R., Li, Y.J., Yu, X.X., Sun, Q.N., Li, A.Y., Kong, Y. (2020). eIF4E-related miR-320a and miR-340-5p inhibit endometrial carcinoma cell metastatic capability by preventing TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Oncology report*, 43(2):447-460. doi: 10.3892/or.2019.7437.
- Zhang, J., Guo, J., Yang, N., Huang, Y., Hu, T., Rao, C. (2022). Endoplasmic reticulum stress-mediated cell death in liver injury. *Cell Death & Disease*, 13:1051.
- Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Megraw, M.S., & Coukos, G. (2006). microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proceeding of the National Academy of sciences of the United of States of America*, 103(24):9136-41.
- Zhang, L.Y., Yu, J.Y., Leng, Y.L., Zhu, R.R., Liu, H.X., & Zhang, X.C. (2021). Mir-181c sensitizes ovarian cancer cells to paclitaxel by targeting GRP78 through the PI3K/Akt pathway. *Cancer gene therapy*, 29(6):770-783.
- Zhang, Y., Weinberg R.A. (2018). Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Frontiers of medicine*, 12(4):361-373.
- Zhang, Y.L., Zhang, Y. C., Han, W., Li, Y.M., Wang, G. N., Yuan, S., & Zhang, Y.W. (2014). Effect of GP73 silencing on hepatocellular cancer. *World journal of gastroenterology*, 20(32):11287-96.
- Zhang, X., Hong, S., Yang, J., Wang, Y., Peng, J., Wang, H., Hong, L. (2023). Purvalanol A induces apoptosis and reverses cisplatin resistance in ovarian cancer. *Anticancer Drugs*, 34(1):29-43.
- Zhao, C., Liu, J., Xu, Y., Guo, J., Wang, L., Chen, L., & Li, S. (2022). MiR-574-5p promotes cell proliferation by negatively regulating small C-terminal domain

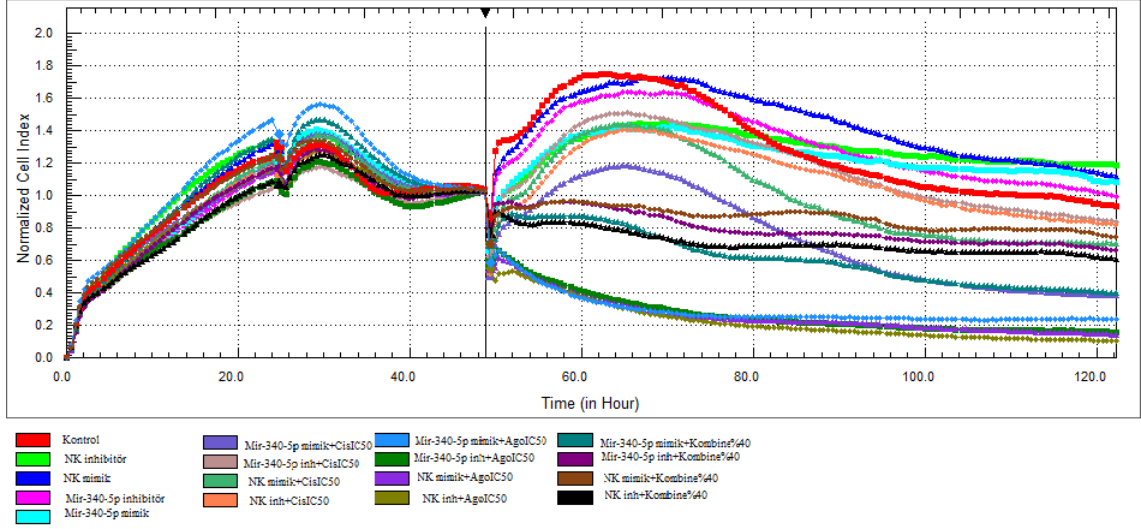
- phosphatase 1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 25(10):1243-1250. doi: 10.22038/IJBMS.2022.65886.14492.
- Zhong, X., Coukos, G., Zhang, L. (2014). miRNA in Human Cancer. *Methods Molecular Biology*, 822:295-306.
- Zhu, B., Gu, H., Mao, Z., Beeraka, N.M., Zhao, X., Padukudru, M., & , Liu, J. (2024). Global burden of gynaecological cancers in 2022 and projections to 2050. *Journal of Global Health*, 14:04155. doi: 10.7189/jogh.14.04155.
- Zhu, P., Wang, L., Xu, P., Tan, Q., Wang, Y., Feng, G., Yuan, L. (2022). GANT61 elevates chemosensitivity to cisplatin through regulating the Hedgehog, AMPK and cAMP pathways in ovarian cancer. *Future Medicinal Chemistry*, 14(7):479-500.
- Zoń, A., Bednarek, I. (2023). Cisplatin in Ovarian Cancer Treatment- Known Limitations in Therapy Force New Solutions. *International journal of molecular sciences*, 24(8):7585.
- Zou, y., Chiu, H., Domenger, D., Chuang, C.-F., Chang, C. (2012). The line-4 microRNA targets the LIN-14 transcription factor to inhibit netrin-mediated axon attraction. *Sci Signal*, 5(228):ra43.
- http-1: Global Cancer Observation (2025, Ocak). *Cancer Today*.
https://gco.iarc.who.int/today/en/dataviz/pie?mode=population&group_population_s=0&cancers=25&sex

EKLER

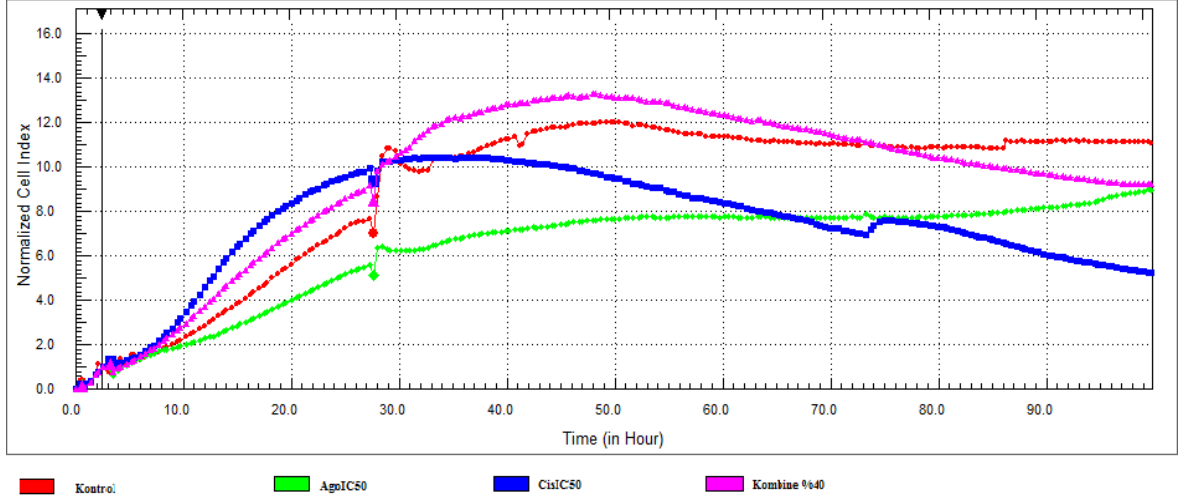
EK-1a. RTCA cihazında yapılan SKOV-3 hücrelerine Agomelatin IC₅₀, Sisplatin IC₅₀ ve kombine (%10, %20, %30, %40) uygulamasının hücre proliferasyonu üzerine etkisi. Birinci Deney.



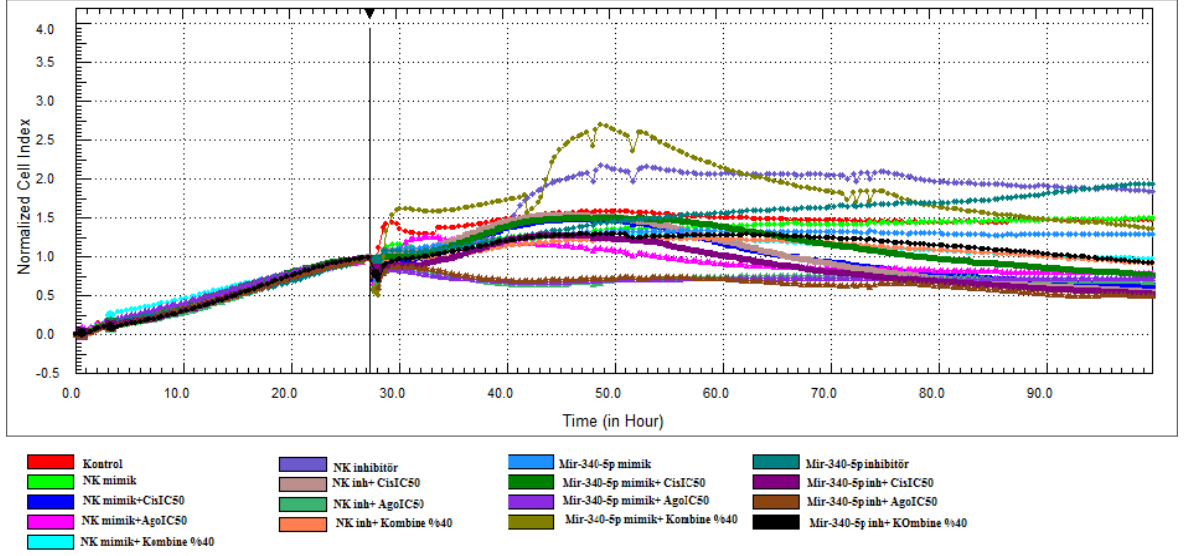
EK-2a. RTCA cihazında yapılan SKOV-3 hücrelerine hsa-miR-340-5p mimik, hsa-miR-340-5p inhibitör ve negatif kontrollerinin transfeksiyonu sonrasında Agomelatin IC_{50} , Sisplatin IC_{50} ve kombine % 40 ilaç uygulamasının hücre proliferasyonu üzerine etkisi. İkinci Deney.



EK-3a. SKOV-3 hücrelerinin CIM-platelerde Agomelatin IC₅₀, Sisplatin IC₅₀ ve Kombine % 40 uygulama gruplarının zamana karşı grafiği. Birinci Deney.



EK-3b. SKOV-3 hücrelerinin CIM platelerde hsa-miR-340-5p mimik, hsa-miR-340-5p inhibitör ve negatif kontrollerinin transfeksiyonu sonrasında Agomelatin IC₅₀, Siplatin IC₅₀ ve kombine % 40 ilaç uygulamasının hücre migrasyonu üzerine etkisi. Birinci Deney.



ÖZ GEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fatma ÖZÇELİK

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Bilgileri:

2015, Cumhuriyet Üniversitesi/Eğitim Fakültesi, Pedagojik Formasyon

2015, Cumhuriyet Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya ABD

2012, Cumhuriyet Üniversitesi/Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Görev Aldığı Projeler:

Tübitak, 1002(B) Acil Destek, 124S286, miRNA-340-5p'nin Sisplatin ve Agomelatin Varlığında Hücre Proliferasyonu ve Migrasyonuna Etkisi, Yürütücü (2025)