



**DULOKSETİNİN ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN
SKOV-3 VE HUVEC HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Ecz. Fatma KALAŞ

Eskişehir 2024

**DULOKSETİNİN ANTİKANSER
AKTİVİTELERİNİN SKOV-3 VE HUVEC
HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI**

Fatma KALAŞ

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. AYŞE TANSU KOPARAL

Eskişehir 2024

*Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen 2210S175
Numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.*

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

DULOKSETİNİN ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN SKOV-3 VE HUVEC HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI başlıklı tezi 30/07/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Toksikoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans Yeterlik tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı):	Prof.Dr. Ayşe Tansu KOPARAL	
Üye:	Prof.Dr. Bülent ERGUN	
Üye:	Prof.Dr. Hakan ŞENTÜRK	

Prof.Dr. Saime ÖNCE
Enstitü Müdürü

ÖZET

DULOKSETİNİN ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN SKOV-3 VE HUVEC HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI

Ecz.Fatma KALAŞ

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Temmuz 2024

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

Ovaryum kanseri pek çok ülkede kadınlarda en ölümcül kanserler arasında kabul edilmektedir. Güncel kemoterapi yöntemleri yetersiz kaldığı için yeni tedavi yöntemleri araştırılmakta ve yeni ilaçların keşfedilmesi hayati önem taşımaktadır. Anjiyojenez, önceden var olan damarlardan yeni kan damarları büyümesini kapsayan fizyolojik bir süreçtir. Anjiyojenezin tümör oluşumu ve metastazdaki rolünün keşfi yeni antianjiyogenik tedaviler için yol gösterici olmuştur.

Antidepresan olarak kullanılan Duloksetin, bir serotonin-norepinefrin geri alım inhibitörüdür ve kanser hastalarındaki depresyonun tedavisinde sıklıkla reçete edilen bir ilaçtır. Bu tez çalışmasında duloksetinin SKOV-3 (ovaryum kanserli hücre hattı) ve HUVEC (insan göbek kordonu toplar damarından elde edilmiş endotel hücreleri) hücreleri üzerindeki hücre çoğalmasını engelleyici etkisi mitokondriyal aktivite testi olan MTT ve ROS testleri ile, sitotoksik etkisi laktat dehidrojenaz (LDH) testi ile anjiyojenez üzerine etkisi ise HUVEC hücreleri kullanılarak yapılan tüp oluşum deneyi ile araştırılmıştır. MTT, LDH ve ROS test sonuçlarına göre duloksetinin SKOV-3 ve HUVEC hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak etki gösterdiği ve HUVEC hücrelerinde tüp oluşumunu bozduğu gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Kanser, SKOV-3, HUVEC, Duloksetin, Sitotoksosite

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ANTI-CANCER ACTIVITIES OF DULOXETINE IN SKOV-3 AND HUVEC CELLS

Phc. Fatma KALAŞ

Department of Pharmaceutical Toxicology

Anadolu University, Graduate School, July 2024

Supervisor: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

Ovarian cancer is considered among the deadliest cancers in women in many countries. Since current chemotherapy methods are insufficient, new treatment methods are being investigated and the discovery of new drugs is vital. Angiogenesis is a physiological process that involves the growth of new blood vessels from pre-existing vessels. The discovery of the role of angiogenesis in tumorigenesis and metastasis has provided dance for new antiangiogenic therapies.

Duloxetine, used as an antidepressant, is a serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor and is a frequently prescribed drug for the treatment of depression in cancer patients. In this thesis study, the cell proliferation inhibitory effect of duloxetine on SKOV-3 (ovarian cancer cell line) and HUVEC (endothelial cells obtained from human umbilical cord vein) cells was evaluated by MTT and ROS tests, which are mitochondrial activity tests, and its cytotoxic effect was evaluated by lactate dehydrogenase (LDH) tests.) test and its effect on angiogenesis was investigated by tube formation experiment using HUVEC cells. According to MTT, LDH and ROS test results, it was observed that duloxetine had a dose- and time-dependent effect on SKOV-3 and HU-VEC cells and disrupted tube formation in HUVEC cells.

Key words: Cancer, SKOV-3, HUVEC, Duloxetine, Cytotoxicity

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmanın yürütülmesinde değerli zamanını ayırarak bana yol gösteren, bilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, sabır ve anlayışla beni destekleyen danışman hocam Sn. Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL'A;

Her zaman değerli fikirlerini belirtip, bizlere destek olan başta Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Sn. Prof. Dr. Bülent ERGUN'E ve tüm Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine;

Yüksek lisans eğitimimin deney ve tez süresi boyunca her konuda desteğini hissettiğim, ilgisi ve anlayışıyla yanımda olan Dr. Banu BARUTCA, Dr. Öğr Görevlisi Türkan GÜNEY'e ve Dr. Burcugül ALTUĞ TASA'ya:

Hayatımın her anında karşılıksız sevgi ve desteklerini hissettiğim, canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Fatma KALAŞ

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandđım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadđımı, yararlandđım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL danışmanlığında tarafımdan retilildiğini ve Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Fatma KALAş

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	iii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
TABLolar/ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.1. Kanser hücrelerinin özellikleri	4
2.1.2. Kanser türleri	7
2.1.3. Kanser istatistikleri.....	8
2.2. Yumurtalık (Over) Kanseri	10
2.3. Anjiojenez.....	13
2.3.1. Tüp formasyon testi.....	15
2.4. Antidepresanlar	13
2.4.1. Serotonin norepinefrin geri alım inhibitörleri	19
2.4.1.1. Duloksetin	19
2.5. Hücre Çoğalması ve Sitotoksikite Testleri	21
2.5.1. Mitokondriyal aktive belirleme mtt testi	23
2.5.2 Laktat dehidrojenaz testi	25
2.6. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	27

3. MATERİYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1. Materyal	29
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	29
3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler.....	30
3.1.3. Kullanılan aletler ve cihazlar.....	30
3.1.4. Çalışmada kullanılan hücre hatları	31
3.1.4.1. SKOV-3 hücresi.....	31
3.1.4.2. HUVEC (insan göbek kordonu damarı endotel hücresi)	32
3.1.5. Kullanılan araç ve gereçlerin hazırlanması	33
3.1.6. Kullanılan çözeltiler ve reaktifler	33
3.1.6.1. Hücre kültürü çalışmaları için kullanılan genel çözeltiler ...	33
3.1.6.2. Medyumların (besi yerlerinin) hazırlanması.....	34
3.1.7. Oksidatif stresin belirlenmesi için yapılan deneylerde kullanılan çözeltiler.....	34
3.1.7.1. ROS deneyi	34
3.1.8. Sitotoksitenin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler.....	35
3.1.8.1 MTT çözeltisi	35
3.1.8.2. LDH deneyi.....	35
3.1.9. Test maddelerinin konsantrasyonlarının hazırlanması	35
3.2. Yöntemler	35
3.2.1. Hücre hatlarının laboratuvar ortamında çoğaltılması.....	35
3.2.2. Hemositometre (thoma lamı) yöntemi ile hücre sayımı	38
3.2.3. Hücre canlılığının belirlenmesi testleri.....	39
3.2.3.1. Mtt deneyi	39
3.2.3.2. LDH deneyi.....	40
3.2.4. Oksidatif stresin belirlenmesi	41
3.2.5. Angiyogenez belirlenmesi.....	41
4. BULGULAR	42
4.1. MTT Testi Sonuçları	42
4.2. Laktat Dehidrogenaz Deneyi Sonuçları.....	44
4.3. ROS Sonuçları.....	46
4.4. Tüp Formasyon Testi Sonuçları.....	47

5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER	48
5.1. Sonuçlar	48
5.2. Tartışma	51
5.3. Öneriler.....	53
KAYNAKÇA.....	55
ÖZGEÇMİŞ	1



TABLÖLAR/ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1: <i>Antideprasanların Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması</i>	16
---	----



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1: Kanser Hücresinin Fizyolojik Özellikleri.....	5
Şekil 2.2: Kanser Hücresinin Metastaz Aşamaları.....	6
Şekil 2.3: Normal Hücreler İle Kanser Hücresinin Karşılaştırılması.....	7
Şekil 2.4: 2018-2022 Yılları Arasında Türkiye Kanser İstatistikleri.....	8
Şekil 2.5: Türkiye 2022 Kanser İstatistikleri.....	9
Şekil 2.6: Yumurtalık Kanseri Türleri Ve Sınıflandırılması.....	11
Şekil 2.7: Kanser Hücresinin Anjiyogenez İle Yeni Damar Oluşturması.....	14
Şekil 2.8: Mtt Deney Farmazon Oluşumu.....	23
Şekil 2.9: Mtt Deney Protokolü.....	24
Şekil 2.10: LDH deney Protokolü.....	25
Şekil 3.1: SKOV-3 Mikroskop Altındaki Görüntüsü.....	31
Şekil 3.2: HUVEC Mikroskop Altındaki Görüntüsü.....	32
Şekil 3.3: A: Thoma Lamı, B: Hücre sayılan alanlar.....	38
Şekil 3.4: LDH deneyi test prosedürü.....	40
Şekil 4. 1: Duloksetinin HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	42
Şekil 4. 2: Duloksetinin SKOV-3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	43
Şekil 4. 3: Duloksetinin HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin LDH testi ile değerlendirilmesi.....	44
Şekil 4. 4: Duloksetinin SKOV-3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin LDH testi ile değerlendirilmesi.....	45
Şekil 4.5: Duloksetinin HUVEC hücreleri üzerine oksitadif stresi artırdığı ROS testi ile değerlendirilmesi.....	46
Şekil 4.6: Duloksetinin SKOV-3 hücreleri üzerine oksitadif stresi artırdığı ROS testi ile değerlendirilmesi.....	46
Şekil 4.7: Duloksetinin HUVEC hücrelerinin tüp oluşturması üzerine olan etkisinin görüntüleri.....	47

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C: Santigrad Derece

5-HT: 5-hidroksitriptamin

μM: Mikromolar

ATCC: Amerikan tip kültür koleksiyonu

BRCA1: Meme Kanseri Geni 1

BRCA2: Meme Kanseri Geni 2

CA-125: Kanser Antijen 125

CO₂: Karbondioksit

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiriboz nükleik asit

ECACC: European Collection of Authenticated Cell Culture- hücre bankası

ECGS: Endothelial cell growth supplemet from bovine pituitary

EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetikası

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

FDA: Food and Drug Administration (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi)

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü

FBS: Fetal Bovine Serum

HPV: Human Papilloma Virüs

HUVEC: İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücresi

IARC: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı

IC₅₀ (LD₅₀): Letal Doz 50

LDH: Laktat Dehidrogenaz

MAO: Monoamin Oksidaz Enzimleri

MTT: Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide

OS: Oksidatif stres

PBS: Phosfat Buffered Saline (Fosfat Tampon Çözeltilisi)

PDGF: Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü

PKOS: Polikistik Over Sendromu

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

PI3K: Fosfoinositid-3 –Kinaz

RPM: Dakikadaki Devir Sayısı

SKOV: Ovaryum Kanserli Hücre Hattı

SNRI: Serotonin- Norepinefrin Geri Alım İnhibitörü

SSRI: Serotonin Geri Alım İnhibitörü

TCA: Trisiklik Antidepresanlar

TKİ: Tirozin Kinaz İnhibitörleri

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

UV: Ultra Viyole (Mor ötesi)



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, 20. yüzyılın en endişe veren hastalıklarından biri olup, 21. yüzyılda da sürekliliği ve görülme sıklığı giderek artmaktadır. Durum o kadar korkutucudur ki, her dört kişiden biri yaşamı boyunca kanser riskiyle karşı karşıyadır. Bu durumun muhtemel sebepleri olan değişen yaşam tarzı, alışkanlıklar ve artan yaşam ömrü nedeniyle görülme sıklığı giderek artmaktadır [1].

Kanser tedavisinde kanserin çeşidi, doku veya organda yerleştiği yer ve hastalığın bulunduğu safha gibi faktörler tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde ve sürdürülmesinde rehberlik etmektedir. En çok tercih edilen kanser tedavi yöntemleri cerrahi, kemoterapi ve radyoterapiyken bu tedavilerden yanıt alınamadığı durumlarda bu yöntemlere ek olarak hormon tedavisi, gen tedavisi, hedeflendirilmiş tedavi ve immünoterapi dahil olmak üzere çeşitli hedefe yönelik tedaviler kullanılmaktadır [2].

Kemoterapi, biyolojik, kimyasal ve sentetik sitotoksik ajanların oral veya intravenöz olarak genellikle kombinasyonlar halinde uygulanma tedavisidir. Kanser kemoterapisinin amacı, kanser hücrelerinin çoğalmasını, vücudu istila etmesini, metastaz yapmasını ve hastayı öldürmesini önlemektir [3].

Çok aşamalı ve karışık bir süreç olan metastaz, ilk oluşmuş olan tümör bölgesinden bir kısım kanser hücresinin ayrılarak vücudun farklı bölgelerinde yeni tümörler oluşturmaktır. Bu süreç, özel bir gen dizisi ve sinyal yolları tarafından düzenlenir [4]. Metastaz kansere bağlı ölümlerin ve hastalığın yayılmasının birincil sebeplerindendir ve kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %90'ından sorumludur [5].

Kemoterapinin genel olarak kanser tedavisinde etkili bir yöntem olduğu düşünülmektedir; ancak bu ilaçlar temelde hücre bölünmesi aşamalarına etki gösterdiği ve bu etkileri çoğunlukla hücre çeşidine ve tipine özgü olmadığı için vücutta çok hızlı hücre bölünme yeteneğine sahip epitel hücreler, üreme hücreleri ve kemik iliği hücrelerini gibi hücrelere etki göstererek ciddi yan etkilere sebep olurlar [6]. Kemoterapi tedavisinin neden olduğu yan etkiler, tedavi için kullanılan ilaçların türüne, kanserin türüne, kanser hücresinin bulunduğu yere ve ayrıca bireyin kemoterapi tedavisine verdiği cevaba bağlıdır [4]. Kemoterapinin en sık görülen yan etkileri yorgunluk, bulantı ve kusma, nötropeni, anemi, periferik nöropatik ağrı, uyku bozukluklarıdır ve bu yan etkiler hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde düşürmektedir [7].

Kemoterapinin neden olduğu nöropatileri araştıran birçok çalışmada antidepresanların analjezik etki gösterdikleri ve nörotransmisyonu kolaylaştırma yeteneklerine sahip oldukları için kansere bağlı nöropatide kullanılabileceği sonucu çıkarılmıştır [8].

Literatürde bazı antidepresanların çok çeşitli kanser hücre dizilerine karşı büyümeyi engelleyici etkilere sahip olduğu kayıtlara geçmiştir ve antipsikotik etkilerine ek olarak çok çeşitli malignitelere karşı güçlü anti-kanser özelliklerine sahip oldukları kanıtlanmıştır [9-12].

Duloksetin, depresyon ve anksiyete tedavisinde yaygın kullanılan ve iyi bilinen bir serotonin-norepinefrin geri alım inhibitörüdür. Duloksetin ayrıca kanser hastalarında depresyon tedavisi için de sıklıkla reçete edilmektedir ve kemoterapinin neden olduğu periferik nöropatinin standart tedavi protokolü içinde kullanılan bir ilaçtır [8,9].

Kanser dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biri olduğu için ilaç şirketleri kanser karşıtı yeni ilaçların geliştirilmesine milyarlarca dolar yatırım yapmaktadır. Kanser tedavisine yönelik yeni ilaç keşfi ve geliştirme süreci ortalama 13 yıl sürmekte ve yaklaşık 1,8 milyar dolarlık maliyete mal olmaktadır [13,14]. Yapılan bu klinik araştırmalarda deneylere katılan etken maddelerin sadece %5'i FDA'dan onay almaktadır. Bu nedenle yeni ilaç keşfi yerine piyasada mevcut ruhsatlı ilacın yeniden farklı endikasyonlarla kullanılması görüşü bilimsel çevreler tarafında benimsenmeye başlanmıştır. İlacın yeniden farklı endikasyonlarda kullanılmasının temel avantajı, yeni terapötik bileşiklere göre bu ilaçlar uzun yıllardan beri piyasada olduğundan farmakokinetiği, farmakodinamiği ve yan etkileri bilindiği için güvenliğinin oldukça yüksek olmasıdır [13,14].

İlaçların yeniden farklı endikasyonlarda kullabileceği görüşüne katılan araştırmacılar tarafından duloksetinin bazı kanser hücreleri üzerindeki anti-kanser etkileri araştırılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir [9-12]. Bu tez çalışmasında duloksetinin SKOV-3 (ovaryum kanserli hücre hattı) ve HUVEC (insan göbek kordonu toplar damarından elde edilmiş endotel hücreleri) hücreleri üzerindeki hücre çoğalmasını engelleyici etkisinin mitokondriyal aktivite testi olan MTT testi ve ROS testi ile, sitotoksik etkisinin ise laktat dehidrojenaz testi (LDH) ile anjiyogeneze etkisinin ise HUVEC hücrelerine uygulanan tp oluşum deneyi ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin genetik ve çevresel koşulların etkisiyle kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması ile ortaya çıkan karmaşık bir hastalıktır. Hücrelerin bölünmesi ve çoğalmasının kontrolü genlerin kontrolünde olduğundan, kanser; genlerle ilişkili bir hastalık olarak adlandırılır. Yeni DNA oluşturma sürecinde genin değişmesine sebep olan metilasyon, asetillenme, fosforilasyon, ribozillenme gibi epigenetik değişimler sonucu oluşan bir hasar, DNA onarım sistemlerinden onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleri tarafından genin fonksiyonlarını yeniden kazandırmaya çalışsa da her zaman geriye dönüş sağlanamaz. Bu durum genlerin hatalı üretilmesi, hücresel işlevlerde bozulma ve hücrenin apoptotik veya nekrotik yolak ile yok edilmesine yol açar [4].

Tümörlerin; nokta mutasyonları ve gen amplifikasyonu, delesyon ve translokasyon gibi moleküler genetik veya genomik değişikliklerin bir sonucu olarak geliştiği ve ilerlediği görüşü benimsenmektedir. Bu değişikliklerin araştırılması ile onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA hasarı onarımında yer alan genler dahil olmak üzere kanserle ilişkili yeni genlerin tanımlanmasına ışık tutmuştur [2].

Tanımlanmış 100'den fazla kanser çeşidi olmasına ve çok rastlanan kanser tipleri için standart bir tedavi protokolü geliştirilmiş olmasına rağmen kanser aynı zamanda bireysel bir hastalıktır. Dünya üzerindeki insanların DNA'sı hiçbirisi birbirine benzemediği için hastalardan benzer tedaviler için farklı cevaplar alınabilir. Geleneksel yöntem olarak kabul edilen kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi tedavilere ek olarak teknolojinin ilerlemesi ile birlikte aşılar, biyolojik, hormonal, hedeflenmiş ve gen terapiler gibi yeni tedavi yöntemleri geliştirilmektedir [3].

Kanserin meydana gelmesine tütün ve tütün ürünlerinin kullanımı, alkol, kötü beslenme alışkanlıkları, obezite, meslek hastalıkları, çevresel kirleticiler ve UV ışınlarına maruziyet sebep olabilir. Hepatit B, Hepatit C ve HPV gibi virüsler kanser oluşumundan sorumlu virüslerdir. Kanserin görülme sıklığı yaş, ırk, coğrafi faktörler ve genetik geçmişe göre değişmektedir [4].

Kanser türlerinin çoğu spontan oluşup geliştiği bilinmekle beraber bazılarının ailesel genetik mirastan temel aldığı bilinmektedir. Bozulmuş DNA zincirine sahip kişilerin alt soya otozomal dominant veya otozomal resesif gen aktarımına bağlı olarak kansere yatkınlığı artabilir. Ailesel kanserler her iki cinsiyette eşit ve aynı koşullarda yaşayan yaşlılarına göre daha erken yaşta ortaya çıkabilir [5].

Genel olarak kanserin tespit edilebilmesi için hücre topluluğunun 1 cm büyüklüğe ulaşması, yani 1 milyon hücreden oluşan bir yapı haline gelmesi gerekmektedir. Bu noktada bu hücrelere “kitle”, “tümör”, “nodül”, “yumru” veya “lezyon” denilebilir. Bu genel kanıların istisnaları arasında kan ve kemik iliği kanserleri (lösemi ve lenfomalar) yer almaktadır. Bu kanser türleri sıklıkla “kitle” oluşturmayan ancak laboratuvar testlerinde açıkça ortaya çıkan kanser türleridir [1].

2.1.1. Kanser hücrelerinin özellikleri

Kanser hücreleri, oluştukları hücrelerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerini korusalar da tümör oluşumu sürecinde sağlıklı hücrelerin özelliklerine ek şu özellikleri de kazanırlar; Kanser hücreleri ise normal hücrelerin sahip olmadığı birçok özelliğe sahiptir [15].

- Kanser hücreleri büyüme sinyalleri reseptörlerine daha çok afinitedir. Kontrolsüz şekilde hücre çoğalmasını sağlayan kendi iletişim sistemleri mevcuttur.
- Kanser hücreleri bitişikteki hücreye temas etse bile hücre bölünmesini durdurmaz çoğalmaya ve büyümeye devam eder
- Normal hücreler her çeşit besin kaynağını enerjiye döndürebilirken kanser hücreleri sadece glikozu kullanarak enerji oluşturabilirler. Dolaşım sisteminden glikozu yaklaşık 100 kat fazla olarak çeker ve laktat üreterek enerji üretimini sağlarlar (Warburg etkisi).
- Hücre devamlılığını sağlamak için gerekli besin ve oksijeni elde etmek üzere çevrelerindeki stromayı etkileyerek kendine ait yeni damar sistemleri oluşturabilirler (neo-vaskülarizasyon)
- Telomerlerini sabitleyerek veya telomeraz işleyişini koruyarak sonsuz kere çoğalabilirler

- Dolaşım sistemine girerek uzaktaki doku ve organlara taşınabilir ve yeni bir yerleşerek bu alanda büyüüp çoğalarak kanserleşmeyi başlatabilirler (metastaz)
- Apoptoz sürecine giremeyerek ölümsüz hücre haline dönüşebilirler.
- Genetik ve epigenetik olarak durağan değildirlerdir [4,15,21].



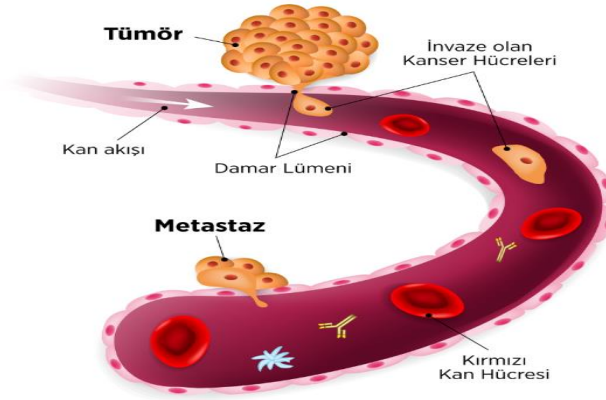
Şekil 2.1: Kanser Hücresinin Fizyolojik Özellikleri [16]

Kanser hücrelerinin köken aldıkları dokulardan farklı doku ve organlara göç etmelerine metastaz denir. Metastaz pek çok biyokimyasal ve moleküler faktör tarafından yönetilen çok aşamalı bir süreçtir. Bu süreç, şöyle işlemektedir; Hücreler köken aldığı dokudan ayrılarak kan veya lenf dolaşımına geçerler (intravazasyon) ve daha sonra dolaşım sisteminden ikincil başka bir dokuya geçerek (ekstravazasyon) bu dokuda çoğalarak yerleşmeye çalışırlar [5]

Metastaz döngüsünün önlenmesi kanser tedavisi için çok önemlidir. Kanser hücrelerinde metastaz, karmaşık bir süreçtir ve kanser tedavilerinde sınırlayıcı bir faktör olup kanser nedeniyle ölümlerin %90'ından metastaz sorumludur. Bu nedenle kanser metastazında altta yatan mekanizmaların aydınlatılması kanser metastazının önlenmesine yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi klinik açıdan önemlidir [5,17,18].

Ancak, dokudaki ilk konumunu terk eden hücrelerin yalnızca çok az bir kısmı hayatta kalır ve uzak bir bölgede bir tümör oluşturabilirler [5]. Metastaz yapma özelliğine sahip olan tümörlere malign yani kötü huylu tümörler demektir. Metastaz kabiliyetinden yoksun olan tümörlere ise benign ya da diğer bir deyişle iyi huylu tümör denmektedir. Kötü huylu hücrelerin hayatta kalmaları için özel bir mikro-ortama,

destekleyici bir damar sistemine ve çok çeşitli kemokinlere, sitokinlere ve büyüme faktörlerine ihtiyaçları vardır [5,17].



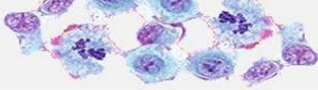
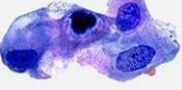
Şekil 2.2: Kansere Hücresinin Metastaz Aşamaları [19]

Kansere hücrelerinin çoğalıp büyümesinin önüne geçmenin en önemli aşamalarından bir tanesi de hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını baskılamaktır. Büyüme faktörleri vücutta üretilir ve hücresel metabolizmada önemli görevlerde bulunurlar, hücredeki reseptörlere bağlanarak hücrenin büyümesini veya ölmesini sağlarlar. Büyüme faktörlerinden en çok bilimsel olarak bahsedilenler; Epidermal büyüme faktörü (EGF), damar endoteli büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) olarak sıralanabilir. Bunlar haricinde birçok büyüme faktörü mevcuttur onlarda farklı metabolizma yollarında aktifler ve hücrenin büyümesinde önemli rollerde görev alırlar [5,20,24].

Hücre büyümesini baskılayıcı inhibitörler yaptıkları engelleme tipine göre tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ), mTOR inhibitörleri, proteazom inhibitörleri, fosfoinositid-3 – kinaz (PI3K), histon deasetilaz inhibitörleri olarak alt gruplara ayrılırlar [21].

Kansere hastaları içinde özellikle ileri bir aşamada teşhis alanlar için hayatta kalma oranları son derece düşüktür. Kansere erken evresinde teşhis alan hastalar, daha ileri evredeki kansere hastalarına göre hızlı iyi iyileşme ve yüksek sağ kalım oranına sahiptirler [4].

Tümörlerin birçok değişik proteinin kana salıverilmesini indüklediği bilinmektedir. Bu proteinler, oluşan çeşitli değişiklikler sebebiyle yabancı moleküller olarak görünürler ve bağışıklık sisteminin aktifleşmesine neden olurlar [22]. Kansere riski yüksek bireylerin serumlarında otoantikörlerin varlığı, kansere oluşumunu önceden bildirebilir ve klinik tanı ve prognostik bilgiler için önemli bilgiler verir [23].

Normal hücre	Kanser hücresi	Farkları
		Çok daha büyük ve farklı şekillerde hücre çekirdeği
		Çok sayıda bölünen hücre ve Düzensiz hücre dizimleri
		Hücre boyutu ve şeklinde farklılıklar Hücre içindeki organellerin şekilleri bile düzensizdir
		Normal özelliklerin kaybı

Şekil 2.3: Normal Hücreler İle Kanser Hücresinin Karşılaştırılması [16]

2.1.2. Kanser türleri

Tümörler köken aldığı hücre ve dokulara göre adlandırılır. Tamamen farklılaşmış olgun epitel dokusundan köken alan kanserler karsinom, eğer tümörün kökeni salgı üreten epitel hücrelerinden kökenleniyorsa adenokarsinom olarak adlandırılır. Mezenşimal dokulardan köken alan kanser ise sarkoma olarak adlandırılır. Sınıflandırma sistemi, tümörün büyüklüğünü, bölgesel lenf düğümlerinin tutulumunu ve uzak metastazı değerlendirmesi temeline dayanmaktadır [1,2,5,20].

Tümörler aynı zamanda köken aldığı hücreye benzerliğine göre de sınıflandırılabilir. Köken aldığı dokunun hücrelerine morfolojik, fonksiyonel olarak benzerlik veya farklılaşma derecesini belirler. Buna göre, iyi farklılaşmaya sahip olma köken aldığı hücreye benzerliğin fazla olduğunun göstergesidir. Kötü farklılaşma ise köken aldığı dokuya benzerliğin çok az ya da hiç olmadığının göstergesidir [1,2,5,20].

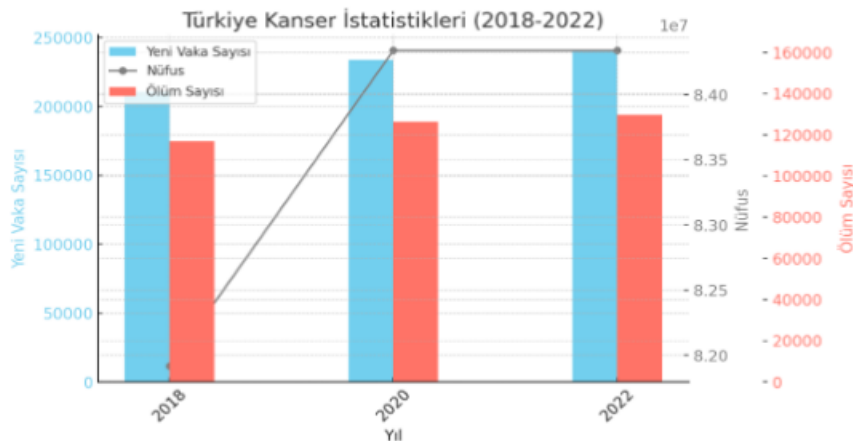
Vücutta kanserin ortaya çıktığı doku ve organ göz önüne alınarak sınıflandırılır. 100'e yakın kanser türü olduğu bilinmektedir. Bunlardan bazıları şunlardır: Akciğer kanseri, prostat kanseri, meme kanseri, over (yumurtalık) kanseri, bağırsak kanseri, mesane kanseri, böbrek kanseri, mide kanseri, karaciğer kanseri, rahim kanseri, pankreas kanseri, nazofarenks (üst yutak) kanseri, beyin tümörleri, cilt kanseri, rahim ağzı kanseri, göz kanseri, testis kanseri ve özofagus kanseri bunlardan sadece birkaçıdır [23].

2.1.3. Kanser istatistikleri

Dünya da kanser türlerinden ölüm oranları 1,8 milyon ölümle yani %18 oranla akciğer kanseridir. Bunu %9,4 oranla kolorektal, %8,3 oranla karaciğer, %7,7 ile mide ve %6,9 oranla meme kanserleri izlemektedir. Kansere bağlı ölüm nedenleri yıllar geçtikçe artmaktadır ve gerekli önlemler alınmazsa her geçen yıl çoğalarak daha da artacağı tahmin edilmektedir [25,26].

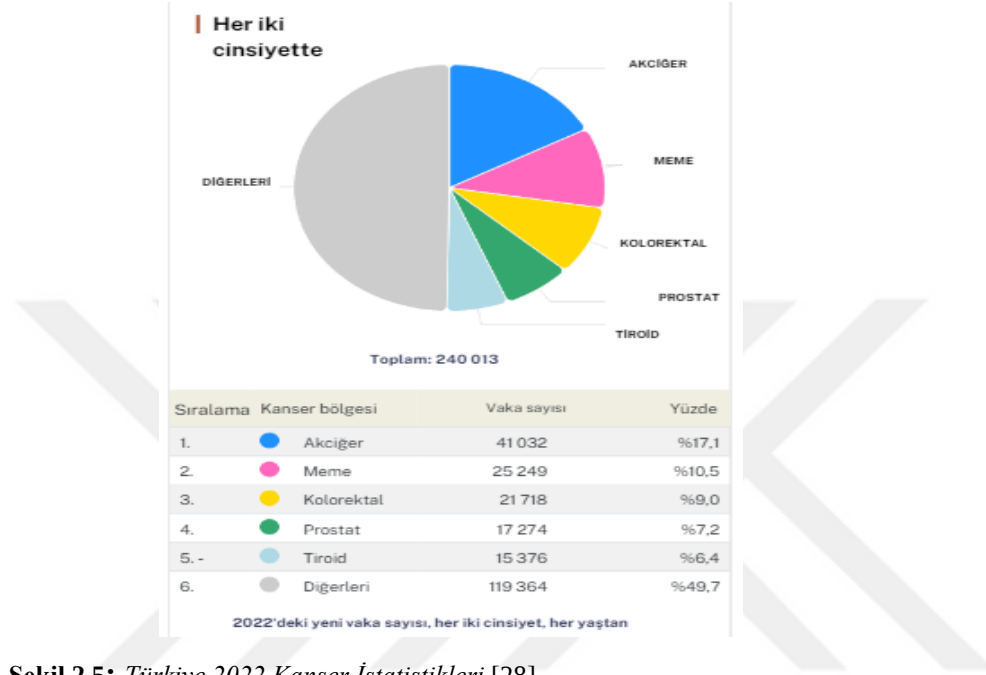
Kanser, dünya genelinde milyonlarca insanı etkileyen ve her yıl milyonlarca yeni vaka oluşturan bir hastalıktır. Türkiye'de T.C. Halk Sağlığı Müdürlüğüne bağlı Kansere Daire Başkanlığı tarafından yayınlanan son kanser verileri göre, ülkenin nüfusu artış göstermekte ve bununla beraber yıllık yeni tanı alan kanser hasta sayısı da aynı oranda artmaktadır. 2020 yılında Türkiye'nin nüfusu 84.339.067 olarak kaydedilmişken, yıllık yeni kanser vaka sayısı 233.834 ve kansere bağlı yaşam kaybı sayısı 126.335 olarak bildirilmiştir. Bu veriler, 2018 yılına kıyasla artış göstermektedir. Türkiye nüfusu 81.916.866 iken, yeni vaka sayısı 210.537 ve kansere bağlı yaşam kaybı sayısı 116.710 olarak kaydedilmiştir [27,28].

Dünya Sağlık Örgütü'ne ait bir kuruluş olan Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı (IARC)'nın bir parçası olan ve çevrimiçi olarak erişilebilen GLOBOCAN 2022 veri tabanının küresel kanser yüküne ilişkin 2022 Türkiye verilerini şu şekilde paylaşmıştır. 2022 yılında Türkiye nüfusu 85.561.976 iken, 2022 yılı yeni kanser vaka sayısı 240.013 ve kansere bağlı yaşam kaybı sayısı 129.672 olarak bildirmiştir [28].



Şekil 2.4: 2018-2022 Yılları Arasında Türkiye Kansere İstatistikleri [27]

2022 yılında ülkemizde en çok teşhisi konulan ilk 5 kanser türü, akciğer kanseri, meme kanseri, kolorektal (kalın bağırsak) kanser, prostat kanseri ve tiroid kanseridir. Bu 5 kanser türü, tüm kanserlerin %50'den fazlasını oluşturur. Aşağıdaki şekil 2.5 2022 yılı yeni kanser vakaları oransal olarak ifade edilmiştir [28].



Şekil 2.5: Türkiye 2022 Kanser İstatistikleri [28]

Erkeklerde en çok rastlanan ilk beş kanser çeşidi akciğer kanseri, prostat kanseri, kolorektal kanser, mide kanseri ve mesane kanseridir. Kadınlarda ise en çok saptanan ilk beş kanser türü meme kanseri, tiroid kanseri, kolorektal kanser, rahim kanseri ve akciğer kanseridir. Kanserden en çok etkilenen organlar akciğerler, göğüsler, beyin, kolon, rektum, karaciğer, mide, deri ve prostattır. Erkeklerde ve kadınlarda en fazla ölüme neden olan ise akciğer ve kolon kanseridir [26,29,30].

Malignite (kötü huylu tümör) histopatolojik tipine göre 50 ve 60 yaş üstü yaşlarda daha yoğun olmak üzere her yaşta ortaya çıkabilir. Her hastada belirgin ve sadece kansere özgü olmayan bazı belirtiler mevcuttur. Bunlar, ağrı, yorgunluk, mide bulantısı, inatçı öksürük, nefes alma güçlükleri, kilo kaybı, kas ağrısı, kanama, morarma vb. şekilde çoğu hastalıkta gözlemlenecek belirtilerdir [30].

Kanseri tetikleyen çeşitli risk faktörleri belirlenmiştir. Bunlar sırasıyla yüksek vücut kitle indeksi, tütün ve tütün ürünleri kullanımı, meyve ve sebzeden fakir beslenme, alkol kullanımı, fiziksel aktivite eksikliği, HPV (Human Papilloma Virus) enfeksiyonu, hepatit veya diğer kanserojen enfeksiyonlara maruziyet, UV ışınlarına maruziyeti, kentsel hava kirliliği ve fosil yakıt kullanımına bağlı iç mekân dumanı kansere neden olan risk faktörleridir [29].

2.2. Yumurtalık (Over) Kanseri

Kadınlarda üreme organlarını etkileyen beş farklı tip kanser türü vardır: bunlar sırayla servikal, yumurtalık, uterin, vajinal ve vulvardır. Yumurtalık kanseri dünyada tüm kanser çeşitleri arasında en sık görülen on sekizinci kanser çeşiti iken kadınlarda en sık görülen beşinci kanser çeşitidir. Jinekolojik kanserler içinde ise ikinci sıradadır [26,]. Kadınlarda rastlanan kanserler türleri arasında %4'lük bir paya sahipken, jinekolojik kanserler arasında ise %27 paya sahiptir [26,31-33,46].

Türkiye de ise en sık görülen yedinci kanser türü olduğu bilinmektedir. Dünya genelinde ortalama her yıl 239 000 kadına yumurtalık kanseri teşhisi konulmaktadır bununla birlikte 152 000 kişi ise bu sebepten hayatını kaybetmektedir [26,28].

Yumurtalık kanserinin, histolojik, biyolojik özellikler ve hücrel köken açısından oldukça heterojen ve karmaşık bir neoplazm olarak erken evrede belirti vermeyen en ölümcül jinekolojik kanser türlerinden biri olduğu raporlar edilmiştir. Yumurtalık kanseri hastalarının büyük çoğunluğu ileri evrede hastalık tanısı alır [31,32].

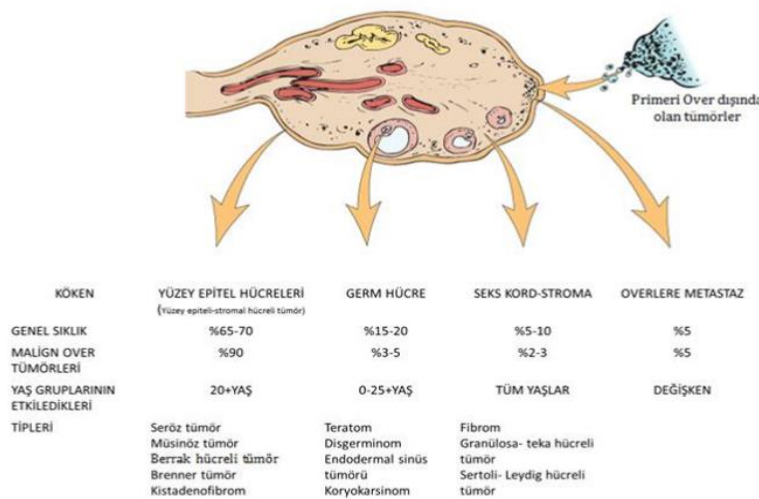
Son 20-30 yılda onkoloji alanında birçok önemli gelişmeye rağmen yumurtalık kanserine bağlı ölümlerde ciddi bir azalma sağlanamamıştır Yumurtalık kanserinde erken teşhis zor olduğundan sıklıkla ileri evrede, tümör metastaz yaptığına teşhis edilir. Bu kanser türünün yüksek mortalitesi; çoğunlukla hastaların %75'i kadarının periton boşluğunda yaygın metastatik hastalıkla birlikte ileri evrede teşhis alması ile açıklanmaktadır. %80 yanıt oranıyla sonuçlanabilen cerrahi ve adjuvan kemoterapi gibi agresif ön tedavi tedavilerine rağmen, çoğu hastada ilerlemiş yumurtalık kanseri genellikle tedavi edilemez haldedir ve evre III-IV yumurtalık kanseri tanısı alan kadınlarda, büyük ölçüde kemo-direnç ve metastazla ilişkili asit gelişimine bağlı olarak %25'in altında 5 yıllık genel sağ kalım süresi ile tüm jinekolojik kanserler arasında hastalık seyri en kötü olan kanser türüdür [31-34].

Bu nedenle yumurtalık kanseri tedavisinde daha etkili tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini kolaylaştırmak için kanser metastazı altında yatan mekanizmaların tam olarak anlaşılması gerekmektedir. [31-34]

Yumurtalık kanseri risk faktörleri üzerine yapılan bir meta- analiz çalışmasında; Beslenme, ilaç kullanımı, geçirilmiş veya sahip olunan hastalıklar ve genetik faktörler olmak üzere dört ayrı sınıfta ele alınmışlardır. Bu meta-analizde, beslenme faktörü sınıfında kahve, yumurta ve yağ tüketiminin yumurtalık kanseri riskini arttırdığı, ilaç kullanımı sınıfında ise, östrojen ve östrojen- progesteron tedavileri gibi hormon tedavisi gören kişilerde yumurtalık kanseri riskinin arttığı bildirilmiştir [32,35,37].

Çeşitli hastalık öyküsüne sahip olan kişilere örnek olarak diyabet, endometriyoz, PKOS gibi hastalıklar, ayrıca genetik faktör olarak tümör baskılayıcı olarak bilinen BRCA1, BRCA2, CHEK2, MRE11A, RAD50, ATM ve TP53 genlerindeki kalıcı mutasyonlara sahip kişilerin yumurtalık kanseri ile karşılaşma oranlarının daha yüksek olabileceği gözlemlenmiştir. Bu risklerin aksine ise üç aylık emzirme süresinin yumurtalık kanseri riski için koruyucu bir faktör olabileceği bildirilmiştir [31-36].

Yumurtalık tümörlerinin büyük çoğunluğu üç yumurtalık hücre alt tipinin birinden gelişir: bunlar epitelyal hücreler, seks kordonu-stromal hücreler ve germ hücreleridir. Epitelyal hücrelerden kaynaklanan tümörler, malign vakaların yaklaşık %90'ını oluşturur, bunu %5-6'sı seks kord-stromal hücrelerden ve %3'ten azı da germ hücrelerinden kaynak alır [31-34].



Şekil 2.6: Yumurtalık Kanseri Türleri ve Sınıflandırılması [38]

Yumurtalık kanserinde evrelendirme ve metastaz tespiti için bilgisayarlı tomografi (BT), cerrahi işlem sonrası elde edilen histolojik ve sitolojik bulgular ve serum tümör biyo belirteçleri kullanılmaktadır [31-35].

Erken evre over kanseri olan kadınlar çok az semptom yaşarlar. İleri evrelerde ise karın ağrısı karında asit birikimi sonucu şişmesi, kusma, erken doyma ve sık veya acil idrara çıkma gibi spesifik olmayan semptomlar görülebilirken bu semptomlara ek sırt ve karın bölgesinde ağrı, plevral efüzyon, aşırı kilo kaybı ve bağırsak tıkanıklığı gibi belirtiler eklenebilir [31,32].

İlerlemiş yumurtalık kanseri sıklıkla periton boşluğu ve iç organların yüzeylerinde bulunan çoklu tümör nodülleri olarak kendini gösterir. Bu tümör nodülleri, hücre büyümesini ve hayatta kalmasını sürdürmek için hayati önem taşıyan besin ve oksijenin dağıtımını kolaylaştıran iyi gelişmiş damar ağları sergiler. İleri yumurtalık kanserinde benzersiz periton mikro ortamının önemi göz önüne alındığında, benzer bir klinik öncesi *in vivo* modelin kullanılması yumurtalık kanseri araştırmalarının ilerletilmesi için çok önemlidir [32,41].

Yumurtalık kanseri için başlangıç tedavisi, kitle küçültme ameliyatı veya hastalığın evresine göre kemoterapötik ajanlar kullanılmasıdır. Geçmişte yumurtalık kanserinde kemoterapi tedavisi platin çeşitlerinden sisplatin veya daha az toksik olan karboplatin ile uygulanmaktaydı [31,32]. Günümüzde ise paklitakselin yumurtalık kanserine karşı etkili olduğunun bulunmasının ardından karboplatin ile paklitaksel karışımın üç kür halinde hastaya uygulanması yumurtalık kanserinin tedavisinde altın standart haline gelmiştir [39].

Yumurtalık kanserinin kemoterapiye yanıt oranı iyi olsa da büyük ölçüde birinci basamak kemoterapötik ajanlara direnç gelişmektedir. Yüksek doz kemoterapötik ajan kullanımına bağlı olarak komplikasyon oluşabilir tedavi planının kesilmesine neden olabilir. Bu nedenle, yumurtalık kanserine karşı yeni terapötiklerin keşfine büyük ihtiyaç vardır. Son zamanlarda antianjiyojenik ajanlar ve poli (ADP riboz) polimeraz (PARP) inhibitörleri gibi sitotoksik ajanlar yumurtalık kanseri tedavi şemasına dahil edilmiştir [24,31,41].

Yumurtalık kanseri tedavisinde başka bir yaklaşım ise mitokondriyal homeostaz, özellikle mitokondriyal fisyon odaklanır. Yoğun bir şekilde gerçekleşen mitokondriyal fisyon, kanser hücresinin zarar görmesinin ardından da ATP tükenmesine neden olarak

hücre proliferasyonunu daha da bozarak apoptoz yollarını tetikler. Mitokondriyal fisyon, ROS kaynaklı oksidasyon yolağıyla hücre ölümünü başlatır [43].

Mitokondriyal fisyon, kanser hücrelerinin çoğalmasını, metastazını ve hayatta kalmasını engellemek için potansiyel bir hedef olarak kabul edilmiştir. Bu bulgular ışığında, mitokondriyal fisyonu tetikleyen stratejilerin, kanser önleyici ilaç tasarımında önemli olacağı sonucuna varılmıştır [43-45].

Tümör biyobelirteçleri, yumurtalık kanseri teşhisinin konulmasına ve hastalık sürecinin yönetiminde önemli bir rol oynarlar. Karbonhidrat Antijeni 125 olarak da bilinen CA-125, over kanseri hücrelerinin yüzeyinde bulunan yüksek moleküler ağırlıklı müsinöz bir glikoproteindir [31,32].

CA125 düzeyleri evre I yumurtalık kanserinin %50'sinde, evre II'lerin %90'ında artmış olarak bulunmuştur. Over kanseri hastalarının serum örneklerinde yüksekliği fark edilmeye başlanır ve son kırk yıldır over kanserinin taranması, saptanması ve yönetilmesinde önemli rol oynar. Bir diğer biyobelirteç ise mezotelindir. Mezotel hücrelerinde bulunan hücre proliferasyonu, progresyonu ve adhezyonu ile ilgili bir proteindir. Over kanserli kadınların %40-67 sinin kan örneklerinde artmış mezotelin seviyeleri görülmektedir. Tanı ve hedefe yönelik tedavi için önemlidir [32,39].

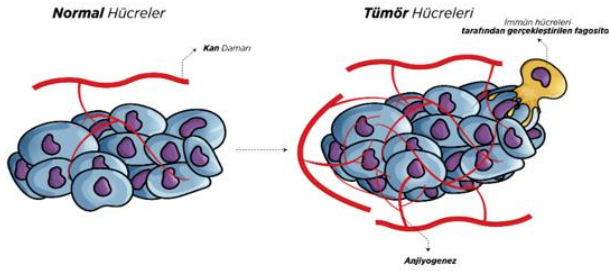
Diğer bir üzerinde çalışılmış biyobelirteç olan karsino embriyonik antijenin; ileri evre epitelyal tümörlü hastaların %30-65'inde arttığı gözlemlenmiştir. İleri evre over kanseri olan hastaların yaklaşık %60'ında artmış serum lipid-ilişkili sialik asit düzeyleri vardır. Human Kallikrein 2 ise over karsinomu için diğer bir potansiyel serolojik belirteç olarak kabul edilir [39].

2.3. Anjiyenez

Anjiyenez, vücuttaki kimyasal sinyaller tarafından kontrol edilen, kan damarlarının iç duvarını kaplayan endotel hücrelerinin göçü, büyümesi ve farklılaşması yoluyla yeni kan damarlarının oluşumu olarak adlandırılır. Anjiyogenezi tetikleyen dört ana sinyal yolağı mevcuttur. Bunlar sırasıyla vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) olarak sayılır. Mevcut bulunan damarların tomurcuklanması ile yeni damar ağının oluşumu şeklinde de tarif edilen anjiyenez, “noevaskülarizasyon” olarak da isimlendirilmektedir [24,40,43,50].

Fizyolojik anjiyogenez; embriyogenezde, yara iyileşmesinde ve kadın üreme sisteminde rahmin gebeliğe hazırlanması sürecinde görülür. Ayrıca anjiyogenez inflamatuvar hastalıklarda, birtakım kanserlerde ve göz ile ilgili bazı hastalıklarda patolojik olarak meydana gelir [24,41,44].

Tümör anjiyojenezi; tümör hücresinin 100-200 μm 'nin üzerinde büyüyüp gelişmesi için ihtiyacı olan oksijeni ve besini sağlamak için yeni damarların oluşturarak tümör hücrelerin köken aldığı bölgeden başka bölgeye göç etmesi ve yeni taşındığı bu bölgede büyüyüp gelişmesi için gerekli bir olaydır. Çünkü, kan desteği olmayan kanser kolonilerinde, tümör 1-2 mm çapı geçemez, yeni damarlanma oluşmaz ve metastaz yapamaz. Anjiyogenezin kontrol edilmesi, kanser hücrelerinin proliferasyon, göç ve metastaz aşamalarının ilerlemesinin durdurulması potansiyel tedavi için kritik bir adımdır [24,41,44].



Şekil 2.7: Kanser Hücresinin Anjiyojenezi İle Yeni Damar Oluşturması [16]

1971 yılında Folkman, tümör dokusunun büyümesi, canlılığını devam ettirmesi için gereken besin ve oksijeni sağlanması ve tümörden metabolit artıkların uzaklaştırılması için kan dolaşımına ihtiyaç duyulduğunu rapor etmiştir. Ayrıca kan dolaşımının tümörlerin istilasına, metastazına ve kanserin şiddetlenmesine yardımcı olduğunu belirtmiştir. Bu görüşe dayanılarak mevcut tümör damar sistemini bozmak ve yeni kan damarlarının oluşumunu engellemek için anti-anjiyojenik ilaçlar geliştirilmiştir. Teorik olarak, anti-anjiyojenik tedavinin tümör oluşumunu engelleyici net bir etkisi vardır, ancak yapılan birçok klinik öncesi ve klinik çalışmada anti-anjiyojenik ilaçların kısa süreli uygulamasının terapötik bir etkiye sahip olabileceği, fakat uzun süreli kullanımlarının tümörlerin merkezi bölgesinde vasküler nekroza yol açtığı, bunun da tümör hücrelerinin

kemoterapiye duyarlılığının azalmasına ve ilaç direncinin gelişmesine neden olduğu sonucuna varılmıştır [15,17,18,24,44,50].

Bu durumun açıklanması hipoksiye dayandırılmaktadır. Hipoksi tümör hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara karşı direnç geliştirmesi için birincil tetikleyicidir. Hipoksi altında, HIF1a ve TME'de üretilen diğer genler uygun şekilde parçalanmaz ve böylece transkripsiyonel genler gibi hareket ederek, hücre büyümesi ve anjiyogenez ile ilgili genlerin ekspresyonunu artırarak tümör hücrelerinin kemoterapi karşı direnç oluştururlar [15,17,18,24,44,50].

Tümör anjiyogenezini engellemek için geliştirilen başka bir görüş ise vasküler normalizasyon stratejisidir. Anti-anjiyojenik ilaçların müdahalesiyle, anormal kan damarları yavaş yavaş normal yapılarına ve işlevlerine kavuşabilir, tümör kemoterapisi için bir zaman penceresi sağlar ve ilaç direncinin oluşmasını önler [42,48].

Son çalışmalar, VEGFR, FGFR ve PDGFR gibi anjiyojenik büyüme faktörlerini hedefleyen ilaç veya antikör ile anjiyogenezin inhibe edilmesinin birçok solid tümör üzerinde potansiyel bir terapötik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Tümör anjiyogenezinde rol oynayan diğer molekülleri hedef alan inhibitörler üzerinde çok az çalışma vardır. Bu nedenle, ilaç hedefi olarak potansiyellerini doğrulamak ve yeni anjiyogenez inhibitörlerini keşfetmek için ek hedefler üzerinde daha derinlemesine geliştirmeye ihtiyaç vardır [24,41].

2.3.1. Tüp formasyon testi

Tüp oluşum testi, anjiyogenezde rol alan genleri ve anjiyogenez aşamalarını belirlemek için kullanılan hızlı ve nicel bir yöntemdir. İlk olarak 1988 yılında yapılan bu test ile, damar oluşturma yeteneğine sahip endotel hücrelerinin anjiyojenik sinyallere cevap olarak hızla bölünerek başka yerlere transfer olduğu tespit edilmiştir. Gelişen bilimin ışığında endotel hücrelerin, membran ekstrakt matriksini farklılaştırarak tüp yapıları oluşturma yeteneğine sahip olduğu saptanmıştır. Bu tüpler, birleşmiş kompleksler vasıtasıyla birbirine bağlanmış endotel hücreleri ile çevrelenmiş bir lümen içerir [42,50].

Tüp oluşumu, anjiyogenik sinyallerin sıklığı ve türüne bağlı olarak 2-6 saat içinde gerçekleşir. Tüp formasyon testinde türlü endotel hücreleri arasından en çok 3B11,

SVEC4-10 ve HUVEC hücre hatları tercih edilir. Kullanılan hücre çeşidi ve endotel hücrelerin transforme veya nontransforme özelliklerine göre, tüp oluşum testi için uygun zaman ve koşullar oluşturulur [42,50].

2.4. Antidepresanlar

Antidepresanlar, duygu-durum bozukluklarının tedavisinde uygulanan ve tedavi aşamasında uzun kullanımlar gerektiren ilaçlardır. Antidepresan ilaçlar beyindeki serotonin, dopamin ve noradrenalin gibi nörotransmitterlerin gerilimini inhibe ederek ve muskarinik, histaminik (H1), alfa-1 adrenerjik, dopaminerjik (D2) ve muhtemelen serotonerjik (5-HT_{2A}) reseptörleri bloke ederek etkilerini doğrudan veya dolaylı olarak depresyondaki hastaların duygu durumunu değiştirmeye çalışmaktadırlar [51,52].

Klinikte kullanılan antidepresan ilaçlar kimyasal yapısı ve oluşturduğu duygu durumuna göre sekiz grup altında toplanır. Bunlar trisiklik antidepresanlar (TCA'lar), monoamin oksidaz inhibitörleri (MAOI'ler), seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI'lar), noradrenerjik ve spesifik serotonerjik antidepresanlar (NaSSA'lar), serotonin ve noradrenalin geri alım inhibitörleri (SNRI'ler) ve diğerleri olarak sınıflandırılırlar. Tablo 2.1'de antidepresanların sınıflandırılması, bu sınıflarmada yer alan ilaç etken maddelerine örnekler ve bu ilaçların etki mekanizmaları verilmiştir [51,52].

Tablo 2.1: Antidepresanların Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması [51]

Antidepresanların sınıflandırılması	Örnekler	Etki Mekanizması
TCA	Amitriptilin Amoksapin Desipramin	Monoamin taşıyıcı pompalarını bloke ederek sinaptik aralıkta monoamin nörotransmitterlerini arttırma yolu ile depresyonun iyileşmesini sağlarlar
MAOI	İzokarboksazid Fenelzin Tranilsipromin	Monoamin nörotransmitterleri parçalayan MAO (monoaminoksidaz) enzimini inhibe ederek hastalığın düzelmesini sağlarlar
SSRI	Fluoksetin Paroksetin Sertralin	Serotonin (5-hidroksitriptamin;5-HT) geri alımını engelleyerek etki gösterirler
SNRI	Venlafaksin Milnacipran Duloksetin	Serotonin ve norepinefrinin geri alımını iki yönlü ve selektif olarak inhibe ederler
Dopamin-norepinefrin geri alım inhibitörleri	Bupropion	Dopamin ve norepinefrinin sinaptik boşluktan geri alımını engelleyerek işlev görürler
Serotonerjik antidepresanlar	Nefazodone Tianeptine Trazodone	Hem serotonin reseptörlerini hem de serotonin geri alımını inhibe ederler
NaSSA	Mianserin Mirtazapin	Monoaminleri veya monoamin geri alım pompalarını inhibe etmeden serotonin ve noradrenalin düzeylerini arttırırlar
NRI	Reboksetine Maprotilin	Sinaptik boşluktaki noradrenalin geri emilimini çok güçlü olarak inhibe ederken serotonin geri alımı üzerine çok az etkiye sahiptir

Trisiklik Antidepresanlar (TSA): İlk olarak 1959 yılında majör depresyonun tedavisinde kullanılan birinci kuşak antidepresanlardır. Serotonin ve noradrenalin geri alım pompalarını çok az da dopamin geri alım pompalarını inhibe ederek etki gösterirler. Depresyonun yanı sıra obsesif kompulsif bozukluklar, panik bozukluklar, uykusuzluk, migren ve nöropatik ağrı rahatsızlıklarda da reçete edilir [51,53].

Opipramol, klomipramin, imipramin, amitriptilin, maprotilin etken maddeleri trisiklik antidepresan grubunda yer alır. Yan etkileri sedasyon, konstipasyon, baş dönmesi, bulanık görme ve kan basıncı düşüklüğü ve intihar girişimini tetiklediği için ölüm riskini arttırdığından kullanımı azalmıştır [51,53].

Monoamin Oksidaz inhibitörleri (MAOI): İlk olarak üzerinde çalışılarak geliştirilen antidepresanlardandır, monoamin oksidaz A ve B enzimlerini geri dönüşümsüz olarak inhibe ederler. Monoamin oksidaz A çoğunlukla adrenalin, noradrenalin ve serotoninini metabolize ederken Monoamin oksidaz B seçici olarak dopamini metabolize eder. Nöropsikiyatrik ve nörodejeneratif bozuklukların tedavisi için ilaç geliştirilmesinde önemli hedefler olmuşlardır. Diyetle alınan aminler ile etkileşime girerek kan basıncında ani yükselmeler tespit edildiği için kullanımı sınırlı olmuştur. Bu türlü yan etkileri önlemek için geri dönüşümlü MAO inhibitörleri (RIMA) geliştirilmiştir [51,54].

Noradrenalin ve Dopamin Geri Alım İnhibitörleri (NDGI): Bupropion; noradrenalin ve dopamin geri alım inhibitörlerinin tek örneğidir. Serotonerjik veya post sinaptik reseptörlere etkisinin olmamasına rağmen diğer antidepresan etken maddeler kadar etkilidir. En sık rastlanan antidepresan kullanımı kaynaklı yan etkilerden olan seksüel disfonksiyona, kilo alımına ve sedasyona neden olmaz. Türkiye’de daha çok antidepresan olarak değilde sigara bırakma tedavisinde daha düşük dozda ve farklı bir preparat şeklinde kullanılmak üzere endikasyon almıştır. Yeni kuşak antidepresanların etkinliği ve güvenilirliğinin daha yüksek olduğu için bu grup ilaçların tedavide tercih edilmesi önemli ölçüde azaltmıştır [51].

Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörleri (SSRI): Depresyon tedavisinde yaygın bir kullanıma sahiptir. Presinaptik boşlukta hücre içine 5 HT’nin geri alımını seçici olarak inhibe ederek, postsinaptik aralıktaki reseptörlere bağlanması için mevcut 5-HT miktarını artırarak etki gösterirler. SSRI’lar arasında sitalopram, essitalopram, fluoksetin,

paroksetin, sertralin ve fluvoksamin bu grupta bulunan antidepresanlardır. SSRI'ların karşılaştırma çalışmalarında birbirlerine göre bir üstünlükleri bulunmadığı saptanmıştır. Ancak birine yanıt vermeyen bir olgu diğerine yanıt verebilmektedir [51,52,55-58].

Ayrıca panik bozukluğu ve OKB'de kullanımları mevcuttur. SSRI'lar, MAOI'lerden daha güvenli ve daha iyi tolere edilebilirlik profiline sahiptir. Bu avantajları ile hastaların tedaviye uyum sağlamaları daha kolay olmaktadır [51,52,55-58].

SSRI'lar sadece 5-HT'yi etkiler ve diğer nörotransmitterlere etkisi çok azdır veya hiç etkisi yoktur. Bu nedenle TCA'lara ve diğer atipik antidepresanlara göre daha az yan etkiye sahiptirler. Huzursuzluk, motor becerilerinde değişim, cinsel fonksiyonda bozukluklar ve diyare gibi yan etkileri oluşturabilirler. Özellikle ilave bir hastalığı bulunanlarda ve yaşlılarda çoklu ilaç kullanımına bağlı olarak sitokrom enzim düzeyinde etkileşimlere sebep olabilirler [51,52,55-58].

Serotonin Norepinefrin Geri Alım İnhibitörleri (SNGI): Bu grup antidepresanların ortak noktası serotonin taşıyıcısı ve noradrenalin taşıyıcısı reseptörlerin inhibisyonu ile hem serotonin hem de noradrenalin geri alımını inhibe etmektedir. TSA'lar kadar etkili ve yan etkileri daha kolay tolere edilebilen, yüksek doz alımlarda güvenli, sinaptik boşlukta serotonin ve noradrenalin geri alımını inhibe ederek ve β -noradrenerjik sistem üzerinde hızlı bir şekilde iletimi baskılayarak etki gösterirler. Venlafaksin, duloksetin ve milnasipran bu gruba ait antidepresanlardır [51,52].

Antidepresanların tümör oluşturma potansiyeli, antidepresan kullanımları arasında kanser riski araştırmalarına yönlendirmiştir. Harlow ve arkadaşları antidepresan kullanımının yumurtalık kanseri riskinin artmasıyla ilişkili olduğunu ve bunun da öncelikle 50 yaşından önce kullanıma başlayan kadınlarla sınırlı olduğunu bildirmiştir. Sonuçlar, Harlow ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada doğrulanmıştır; burada ilişki büyük ölçüde serotoninerjik yollardan ziyade dopaminerjik mekanizmalar veya GABAerjik yollarla çalışan ilaçların kullanımıyla sınırlıdır. Ancak, sonraki çalışmalar bu sonuçları tekrarlayamamıştır. Tersine, daha önce Danimarka çapında nüfusa dayalı bir çalışmada antidepresan kullanımı ile yumurtalık kanseri riski arasında ters bir ilişki olduğunu bildirilmiştir. Benzer şekilde, en son meta-analiz, antidepresan kullanımının yumurtalık kanseri riskinin %9 oranında azalmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir [57,89].

2.4.1. Serotonin norepinefrin geri alım inhibitörleri

Serotonin-norepinefrin geri alım inhibitörleri, yaygın anksiyete bozukluğu, sosyal anksiyete bozukluğu ve panik bozukluk tedavi protokolünde birinci sırada yer almaktadır. Farmakolojik aktivitesini serotonin ve noradrenalin geri alım reseptörlerini inhibe ederek gösterirler. SNGI'lar SSRI'ların güçlü serotonin inhibisyonu ile norepinefrin taşıyıcısının inhibisyonunun birleştirilmesiyle meydana gelmiştir. Bu yüzden ikili serotonerjik ve noradrenerjik geri alım inhibitörleri olarak da adlandırılırlar. SNGI'lar çift etkili olarak bilinseler de serotonine göre dopamin geri alımını daha az engellemektedirler. SNRI'lar alfa-1, muskarinik/kolinerjik ve H1 reseptör inhibisyonuna sebep olmazlar. Bu nedenle trisiklik antidepresanların yan etkilerine de sahip değildirler [51,52,58].

Serotonin ve norepinefrin artışı beynin her yerinde gerçekleşirken dopamin artışı yalnızca prefrontal kortekste gerçekleşmektedir. Venlafaksin, Duloksetin, Milnasipran bu sınıfta yer alan antidepresan etken maddelere örnektir. Venlafaksin serotonin üzerine etkisi norepinefrin üzerine olan etkisinden 3 kat daha fazladır [51,52,55,58].

Venlafaksin düşük dozlarda kullanıldığında serotonin geri alımını inhibe ederken, norepinefrin üzerine olan etkisi ise ancak yüksek dozlarda kullanıldığında ortaya çıkar. Duloksetinin ise serotonin inhibisyonu norepinefrin inhibisyonundan biraz daha yüksektir. Venlafaksin özellikle uzun süreli ve yüksek doz kullanımında aniden tedavinin sonlandırılması sonucu rahatsız edici olan kesilme belirtileri ortaya çıkmaktadır. Duloksetinde ise, bu kesilme belirtileri daha hafif olarak gözlemlenmektedir [51,52,55,58].

2.4.1.1. Duloksetin

Kimyasal olarak (+)-N-metil-3-(1-naftaleniloksi)-3-(2-tiofen) propanamin olarak adlandırılır. Serotonin ve noradrenalin geri alım inhibitörleri arasında yer alan antidepresan bir etken maddedir. Duloksetin aktivitesi yüksek bir serotonin geri alım inhibitörüdür, serotonine oranla noradrenalin geri alımı ve dopamin taşıyıcı inhibitörlere

düşük afiniteye sahiptir [57]. Serotonin ve noradrenalin nörotransmitterlerinin beyin sapı ve spinal korddan aşağı inen sinirlerde nörotransmisyon aktivitesi yüksektir. Ayrıca bu nörotransmitterlerin sinerjik mekanizmayla periferden alınan ağrı uyaranlarını merkezi sinir sistemine iletimini azalttığı gözlemlenmiştir, bu nedenle duloksetinin serotonerjik ve noradrenerjik aktivite ile santral ağrı kesici bir etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır [51,52,60].

Bu bilgiler ışığında depresyon, anksiyete bozukluğu, kronik kas iskelet sistemi ağrısı, nöropatik ağrı, fibromiyalji endikasyonlarında kullanılmaktadır. Duloksetin üriner inkontinansa da serotonerjik ve adrenerjik agonist aktiviteye sahip olmasıyla üriner sfinkter kasının daha güçlü kasılmasına yardımcı olduğu için kullanılmaktadır. Duloksetin ayrıca kanser hastalarında depresyon tedavisi için de sıklıkla reçete edilmektedir [60-64].

Duloksetinin farmakolojik ve farmakokinetik açısından incelendiğinde; Vücutta emilimi sonrasında %90 oranın üstünde plazma proteinlerinden albümin ve alfa-1 asit glikoproteinine bağlanır. Oral biyoyararlanımı %30-80 civarındadır. Yarılanma ömrü 13 saattir. Vücuttan eliminasyonu karaciğerde yer alan sitokrom p-450 (CYP 450) izoenzimlerinden CYP2D6 ve CYP1A2 izoenzimleri ile gerçekleşir. Vücuda alınan duloksetin %72'si idrarla, %19'u feçesle %1'i ise değişmeden vücuttan atılmaktadır. Tedavide protokolünde önerilen doz aralığı 20-120 mg/gündür (ortalama 40-60 mg/gün). Genellikle günde tek doz uygulanması tavsiye edilmektedir [60-65].

Duloksetin kullanımında hastalarda ciddi bir tolerans sorunu gözlenmemektedir. En sık rastlanan yan etkiler bulantı, ağız kuruluğu, yorgunluk, uykusuzluk, baş dönmesi, kabızlık, uyku hali, iştah azalması ve terlemedir. Bunlara ek olarak karaciğer enzimlerinden aspartat transaminaz (AST), alanin transaminaz (ALT), kreatin fosfokinaz (CPK) yükseltebilir, erkeklerde erektil disfonksiyon, ejakülatuvar disfonksiyon, baş ağrısı, titreme, uygunsuz antidüretik hormon sendromu, pollaküri, anafilaktik reaksiyon, Stevens-Johnson sendromu gibi yan etkiler gözlemlenmiştir [60-65].

Duloksetin tedavisi aniden kesildiğinde yoksunluk belirtileri ortaya çıkabilir. En çok gözlemlenen yoksunluk belirtiler; baş ağrısı, baş dönmesi, kusma-bulantı, ciltte yanma, batma, kaşıntı, uykusuzluk, kolay öfkelenme, kabuslar, ishal, aşırı terleme ve anksiyetedir. Bu nedenle kesilme süreci iki haftalık bir periyota yayılarak yavaş yavaş kesilmesi önerilmektedir. Tedavinin kesilme sürecinde tolere edilemeyen kesilme

belirtileri oluşması durumunda başlangıç dozuna geri dönülerek ve kesme işlemi daha da yavaşlatılıp geniş bir zamana yayılmalıdır [60,63].

Kemoterapiyle ilişkili periferik nöropati (KİPN), kanser tedavisinin sıklıkla güçten düşüren yaygın bir fiziksel yan etkisidir. KİPN, taksanlar (örneğin paklitaksel ve docetaksel), platin ajanları (örneğin karboplatin ve oksaliplatin), vinka alkaloidleri (örneğin vinkristin), proteozom inhibitörleri (örneğin bortezomib) ve hedefe yönelik monoklonal antikor (brentuksimab, trastuzumab) ile tedavi edilen hastaların %90 kadarında görülür [8,61,64,66].

Bu kemoterapötik ajanlar genellikle meme kanseri, jinekolojik maligniteler, prostat kanseri, kolorektal kanser, testis kanseri ve multipl miyelom gibi kan kanserlerinin tedavisinde kullanılır. KİPN, yanma/ateşleme ağrısı, uyuşma, karıncalanma, dokunma duyusunda azalma, azalmış proprioepsiyon, güçsüzlük, zayıf denge ve ince motor becerilerinde eksiklikler dahil olmak üzere çeşitli duysal ve motor semptomlarla karakterizedir. KİPN tipik olarak kemoterapi dozunun azaltılması, tedavinin kesilmesi veya tedavinin kesilmesi yoluyla yönetilir. Dahası, KİPN, nedensel kemoterapi ajanının kesilmesinden sonra hastaların yaşam kalitesi üzerinde derin ve kalıcı bir etkiye sahip olabilir; hastaların %42'sine kadar KİPN kronik ve sürekli hale gelir. Tedavideki hedef parestezi değil, ağrının tedavi edilmesidir. Günümüzde KİPN tedavisinde kanıta dayalı olarak etkinliği gösterilen tek tedavi olan duloksetinde nörorejenerasyon görülmez. Oksaliplatin kullanan hastaların, nöropatinin mekanizmasına bağlı olarak duloksetin tedavisine daha iyi yanıt verdikleri bildirilmiş, aynı zamanda duloksetinle daha az yan etki görülmüştür [8,61,64,66]

2.5.Hücre Çoğalması ve Sitotoksisite Testleri

In vitro hücre kültürü; sıcaklık ve CO₂ oranı kontrol altında bir ortamda hayvan kaynaklı hücrelerinin davranışını incelemek için kullanılan bir yöntemdir. Günümüzde araştırmalar sonucunda farklı hücre kültürü tipleri keşfedilmiş ve geliştirilmiştir. Hayvan kaynaklı hücre kültürleri, temel hücre biyolojisi, ilaçlar ve diğer kimyasalların hücrelerle etkileşimleri, aşı ve protein üretimi vb. incelemek için uyarlanmıştır [67].

Sitotoksiste, aktivitesi belirlenmek istenen maddenin dozuna ve muamele edilen süreye bağlı olarak hücrelerde değişik derecelerde hasar oluşması, protein sentezinin bozulmasına ve hücre zarının yapısının bozularak hücre ölümüne yol açma yeteneği olarak tanımlanan bir olgudur [68,69].

Hücreler, sitotoksik maddeye muamele edildiğinde apoptoz (programlanmış hücre ölümü), otofaji (hücresinin kendi kendine öldürmesi) ve nekroz gibi olaylar sonucu ölebilir ya da proliferasyon (hücre çoğalması) yeteneklerini kaybedebilirler [68,69].

Hücre hattı kullanılarak yapılan sitotoksiste deneyleri; tedavi edici potansiyeli yüksek maddelerin sitotoksik ve sitostatik etkileri hakkında bilgi edinmek için yapılır. Bu testler; kimyasal, biyolojik ya da fiziksel etmenlerle muamele edilen hücrelerin belirli bir süre zarfı sonrasında canlılıklarının belirlenmesinde kullanılırlar. Hücre canlılığının belirlenmesi için kullanılan çok fazla sayıda test mevcuttur. Yapılan sitotoksiste çalışmasının türü ve yöntemi ne olursa olsun, önemli olan çalışma sonundaki canlı/ölü hücre miktarının belirlenmesidir [68,69].

Sitotoksiste belirleme deney yöntemleri genel olarak kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemler olarak sınıflandırılır. Hücre sayısı tespitinde kullanılan yöntemler içerisinde, mikroskopik (tripan mavisi ile boyama thoma lamı) ya da elektronik sayıcı ile otomatik sayım gibi kullanılan yöntemlerde mevcuttur. Ancak bu yöntemler çok zaman alması ve çok sayıda numune kullanılan deneyler için uygun değildir [68].

Sitotoksiste testleri, ilaç olma olasılığı yüksek ya da toksisitesi bilinmeyen bir kimyasal maddenin hücre canlılığı ile ilgili davranışı hakkında bilgi edinmek için ve daha sonra yapılacak hayvan deneyleri için ön bir bilgi kaynağı oluşturur. Yıllar boyunca sitotoksik ajana maruziyet sonrası hücrelerin canlılığını belirlemek için çok sayıda yöntem geliştirilmiş ve her yöntemin kendine özgü avantajları ve dezavantajları keşfedilmiştir. Bu yöntemler genel olarak boyama yöntemleri, kolorimetrik, lüminesans, apoptozun ve otofajinin belirlenmesi yöntemleri olarak alt sınıflara ayrılır [68-70].

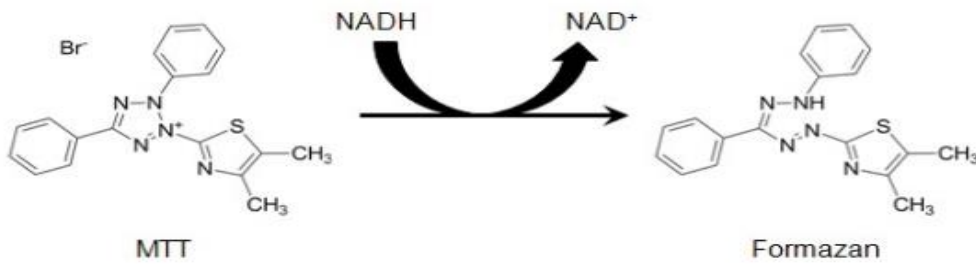
Kolorimetrik yöntemler; Sitotoksiste belirleme yöntemleri arasında en sık kullanılan ve hücre metabolizmasının aktifliğinin ölçümüne dayalı olarak hücre ölümü/proliferasyonu tespit edilmesini sağlayan yöntemlerdir. MTT, MTS, XTT, WST gibi tetrazolyum tuzlarının renk değiştirmesi ya da kristal viyole, nötral kırmızısı gibi boyar maddeler kullanarak sadece canlı hücrelerin boyanması esasına dayanan ve bu renk değişimlerinin yoğunluğunun ölçülmesi ile hücre canlılığın miktarının tespit edilebildiği yöntemlerdir [68].

Luminometrik yöntemler ise; floresans ve biyoluminesans olmak ikiye ayrılır. Floresans yöntemlerde, floresans özellikteki maddeler kullanılarak yapılırken, biyoluminesans yöntemlerde ise lusiferaz enzimleri ve bunların substratları kullanılarak canlı/ölü hücre sayısı belirlenir. Daha sonradan gelişen yeni biyoluminesans yöntemlerinde (gerçek zamanlı biyoluminesans) ise sitotoksisite tespiti sadece testin yapıldığı anda değil, deney süresi boyunca incelenebilir hale gelmiştir [68].

Bu deneylerin esası hücre hasarında ya da ölümünde hücre vasatına sızan enzimlerin miktarı ölü/canlı hücre sayısının belirleme temeline dayanır. Bu enzimler içerisinde stabilitesi enyükseklerden biri olan laktat dehidrojenaz (LDH) enzimi, hücre ölümünün miktarının tespitinde sitotoksisite testleri arasındaki yerini almıştır [68].

2.5.1. Mitokondriyal aktive belirleme mtt tesisi

MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür), iki fenil parçası ve bir tiyazolil halkası içeren üç aromatik halka ile çevrili dört azot atomu içeren pozitif yüklü bir kuaterner tetrazol halkadan oluşan bir sarı renkli mono-tetrazolyum tuzudur. Hücre çekirdeğinde MTT'nin indirgenmesi reaksiyonunda, tetrazol halkası açılır ve formazan denilen menekşe mavisi suda çözünmeyen bir molekül oluşur. MTT testinin 1983 yılında Mosmann ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir [68-71].



Şekil 2.8: Mtt'den Farmazon Oluşumu Mekanizması [68]

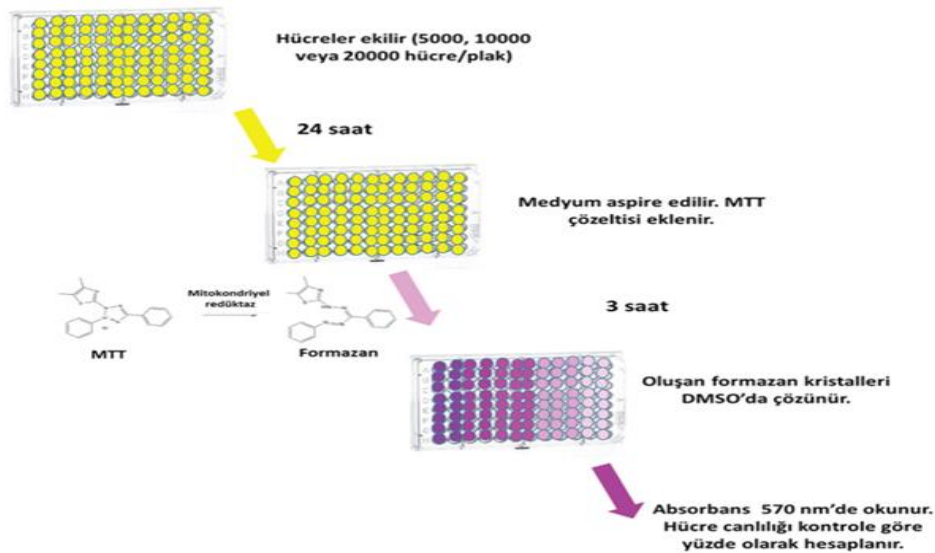
MTT tuzu pozitif yüklü olması ve lipofilik yapıya sahip olması nedeniyle hücre zarına ek olarak canlı hücrelerin mitokondriyal iç zarından da geçerek metabolik yollarla formazana indirgenir. MTT'nin hücre içi indirgenme reaksiyonuna

mitokondriyal elektron taşıma zincirine kadar olan kısma kadar glikolitik yollaklardaki oksidoredüktaz ve dehidrojenaz enzimleri ve NADPH aracılık eder [68,69].

Mitokondrinin MTT indirgenmesindeki rolü, mitokondriyal aktiviteyi ölçmek için testin yaygın olarak uygulanmasının bir gerekçesi olsa da biyokimyasal ve mikroskobik çalışmalar formazanı çeşitli hücre içi organellerde konumlandırmıştır. Hücre içi formazan granülleri endoplazmik retikulumda, sitozolik lipid damlacıklarında, plazma membranlarında, çekirdekte ve mikrozomlarda gözlenmiştir. Bu gözlemler, MTT testinin mitokondriyal aktivitenin sadece bir temsilinden daha fazlası olduğunu göstermektedir [69-71].

MTT deneyinde normal şartlar altında hücreler MTT ile birkaç saat inkübe edilir. Reaksiyon sonucu oluşan suda çözünmeyen formazan dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözündürülür. Oluşan MTT-formazan çözeltisi daha sonra en fazla absorbe ettiği dalga boyunda (570 nm civarında) bir mikro plaka okuyucu olan ELISA cihazı ile ölçüm yapılır [69].

Ölçülen değerler, formazan konsantrasyonunun ve dolayısıyla MTT'nin hücre içindeki miktarın azalmasını göstermektedir. Bu, hücre proliferasyonunu/canlılığını, ilaç sitotoksitesini ve hücrelerin mitokondriyal/metabolik aktivitesini ölçmek için kullanılan yöntemdir. Bununla birlikte, hücre canlılığı gibi ikincil süreçler veya hücre bölünmesi gibi durumları hakkında çıkarım yapmak için kullanımı giderek artmaktadır [68-70]



Şekil 2.9: Mtt Test Protokolü [68]

2.5.2 Laktat dehidrojenaz testi

Laktat dehidrojenaz, tüm hücrelerin sitoplazmasında bulunan bir enzimdir. Hücreler, sitotoksik ajanlara maruz bırakıldığında plazma membranı bütünlüğünü koruyamaz ve parçalanır. LDH enzimi bu hücrelerden sızarak medyuma geçer. Bu aşamaların sonrasında medyumda LDH enzim miktarı ölçülerek hücre hasarı değerlendirilebilir [68].

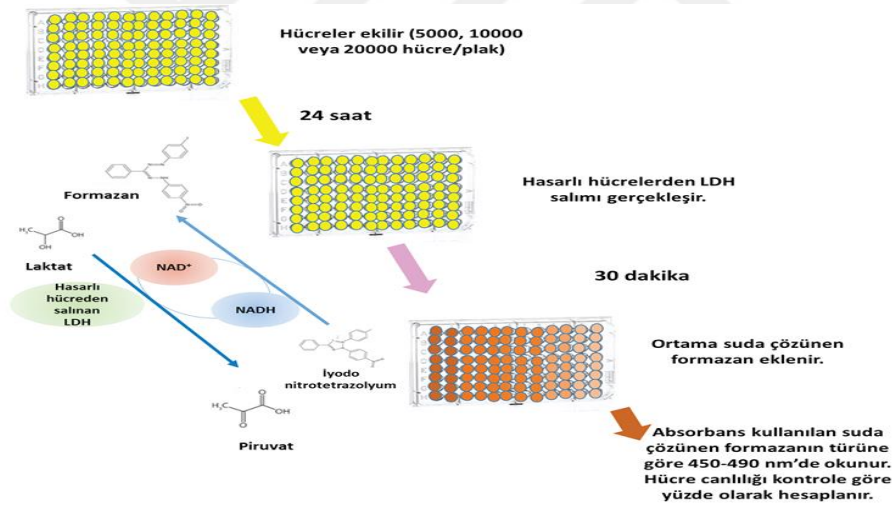
Laktat dehidrojenaz (LDH) sitotoksosite testi, apoptoz veya nekrozla oluşan hücre hasarı sonucu açığa çıkan laktat dehidrojenaz enziminin kantitatif olarak ölçülmesine dayanan kolorimetrik bir yöntemdir. LDH, her hücrede bulunan bir enzimdir ama karaciğer, böbrek, miyokard, iskelet kası ve kırmızı kan hücrelerinde daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır [68].

Laktat dehidrojenaz tüm vücut hücrelerinde mevcut iken normal şartlarda bu enzimin küçük bir miktarı kan dolaşımında mevcuttur. Enfeksiyöz veya kimyasal ajanlara maruz bırakılan hücreler, hasar gördüğünde veya canlılığı sonra erdiğinde hücrelerden kan dolaşımına salınmaktadır, bu enzim miktarındaki artış sitotoksitenin doğrudan ölçümü olarak kullanılabilir. Bundan dolayı bu test, hücelere verilen hasarın genel bir belirteci olarak kullanılır. Serumda LDH düzeyindeki artış hematolojik hastalıklar, melanom, akciğer kanseri, meme ve diğer birçok kanser türü için hastalık teşhisi koymada öncü belirteç olarak uzun yıllar boyunca kliniklerde kullanılmıştır. Son bilimsel makalelerde LDH'nin tümör hareketlerinde önemli bir rolü olduğunu göstermektedir [72].

LDH miktarının belirlenmesi için uygulanan iki farklı yöntem mevcuttur. Bu yöntemlerden ilkinde kullanılan test belirtecinin, hücrelerde toksik etki oluşturmaması nedeniyle LDH salınımını tetikleyerek test sonuçlarını değiştirebilmektedir. Bu nedenle hücrelerin toksik madde ile muamelesi sonrasında, kuyucuklardan alınan bir miktar medyumu başka bir mikropleyte aktarılır ve test belirteci eklenerek birkaç saat inkübasyon ortamında inkübe edilir []. İnkübasyon sırasında medyum bulunan LDH, pirüvatın laktata dönüşümünü katalize eder. Bu enzimatik aktivite esnasında, NADH okside olarak NAD⁺'a dönüşür. İncelenen medyumdaki NADH miktarı 340 nm absorbansta mikropleyt okuyucu ile belirlenir [68,72,73].

İkinci yöntemde ise resazurin boyası ve diaforaz enzimi kullanılır. Bu yöntemde test belirteci, direkt hücrelerin üzerine eklenir. Hücreler on dakika inkübasyona bırakılır. Bu yöntem, diaforaz enzimini medyuma bulunan NADH'ın, resazurin boyasını floresans bir madde olan resorufin'e indirgemesini katalize eder ve sonrasında floresans sinyalinin florometre ile ölçümü esasına dayanmaktadır [68,72,73].

Laktat dehidrojenaz (LDH) testi ile enzimatik aktivitenin zamana bağlı olarak azalması, pH ve medyum içeriğinden etkilenmesi, testin güvenilirliğini ve hassasiyetini azaltan dezavantajlarından bazılarıdır. Hücreler hasarlandıktan ya da öldükten sonra medyuma geçen laktat dehidrojenaz enziminin yarılanma ömrü 9-10 saat kadardır. Toksik madde ile uzun süre mumamele gerektiren çalışmalarda, LDH'nın yarı ömrü ve çoğalan hücrelerin LDH oranını değiştirdiği için ölçüm hassasiyeti düşürmektedir. Farklı hücre hatlarında medyuma salınan LDH'nın stabilitesi farklılık göstermektedir. Özellikle fibroblastların endojen LDH seviyeleri düşük olduğu için bu hücre hattıyla LDH testinde kullanımı uygun değildir [68,72,73].



Şekil 2.10: Ldh Deney Protokolü [68]

Deneyler sonucu ulaşılan verilerin doğruluğu ve güvenilirliği bilimsel açıdan çok önemlidir. Ancak araştırmacılar tarafından halen eski ve çok sayıda dezavantaja sahip yöntemlerin gerek uygulama kolaylığı gerekse maliyetinin az olması nedeniyle tercih edildiği görülmektedir. Yapılan testler sonucu varılan verilerin doğruluğu ve güvenilirliği yalnızca metoda bağlı değildir. Aynı zamanda araştırmacının gerekli bilgi ve donanımına sahip olması, kullanılan hücre tipi, ortam sıcaklığı, test belirtecinin içeriği ve vasat kompozisyonu gibi çok sayıda değişik faktöre bağlıdır. Deney sonuçlarındaki başarı, tüm bu değişkenlerin bir arada göz önünde bulundurulmasını gerektirmektedir [68,72,73].

2.6. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Reaktif oksijen türleri (ROS), oksidatif fosforilasyon sırasında oluşan oksijen tüketimi ve hücrel metabolizmanın yan ürünleri olarak kabul edilen ve tüm vücut dokuları tarafından sürekli olarak üretilen serbest radikallerdir. Reaktif oksijen türleri (ROS), serbest radikaller, süperoksit anyonları (O_2^-), hidrojen peroksitler (H_2O_2), tekli oksijenler (O_2) ve hidroksil radikalleri (OH), reaktif nitrojen türleri (RNS), nitrik oksit (NO) ve peroksinitrit anyonları ($ONOO^-$) gibi çeşitlendirilir [74].

Fizyolojik koşullar altında bu ROS hücrel antioksidan mekanizmalar tarafından, hücrel yapıya ve fonksiyona zarar vermeden hızlı bir şekilde elimine edilirken patolojik durumlarda reaktif oksijen radikallerindeki artış, antioksidan mekanizmalardaki azalmaya veya her ikisine bağlı olarak oksidatif strese artma durumu söz konusudur [74-76].

Normal şartlarda ROS un görevi mitokondriye elektron taşınmasını, kan basıncını, bilişsel işlevleri, büyümeyi, sinyal yollarını, enzimatik reaksiyonları ve bağışıklık fonksiyonlarını düzenlemektir ama yüksek konsantrasyonlarda ROS, hücrelerde yıkıma sebep olmakta ve apoptozu indüklemektedir [74-76].

Hücre dışı ROS ve RONS kaynakları arasında su ve hava kirliliği, ilaçlar, alkol, tütün, ağır veya geçiş metalleri, radyasyon ve pişirme ürünleri yer alırken hücre içinde ROS'un üretildiği çok sayıda enzim ve birden çok kısım vardır. Bunlar sitoplazmada bulunan oksidaz ve siklooksijenazlar, plazma zarındaki nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz, mitokondri ve peroksizomlar içindeki lipoksijenaz, miyeloperoksidaz (MPO) ve anjiyotensin II sayılabilir [75,76].

Dokuların ve hücrelerin yakınında serbest radikallerin varlığında, ROS'u ortadan kaldırmak için savunma sistemi bir dizi reaksiyon mekanizmalarını etkinleştirir []. Hücreler ve organizma, kendilerini savunmak için spesifik bir anti-oksidatif koruma sistemine sahiptir [74-76].

İnsanlarda, var oluştta üç farklı savunma mekanizması hattı gelişmiştir. Bu mekanizmalar; engelleme, yakalama, geri yüklemedir. ROS/RNS'yi temizleyen ilk savunma mekanizması hattı, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşur. Oksidatif stresin başlamasını doğrudan geciktirebilir veya önleyebilirler [74].

Bu savunma hattında yer alanlar arasında glutatyon (GSH), ürik asit, E vitamini ve C vitamini bulunur. Kan plazmasındaki enzimatik olmayan transferrin, ferritin, seruloplazmin ve albümin gibi maddeler koruyucu antioksidanlar ve geçiş metal iyonlarını (örn demir ve bakır) bağlayarak yeni reaktif türlerin oluşumunu engellerler [74-76].

Diğer bir savunma mekanizması hattı, oksidanları ve radikalleri etkisiz hale getirmek için bir ara savunma görevi gören enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşan sistemdir. Üçüncü ve son savunma hattı, oksidatif hasardan zarar görmüş biyo-moleküllerin rejenerasyonuna sağlayarak onarımı ve hasarı gidermeyi çalışırlar [75,76].

Oksidatif stres (OS), oksidan-antioksidan dengesinin vücut lehine bozulması olarak tanımlanır. Bu durum proteinler, lipitler ve nükleik asitlerde geri dönüşü olmayan oksidatif hasara yol açar. Bu tür hasarlar da temel hücrel işlevlere müdahale eder ve kanser, diyabet, kardiyovasküler ve sinir sistemi hastalıklarının ortaya çıkması ve gelişmesine yol açarlar [74-76].

Artan ROS, tümör gelişimine çeşitli şekillerde katkıda bulunur. Bu katkılar şöyle sıralanabilir; hücrenin canlılığına zarar verebilir, hücrede DNA hasarı oluşturarak genomik istikrarsızlık kazandırabilir ve kanser gelişimini tetikleyen onkogenik değişikliklerin birikmesini tetikleyebilir [75,76].

Oksidatif stres (OS), kanser hücrelerinin canlılığını devam ettirebilmesi için aerobik koşullar altında bile oksidatif fosforilasyon yerine glikoliz yoluyla laktik asit üretmesi için tetikler bu olaya aerobik glikoliz veya Warburg etkisi olarak adlandırılır. Warburg etkisi, 2-floro-2-deoksi-D-glikozun ölçülmesiyle vücuttaki yüksek miktarda glikolitik bölgeleri tespit etmek amacıyla pozitron emisyon tomografisi kullanılarak tümör ilerlemesini izlemek ve tespit etmek için klinikte kullanılır [15,74-76].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmalar aşağıda listelenmiştir.

• CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay	Promega
• DMSO (Dimetilsülfoksit):	Sigma Aldrich
• Duloksetin:	Cayman Chemical Company
• EBM-2 (Endothelial Basal Cell Medium-2)	Cambrex Bio Sciences
• EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik asit):	Sigma Aldrich
• Endothelial cell growth supplement from bovine pituitary:	Sigma Aldrich
• Fetal sığır serumu (FBS):	Sigma Aldrich
• Nutrient Mixture Ham's F12	Sigma Aldrich
• Matrigel basement membrane matrix	Biowest
• McCoy's 5A:	Sigma Aldrich
• MTT(3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyumbromür)	Sigma Aldrich
• PBS (Phosphate-Buffered Saline) tablet:	Thermo Scientific
• Penicilin-Streptomycin:	Sigma Aldrich
• Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Assay Kit	Sigma Aldrich
• Sodyum piruvat:	Sigma Aldrich
• Trypsin-EDTA solution:	Sigma Aldrich

3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler

• 25 cm ² , 75 cm ² ve 175 cm ² 'lik flasklar:	SARSTEDT S044771
• 6 ve 96 kuyucuklu plakalar (TPP):	NEST 0802B
• 2, 5 ,10 ve 25 ml hacimlerinde cam pipetler:	SARSTEDT (serological pipette)
• 2 ml hacminde aspirayon pipeti	SARSTEDT (aspiration pipette)
• 500 ve 1000 ml'lik Durham şişeleri	Eppendorf (0030000811)
• 10 µL mikropipetör ucu	Eppendorf (0030000870)
• 200 µL mikropipetör ucu	Eppendorf
• 1000 µL mikropipetör ucu	Eppendorf
• Thoma lamı	ISOLAB, 075.05.02
• Steril polipropilen santrifüj tüpleri (15/50 ml)	ISOLAB S.078.02.007.050
• 0,4 polikarbonat membran içeren insert plakalar	Corning costar
• UV transparent plakalar	Corning costar
• Kilitli kapaklı mini santrifüj tüpleri (2 ml)	ISOLAB

3.1.3. Kullanılan aletler ve cihazlar

• Yüksek Devirli ve Soğutmalı Santrifüj:	CRYSTE varispin 12R multi centrifuge
• Soğutuculu Masa Üstü Santrifüj:	Eppendorf
• Otoklav	Hıclave hv-50l
• Derin Dondurucu (-20 ⁰ C, -86 ⁰ C)	Infrico ULF400
• Buzdolabı	Infrico
• Vorteks	Varholp
• Manyetik Karıştırıcı	Ikamag
• Karbondioksit İnkübatörü	Panasonic
• Biyolojik Güvenlik Kabini (Sınıf II, Tip 2)	BİOAİR
• Sıvı Azot Kapları	Biocane
• Sıvı Azot Tankı	Worthington industries
• Plaka Çalkalayıcılar	Benchmark Orbi Shaker
• Su Saflaştırma Sistemi	Sartorius arium bagtank 100
• Otomatik Pipetler	Eppendorf
• Su Banyosu	Clifton

• Eliza Cihazı	Bio-Tek, ELx808-IU
• Hassas Terazı:	AXIS
• İnverted Mikroskop:	Olympus CKX53
• Dağıtıcı Pipet	Eppendorf
• Vakum Sistemi	Nalgene
• Kar-Buz Makinesi	Scotsman

3.1.4. Çalışmada kullanılan hücre hatları

In vitro hücre kültürü; sıcaklık ve CO₂ oranı kontrol altında bir ortamda hayvan kaynaklı hücrelerinin davranışını incelemek için kullanılan bir yöntemdir. Günümüzde araştırmalar sonucunda farklı hücre kültürü tipleri keşfedilmiş ve geliştirilmiştir. Hayvan kaynaklı hücre kültürleri, temel hücre biyolojisi, ilaçlar ve diğer kimyasalların hücrelerle etkileşimleri, aşı ve protein üretimi vb. incelemek için uyarlanmıştır [67].

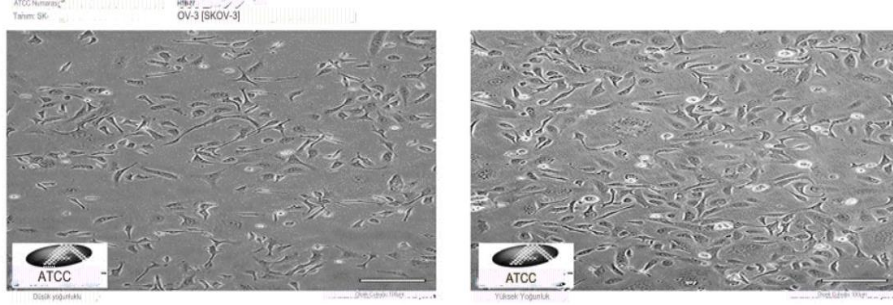
Bu tez çalışmasında duloksetinin antikanser aktivitesini tespit etmek için SKOV-3 hücreleri (Ege Üniversitesi Prof. Dr. Hülya Ayar Kayalı'dan temin edilmiştir) %20 Fetal Bovine Serum, %1 Penisilin-Streptomisin, %0,1 sodyum pirüvat içeren McCoy 5A medyumunda 25 cm²'lik flasklarda %95 hava ve %5 CO₂ ortamında, 37°C'deki CO₂ inkübatöründe kültüre edilmiştir.

HUVEC hücreleri (ATCC hücre bankasından temin edilmiştir) ise %20 Fetal Bovine Serum, %1 Penisilin-Streptomisin, sodyum bikarbonat, heparin, ECGS içeren Nutrient Mixture Ham's F12 medyumunda 25 cm²'lik flasklarda %95 hava ve %5 CO₂ ortamında, 37°C'deki CO₂ inkübatöründe kültüre edilmiştir. Hücre hatlarına ait bilgiler aşağıda verilmiştir:

3.1.4.1. SKOV-3 hücresi

SKOV-3, ovaryum adenokarsinomu olan 64 yaşındaki beyaz bir kadının ovaryumundan 1973 yılında izole edilmiş, yüzey epiteli stromal tümörler grubuna dahil olan ovarian seröz kist adeno karsinoma hücre hattıdır. Over malignitelerinin en sık görülen tipidir. Tüm malign epitelyal tümörlerin %50-80' ini, seröz tümörlerin ise %25' ini oluştururlar. 60-70 yaşları arasında en sık görülürler.

Yüksek dereceli ve düşük dereceli seröz karsinom olarak sınıflandırılırlar. Vakaların %70-80' i yüksek dereceli seröz karsinom iken %5' i de düşük dereceli kistadenomdur. Distal fallop tüpü epitelinden kaynaklandığı düşünülmektedir. SKOV-3 hücreleri, tümör nekroz faktörüne ve difteri toksini, sisplatin ve adriyamisin gibi çeşitli sitotoksik ilaçlara dirençlidir [31].



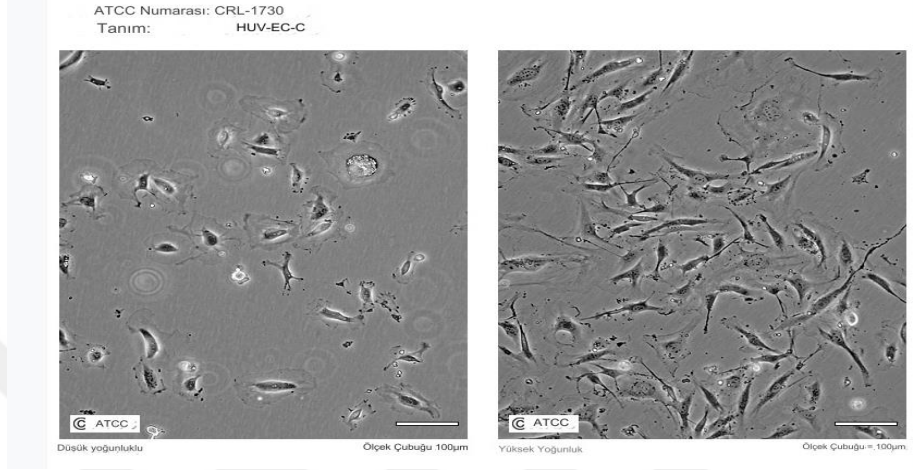
Şekil 3.1: Skov-3 Hücre Hattının Mikroskop Altındaki Görüntüsü [77]

3.1.4.2. HUVEC (insan göbek kordonu damarı endotel hücresi)

HUVEC hücresi göbek kordonunun damarından izole edilmiş bir endotel hücre hattıdır. Endotel hücreleri (EC), tüm organ ve dokularda damarların iç kısmını kaplayan tek sıralı hücrelerdir. Diğer bir adı da tek katlı yassı epitel hücreleridir ve basit epitel hücre sınıfına girmektedirler. Endotel hücreler, kan ile dokular arasında kimyasal madde alışverişinde bariyer görevi yapmaktadır. Endotel hücreler; büyüme faktörleri, antitrombotik faktörler, inflamatuvar mediatörler vb. salgılayarak vücutta çok çeşitli hücresel fonksiyonları kontrol etmektedirler [78].

İnsan göbek kordonu, çok az bir malzeme ile izole edilebildikleri ve kültürlenebildikleri için laboratuvar koşullarına çok hızlı uyum sağladıklarından dolayı hücre kültürü araştırmaları için çok iyi bir kaynaktır. İnsan göbek kordonu damarı endotel hücreleri (HUVEC) 1973'ten günümüze, kolay elde edilmesi ve kolay bulunurluğu bakımından en çok kullanılan *in vitro* hücre hatlarından biridir. Ayrıca hastalık oluşum aşamalarını araştırmak için elverişli bir hücre tipidir ve en çok vasküler patoloji, kanser, metabolik patoloji araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır [24,50,78,79].

HUVEC hücrelerinin özellikleri genel hatları ile şöyledir; damarın geçirgenliği daimî olarak kontrol ederler ve kan damarlarının patolojik ve fizyolojik uyarılara tepkisi, trombojenisite, vazodilatasyon, anjiyogenez, homeostaz, monosit alımı ve hormon taşınmasının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır [78].



Şekil 3.2: HUVEC Hücre Hattının Mikroskop Altındaki Görüntüsü [77]

3.1.5. Kullanılan araç ve gereçlerin hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan bazı cam ve plastik malzemeler ile sıvı solüsyonlar alüminyum folyolara sarılı olarak 121 °C, 1,5 atm/Hg basınçta otoklavda 20 dakika süre zarfında, bazı cam ve metal malzemeler de alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180 °C’de 2 saat süre zarfında steril edilerek kullanılmıştır.

3.1.6. Kullanılan çözeltiler ve reaktifler

3.1.6.1. Hücre kültürü çalışmaları için kullanılan genel çözeltiler

PBS (Fosfat tamponu çözeltisi): Hazır olarak satın alınan PBS tabletleri 1 tablet 100 ml ultra saf suda çözünecek şekilde 30 dakika ısıtılarak karıştırıcıda çözdürülür. 121 °C de 20 dakika 1,5 atm basınç altında otoklavda steril hale getirildikten sonra karanlık ortamda oda sıcaklığında saklanmıştır.

Tripsin-EDTA çözeltisi: tripsin ve edta kullanıma hazır olarak satın alınmıştır. Birebir oranda karıştırılarak kullanılmıştır. Deney yapılana kadar -20°C de soğutucuda saklanmıştır.

PBS- EDTA çözeltisi: 1 litre PBS-EDTA çözeltisi için 0,372 gr EDTA elektronik tartıda tartılır, üzerine 1 tablet 100 ml saf suda çözünecek şekilde hazır PBS tabletleri eklenir ultra saf su ile çözelti 1 litreye tamamlanır. Oluşan karışım 30 dakika ısıtmalı karıştırıcıda çözdürülür. 121 °C de 20 dakika 1,5 atm basınç altında otoklavda steril hale getirildikten sonra karanlık ortamda oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.1.6.2. Medyumların (besi yerlerinin) hazırlanması

Bu çalışmada SKOV-3 hücresi için McCoy's 5A medyumunu kullanılmıştır. +4°C muhafaza edilen 500 ml McCoy's 5A medyumuna üzerine 100 ml Fetal Bovine Serumu eklenir. Bu karışımın üzerine %1 lik oranda penisilin-streptomisin ve sodyum piruvat etken maddeleri eklenir. Karışım deneyde kullanılmak üzere +4 °C buzdolabında saklanır.

HUVEC hücresi içinde bu çalışmada Hams F12 medyumunu kullanılmıştır. + 4 °C muhafaza edilen 500 ml Nutrient Mixture Ham's F12 medyumuna %0,3 oranında ECGS eklenir. Bu çözeltinin üstüne 100 ml FBS, %1'lik oranda penisilin-streptomisin ve %1' lik oranda L-Glutamin eklenir. Oluşan karışım deneyde kullanılmak üzere +4°C buzdolabında saklanır.

3.1.7. Oksidatif stresin belirlenmesi için yapılan deneylerde kullanılan çözeltiler

3.1.7.1. ROS deneyi

Bu tez çalışmasında ROS deneyini gerçekleştirebilmek için ABCAM firmasına ait hazır test kiti satın alınmıştır. Test kitinde solüsyon olarak ROS Buffer Assay, ROS Label ve ROS İnducer içermektedir.

3.1.8. Sitotoksitenin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

3.1.8.1 MTT çözeltisi

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür tartılıp konsantrasyonu 5 mg/ml olacak şekilde fosfat tamponu çözeltisi içerisinde çözülür. Por çapı 0,22 µm olan filtre ile steril hale getirildikten sonra 1ml'lik porsiyonlara ayırıp ışıktan korunaklı bir ortamda -20°C'de saklanmıştır.

3.1.8.2. LDH deneyi

Bu tez çalışmasında LDH deneyini gerçekleştirebilmek için kullanılmak üzere PROMEGA firmasına ait CytoTox- ONE TM hazır test kiti satın alınmıştır.

3.1.9. Test maddelerinin konsantrasyonlarının hazırlanması

Bu çalışmada Cayman Chemical Company'den temin edilen 10 mg (%98 saflıkta) duloksetin %1 DMSO ile çözerek 1000µm'Lık stok çözeltileri hazırlanmıştır. Deneylerde kullanılmak üzere hazırlanan çözelti -20 °C soğutucuda muhafaza edilmiştir. Her deneyde bu hazırlanan 1000µm çözelti -20 °C den çıkarılıp oda sıcaklığına getirelerek hücre hattına 2,5µm, 5µm, 10µm, 20µm ve 30µm'lük konsantrasyonlarda uygulanmıştır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre hatlarının laboratuvar ortamında çoğaltılması

Hücre kültürü; doku ya da organdan alınan canlı küçük bir parçanın kontrollü şartlar altında büyütülmesi ve çoğaltılması işlemidir. Belirli hücre hattından çoğaltılan hücreler üzerinde çeşitli çalışmalar yapılarak, özellikle de *in vivo* yapılamayan deneyler hakkında

öngörü sahibi olunabilir. Hücre kültürleri doku eksplantları veya hücre süspansiyonlarından oluşmaktadır. Günümüzde sitogenetik, biyokimyasal ve moleküler biyolojik çalışmalarda tanı ve araştırma amacıyla yoğun olarak kullanılmaktadır [67-69].

Bu çalışmada sitotoksosite testlerinde ovarian seröz kistadenokarsinoma hücre hattı olan SKOV-3 kullanılmıştır.

1. Hücre hattı -80°C ' de kryotüpler içinde dondurularak saklanmış olan hücreler çıkarılarak 37°C ' de hazırlanan su banyosunun içerisine konulur.
2. 37°C 'deki su banyosunda donmuş haldeki hücrelerin çözünmesi sağlanır.
3. Çözünen hücre süspansiyonu 9 ml besiyeri içeren santrifüj tüpüne aktarılır.
4. $+4^{\circ}\text{C}$ 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilip hücreler çöktürülür.
5. Santrifüj sonrası süpernatant alınarak tüp dibindeki hücre pelleti üzerine serumlu besiyeri eklenir ve pipetaj yapılarak hücrelerin homojen olarak birbirinden ayrılması sağlanır.
6. 25 cm²'lik flaska alınarak üzerine medyum konulan hücreler 37°C 'de %5 CO₂ içeren inkübatöre çoğalmalmaya bırakılır.
7. Çoğalan hücrelerin 75 cm²'lik flasklara alınıp, haftada 1-2 kez pasajlanarak hücre hattının hücre canlılığının devamlılığı sağlanmıştır.
8. Deneylerde 35-41 numaralı hücre pasajları ile çalışılmıştır.
9. Hücrelerin 37°C 'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyon sonrasında %70'in üzerinde üreme ve büyüme gösteren hücre kültürleri invert mikroskop ile incelenerek pasajlama işlemi için biyogüvenlik kabinine alınmıştır. T75 flask içerisindeki ölü hücrelerin ve metabolik atıkların bulunduğu medyum çekilerek uzaklaştırılır.
10. Pasajlama işlemi için, %70-80 hücre doluluğuna ulaşmış flasklar alkollenerek steril kabine alınır.
11. Flask içindeki besiyeri pipet yardımıyla çekilerek atılır. 6-8 ml PBS ile flasktaki hücreler yıkanır.
12. Yıkama işleminden sonra hücreler hem birbirinden hem de tutundukları yüzeyden ayrılması için 0.6 ml tripsin-EDTA ile muamele edilir.
13. Hücreler tripsin-EDTA eklendikten sonra 37°C 'de etüv içinde 1-2 dakika kadar bekletilir. Hücrelerin tutundukları yüzeyden kalktığı mikroskop ile teyit edildikten sonra flask tekrar steril kabine alınır.
14. Hücreleri tripsin-EDTA' dan hücreyi lizis etkisinde arındırmak için tekrar 6-8 ml medyum flaska eklenir.

15. Karışım 15' lik falkon tüpe alınır.
16. Deney kurulumu için hücre sayımı aşamasına geçilir.

Bu çalışmada sitotoksisite testleri ve anjiyogenez deneyleri için HUVEC hücre hattı kullanıldı.

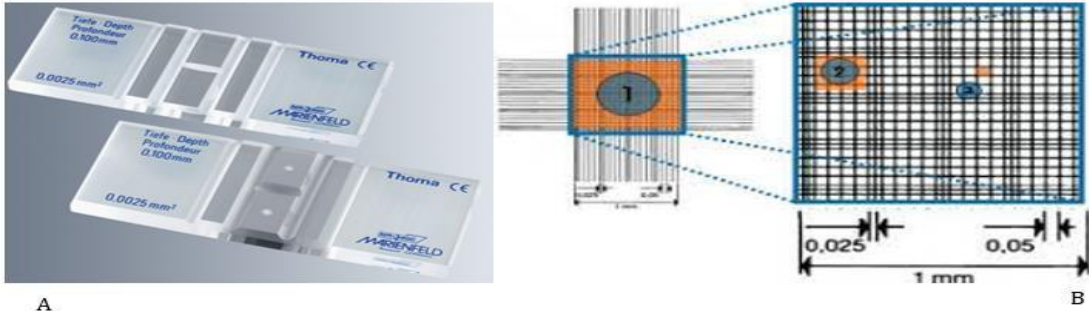
1. Hücre hattı -80° C' de kriotüpler içinde dondurularak saklanmış olan hücreler çıkarılarak 37°C' de hazırlanan su banyosunun içerisine alınır.
2. 37°C'deki su banyosunda çözünmesi sağlanır.
3. Çözünen hücre süspansiyonu 9 ml besiyeri içeren santrifüj tüpüne aktarılır.
4. +4°C 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilip hücreler çöktürülür.
5. Santrifüj sonrası süpernatant alınarak tüp dibindeki hücre pelleti üzerine serumlu besiyeri eklenir ve pipetaj yapılarak hücrelerin homojen olarak birbirinden ayrılması sağlanır.
6. 25 cm²'lik flaska alınan hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre çoğalmalmaya bırakılır.
7. Çoğalan hücrelerin 75 cm²'lik flasklara alınıp, haftada 1-2 kez pasajlanarak deneyin ve deneyde kullanılan hücre hattının devamlılığı sağlanmıştır.
8. Deneylerde 20-24 numaralı hücre pasajları ile çalışılmıştır.
9. Hücrelerin 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyon sonrasında %70'in üzerinde üreme ve büyüme gösteren hücre kültürleri invert mikroskop ile incelenerek pasajlama işlemi için biyogüvenlik kabinine alınmıştır. T75 flask içerisindeki ölü hücrelerin ve metabolik atıkların bulunduğu medyum çekilerek uzaklaştırılır.
10. Pasajlama işlemi için, %70-80 hücre doluluğuna ulaşmış flasklar alkollenerek steril kabine alınır.
11. Flask içindeki besiyeri pipet yardımıyla çekilerek atıldı. 6-8 ml PBS ile flastaki hücreler yıkanır.
12. Yıkama işleminden sonra hücreler hem birbirinden hem de tutundukları yüzeyden ayrılması için 0.6 ml tripsin-EDTA ile muamele edilir.
13. Hücreler tripsin-EDTA eklendikten sonra 37° C'de etüv içinde 1-2 dakika kadar bekletilir. Hücrelerin tutundukları yüzeyden kalktığı mikroskop ile teyit edildikten sonra flask tekrar steril kabine alınır.
14. Hücreleri tripsin-EDTA' dan hücreyi lizis etkisinde arındırmak için tekrar 6-8 ml medyum flaska eklenir.

15. Karışım 15' lik falkon tüpe alınır.
16. Deney kurulumu için hücre sayımı aşamasına geçilir.

3.2.2. Hemositometre (thoma lamı) yöntemi ile hücre sayımı

Hemositometre ile hücre sayımı en genel, eski ve maliyeti düşük bir hücre sayımı yöntemidir. Kalın, düz ve sayım için odacıklara sahip lamın üzerine lamel konarak sayılacak hücreli medyumların lam ile lamel rasına sızdırılarak mikroskopta sayılması temeline dayanmaktadır. Bu yöntemin temeli, $0,1 \text{ mm}^3$ hacimde sayım yapılmasına dayanmaktadır. Lamın çukur bir kısmı mevcuttur ve hücreli medyum bu kısım üzerine aktarılır, lamel kapatıldığında bu çukurda $0,1 \text{ mm}^3$ hacminde bir sıvı bulunmaktadır. Sayım yapılacak alan cam yüzeyindeki mevcut çizgilerle belirlenmiştir [80].

Thoma lamı aynı zamanda alt ve üst olmak üzere 2 bölmeden oluşmaktadır ve bir bölümünde Thoma lamında 1 büyük kare 16 orta boy kare, her orta boy karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kare mevcuttur. Sayım bu kareler referans alınarak yapılır. Lamın her iki tarafındaki alan sayıldıktan sonra sayımların ortalaması alınır ve; Bir orta boy karede sayılan hücre sayısı x Dilüsyon Faktörü x 16 (orta boy kare sayısı) x 10.0 Değişmez) formülüne göre örnekteki hücre sayısı hesaplanır [80].



Şekil 3.3: A: Thoma Lamı, B: Hücre sayılan alanlar [80]

3.2.3. Hücre canlılığının belirlenmesi testleri

3.2.3.1. *Mtt deneyi*

MTT deneyi şu aşamalar takip edilerek gerçekleştirilir:

1. Pasajlama işlemi sonrasında, hücre sayımı yapılarak örnekteki mevcut hücre sayısı belirlendikten sonra 96 kuyucuklu 2 flaska herbir kuyucukta aynı hücre sayısı olacak şekilde hücreler ekilerek deney kurulumu yapılır.
2. 96 kuyucuklu flaskta bulunan hücrelerin üzerine sitotoksitesi belirlenecek maddeler çeşitli konstrasyonlarda 24 ve 48 saat muamele olacak şekilde hazırlanarak besi yerlerine eklenerek hücreler inkübasyona bırakılır.
3. Sitotoksitesi tespit edilecek maddeler ile 24 ve 48 saat muamele edilen hücrelerden inkübasyon süresi sonunda 96 kuyucuklu flastaki besiyerlerinden uzaklaştırılır.
4. 96 kuyucuklu flastaki hücrelerin hücre canlılığının tespiti için MTT testi solüsyonu her kuyucuğa 100µL olacak şekilde karanlık bir ortamda kuyucuklara eklenir.
5. Canlı hücrelerin mitokondrial metabolik aktiviteleri sonucu MTT boyasının suda çözünmeyen formazan tuzuna dönüşebilmesi için 2 saat inkübasyona bırakılır.
6. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası içeren besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırılır.
7. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözünmesi için her bir kuyucuğa 200 µL DMSO ilave edilir.
8. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri (OD) çalkalayıcı ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulur.
9. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol grubundaki hücreler hücre canlılık oranı %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilir.
10. Bu test, 8 paralel 3 kez tekrar edilir.

3.2.3.2. LDH deneyi

LDH testi için yeterli sayıya ulaşan SKOV-3 ve HUVEC hücrelerinin duloksetinin bu hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerin saptanması ve hücre ölümünün göstergesi olan hücre dışına salınan LDH enzimi incelendiği LDH testi “PROMEGA CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay” kiti kullanılarak yapılmıştır. Sitotoksikite testi, kullanılan ticari kitin deney prosedürü talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. SKOV 3 ve HUVEC hücreleri çoğaltılıp sayıldıktan sonra sitotoksikite belirlemek için deney aşamasına geçilmiştir [72,73,79].

Test prosedürü şu sıralama ile ilerlemektedir;

1. Her birinde SKOV 3 için 96 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 10000 hücre olacak şekilde HUVEC hücreleri içinde her kuyucuğa 8000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir ve 24 saat boyunca %5 CO₂'li ortamda 37°C'de kuyucuklara tutunmaları için inkübasyona bırakılmıştır.
2. İnkübasyon süresi sonunda besiyerleri dökülerek 50 ppm HOCl, 200 ppm HOCl ve %0,2 KH solüsyonları eklenmiştir.
3. Maksimum LDH aktivitesi grubu değerleri solüsyon ile muamele edilmemiş kontrol grubu hücreleri üzerine %0,1 Triton X-100 eklenmesiyle elde edilirken, 10 µL steril, ultra-saf su içinde, işlem görmemiş hücreler spontan LDH aktivitesi kontrolü olarak kullanılmıştır.
4. Hasarlı hücrelerden salınan LDH, laktatın oksidasyonunu ve bununla birlikte NAD⁺'nın NADH'ye indirgenmesini katalize eder. Redüktaz, Ultra-Glo™ rLuciferase tarafından biyoluminesans sinyaline dönüştürülen lusiferin üretmek için NADH ve redüktaz substratını kullanmıştır. Üretilen ışıldayan sinyal, mevcut LDH miktarıyla orantılıdır.



Şekil 3.4: LDH deneyi test prosedürü [81]

3.2.4. Oksidatif stresin belirlenmesi

ABCAM ROS Test Kiti, bir hücre içindeki hidroksil, peroksil ve diğer reaktif oksijen türlerinin aktivitesini ölçmek için hücre bazlı bir testtir. Test prensibi, hücrelere giren DCFH-DA'yı kullanır, DCFH-DA hücrelere girer ve hücresel esterase tarafından floresan olmayan DCFH'ye deasetillenir. ROS varlığında DCFH hızla yüksek oranda floresan DCF'ye oksitlenir. Floresans, standart bir florometrik plaka okuyucuda okunabilir hale gelir.

İstatistiksel analizler için IBM SPSS Version 23 programı kullanılmıştır. Verilerin analizinde bağımsız grup t-testi ve tek yönlü ANOVA (Varyans Analizi), anlamlılık düzeylerinin belirlenmesinde ise *post-hoc* olarak Tukey testi kullanılmıştır. Sonuçlar ortama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değerlerinin belirlenmesi GraphPad Prism 9.5 programı ve grafiklerin çiziminde Microsoft excel kullanılmıştır. Tüm istatistiksel analizlerde aksi belirtilmedikçe $p \leq 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve anlamlı farklılıklar (*) ile gösterilmiştir.

3.2.5. Angiyogenez belirlenmesi

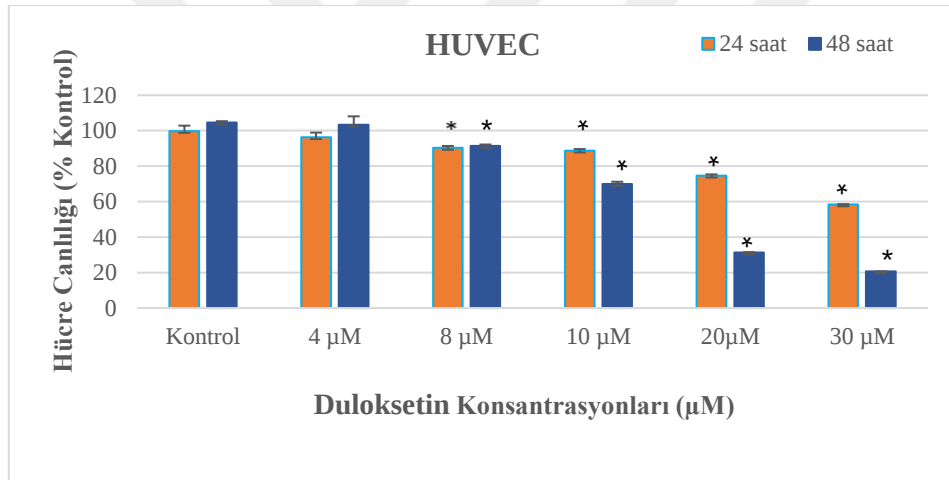
Endotel hücrelerinin bir araya gelerek kılcal damar benzeri yapılar oluşturduğu tüp formasyon deneyi anjiyojenin belirlenmesinde kullanılır. Bu yöntem; ilaç etken maddelerinin anjiyojenin oluşturma yeteneğinin araştırıldığı bilimsel çalışmalarda kolay uygulanabilen, tekrarlanabilirliği ve maliyetinin düşük olduğu için tercih edilen bir yöntemdir. Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında da göbek bağı damar endotel hücreleri (HUVEC) tercih edilmiştir. 96 kuyucuklu plakaların kuyucukları 70 μ l matrijel ile kaplanmıştır. %1 FBS içeren EBM-2 medyumunda 4 saat serum açlığına maruz bırakılan HUVEC hücreleri sonrasında (4×10^5 hücre/ml) olacak şekilde matrijel üzerine ekilerek üzerlerine %0,1 DMSO, 4 μ M, 8 μ M, 10 μ M ve 20 μ M konsantrasyonlarında duloksetin ilave edilmiş ve 12 saat beklenmiştir. Matrijel üzerine eklenen HUVEC hücreleri 12 saatlik bir zaman diliminde farklılaşarak kendi aralarında bir ağ oluşturarak ve tüp benzeri yapılar meydana getirirler. Bu hücrelerin tüp ağ oluşumlarını tespit etmek ve görüntülemek için inverted mikroskop yardımıyla 10X'lik büyütmede incelenmiş ve

Olympus DP70 kamera ile fotoğraflanmıştır. Deneyler, birbirinden bağımsız olarak 3 kez ve 2 tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. MTT Testi Sonuçları

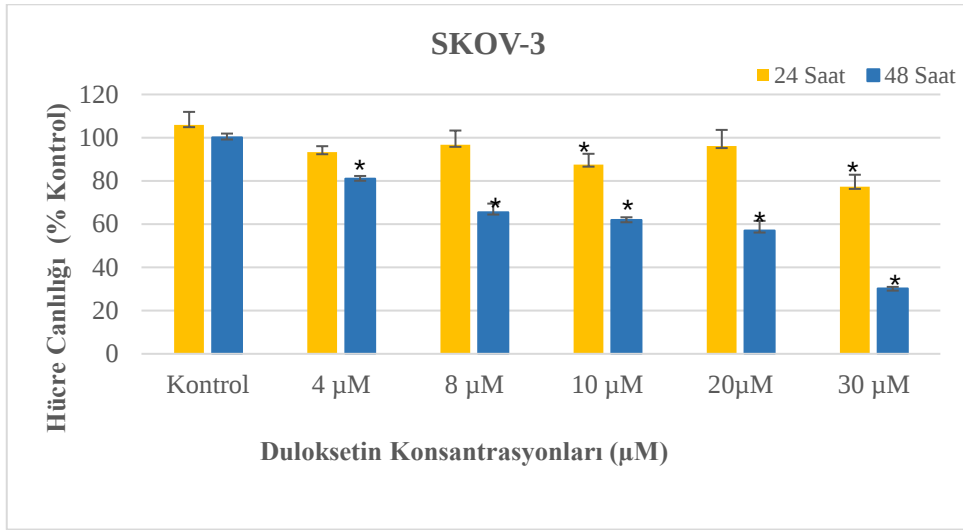
Çalışmada duloksetinin farklı konsantrasyonları (4-30 μ M) HUVEC ve SKOV-3 hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saat uygulanmıştır. Duloksetinin hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri ve IC50 değerleri MTT testi ile belirlenmiştir. Elde edilen hücre canlılığı verileri % olarak ifade edilmiştir. Duloksetin ile maruz bırakılmayan kontrol grubunun hücre canlılığı %100 kabul edilerek ve diğer grupların % değerleriyle karşılaştırılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: Duloksetinin HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$.

HUVEC hücre hattı üzerinde MTT sonuçları değerlendirildiğinde, 24 saat boyunca duloksetinin 4, 8, 10, 20, 30 μ M konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücrelerde 4 μ M’lık konsantrasyonda kontrol grubuna göre hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. 8, 10, 20, 30 μ M konsantrasyonlarında ise, hücre canlılığı sırasıyla %9, %11, %25, ve %41 oranında azalmıştır. 4 μ M dışındaki uygulanan tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.1).

48 saat boyunca duloksetinin 8, 10, 20 ve 30 μM konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücrelerde hücre canlılığı sırasıyla %8, %29, %69 ve %79 oranında azalmış ve istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmuştur 4 μM 'lık duloksetin konsantrasyonu uygulanan hücrelerde ise kontrol grubuna göre hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.1).



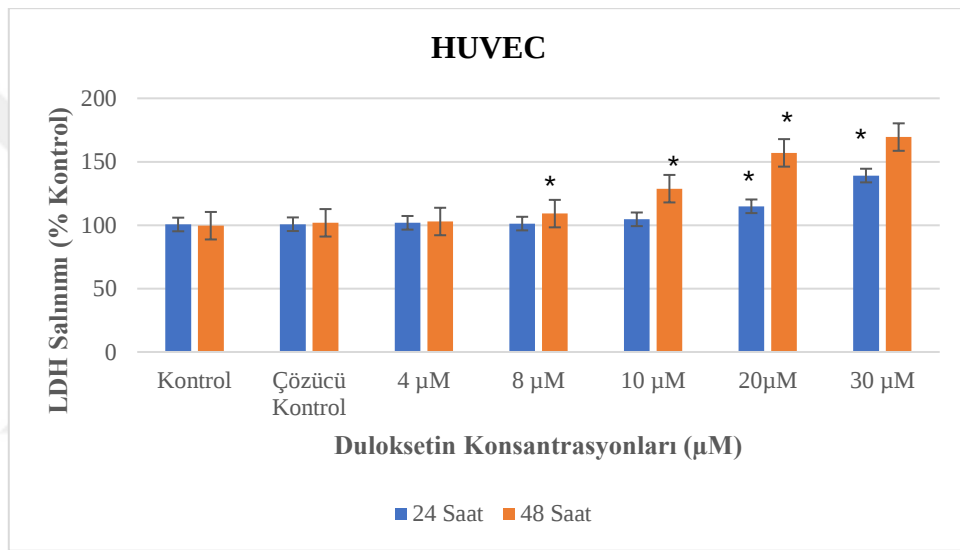
Şekil 4. 2: Duloksetinin SKOV-3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$.

SKOV-3 hücrelerine duloksetinin 4-8-10-20-30 μM konsantrasyonları 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. 24 saatlik uygulama sonucunda kontrol grubuna göre, hücre canlılığı sırası ile %6, %5, %10, ve %22 oranında azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). Duloksetinin 10 ve 30 konsantrasyonlarında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemlenirken; duloksetinin 4, 8 ve 20 μM konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre hücre canlılığında anlamlı farklar saptanmamıştır (Şekil 4.2).

Duloksetinin 48 saatlik uygulama sonucunda ise; kontrol grubuna göre, hücre canlılığının sırası ile %9, %35, %38, %42 ve %69 oranında azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). Duloksetinin uygulanan tüm konsantrasyonlarında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır (Şekil 4.2).

Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonunun (IC50) belirlenmesi için GraphPad Prism 9,5 programı kullanılmıştır. Duloksetinin 4-8-10-20-30 µM konsantrasyonları uygulanan HUVEC ve SKOV-3 hücrelerinde 24 saatin sonunda IC50 değeri R² değerinin küçük olması sebebi ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak 48 saat sonundaki IC50 değeri HUVEC hücrelerinde 17,91 µM olarak saptanırken, SKOV-3 hücrelerinde IC50 değeri 19,12 uM olarak belirlenmiştir.

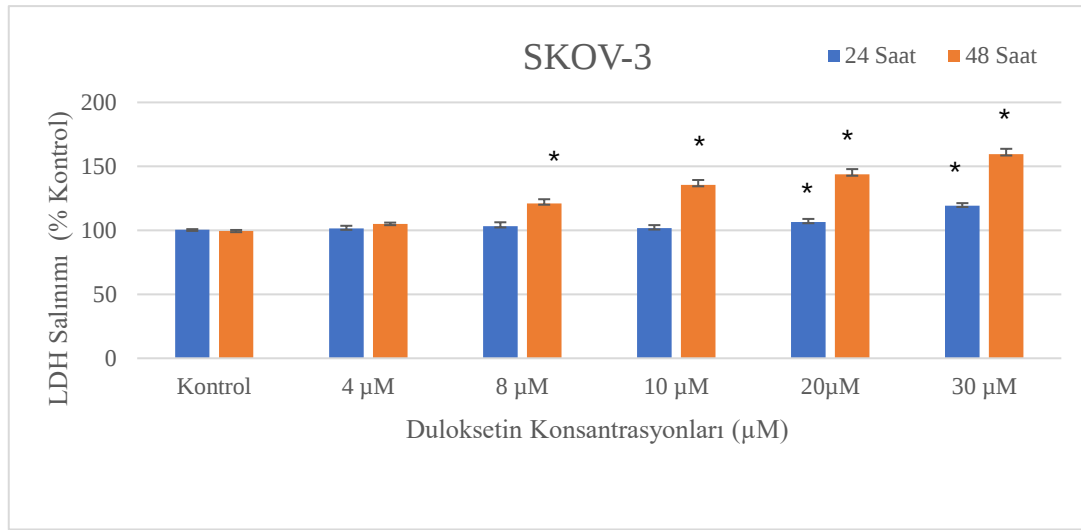
4.2. Laktat Dehidrogenaz Deneyi Sonuçları



Şekil 4.3. Duloksetinin HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin LDH testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p <0,05.

HUVEC hücrelerine duloksetinin 4-8-10-20-30 µM konsantrasyonları 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. 24 saatlik uygulama sonucunda kontrol grubuna göre, 20 µM konsantrasyonda %14 ve 30 µM konsantrasyonda ise %39 oranında hücre dışına LDH salınımı gözlemlenmiştir. 4-8-10 µM konsantrasyonlarda hücre dışı LDH salınımı kontrole grubuna yakın olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.3).

48 saatlik duloksetin uygulaması ardından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde ise; 4 ve 8 μM duloksetin uygulanan HUVEC hücrelerinde hücre dışı LDH salınımı kontrol grubuna yakın olduğu saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak uygulanan 10-20 ve 30 μM konsantrasyonlar da ise hücre dışı LDH salınımı sırasıyla kontrole göre %28, %57 ve %69 oranında arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.3).



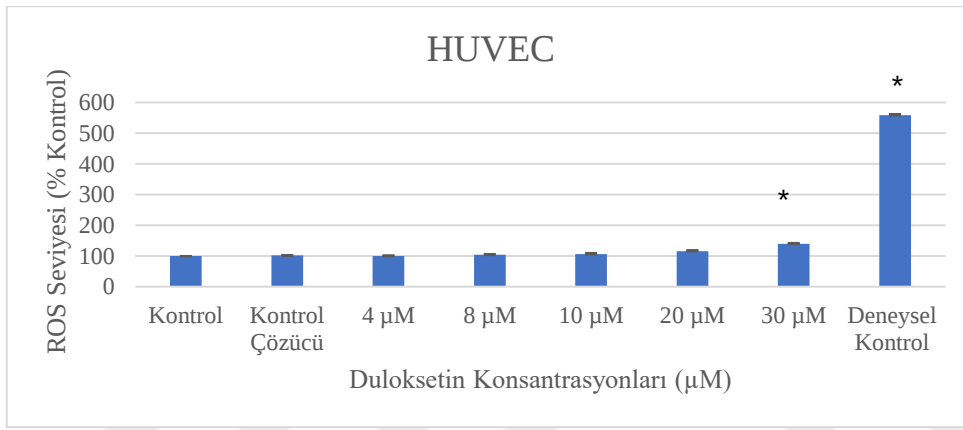
Şekil 4.4: Duloksetinin SKOV-3 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin LDH testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$.

SKOV-3 hücrelerine duloksetinin 4-8-10-20-30 μM konsantrasyonları 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. 24 saatlik uygulama sonucunda kontrol grubuna göre, 20 μM konsantrasyonda %14 ve 30 μM konsantrasyonda ise %39 oranında hücre dışına LDH salınımı gözlemlenmiştir. 4-8-10 μM konsantrasyonlarda hücre dışı LDH salınımı kontrole grubuna yakın olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.4).

48 saatlik duloksetin uygulaması ardından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde ise; 4 ve 8 μM duloksetin uygulanan HUVEC hücrelerinde hücre dışı LDH salınımı kontrol grubuna yakın olduğu saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak uygulanan 10-20 ve 30 μM konsantrasyonlar da ise hücre dışı LDH salınımı sırasıyla kontrole göre %28, %57 ve %69 oranında arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.4).

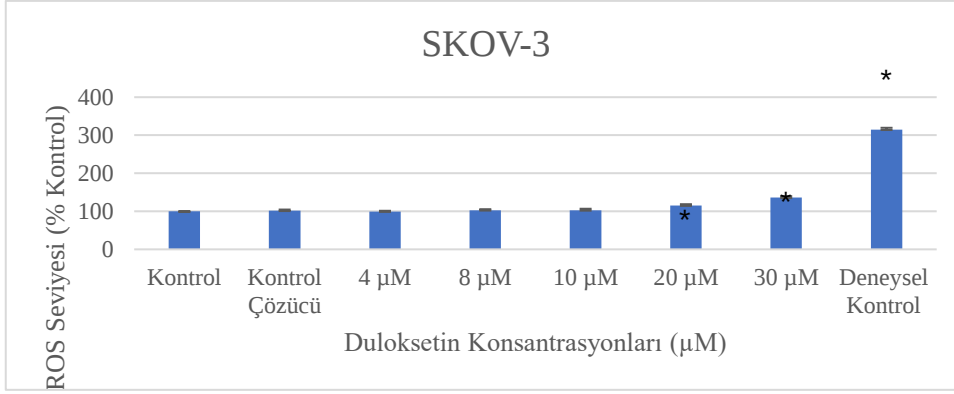
4.3. ROS Sonuçları

Duloksetinin farklı konsantrasyonları 24 saat boyunca HUVEC ve Skov-3 hücrelerine uygulanmış ve hücrelerdeki ROS oluşumu üzerindeki etkisi, ROS testi ile değerlendirilmiştir. Deneysel kontrol olarak kit içeriğindeki indükleyici ajan kullanılmıştır.



Şekil 4.5: Duloksetinin HUVEC hücreleri üzerine oksitadif stresi artırdığı ROS testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$.

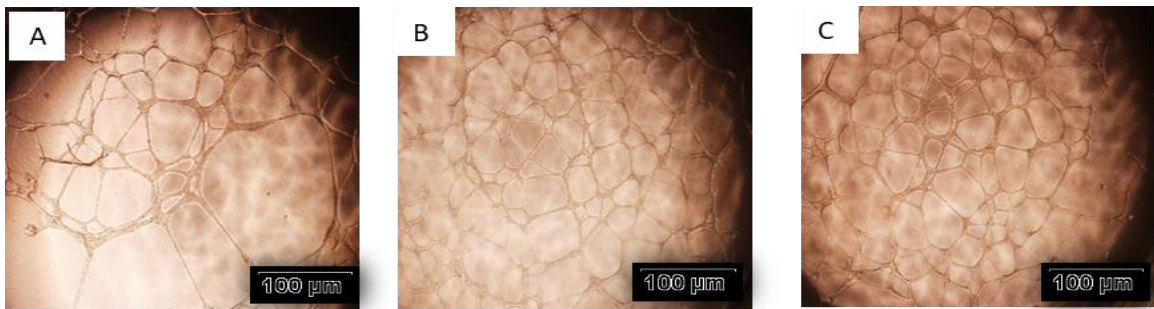
HUVEC hücre hattı üzerinde ROS sonuçları değerlendirildiğinde, 24 saat boyunca duloksetinin 4, 8, 10, 20, 30 µM değişen konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücrelerde 4,8,10,20 µM'lık konsantrasyonda kontrol grubuna göre reaktif oksijen türlerinde artış görülmediğinden istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. 30 µM lık konsantrasyonda kontrol grubuna göre %39 luk, deneysel kontrol grubunda kontrol grubuna göre %450 reaktif oksijen türlerinde artış saptanmıştır.

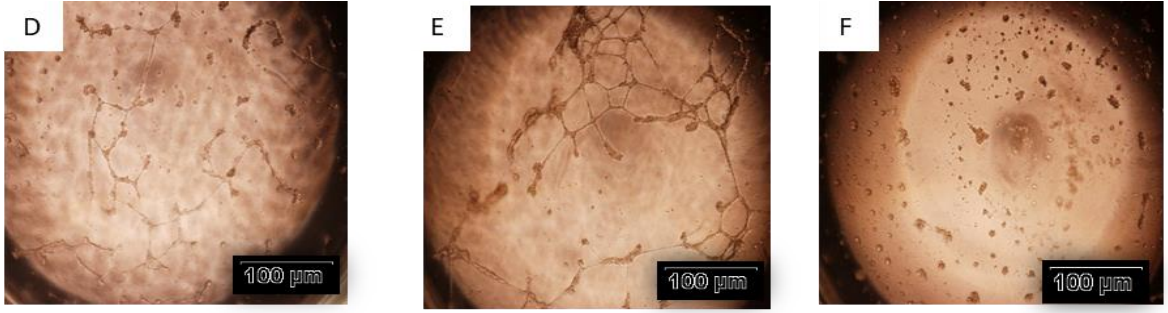


Şekil 4.6: Duloksetinin SKOV-3 hücreleri üzerine oksitadif stresi artırdığı ROS testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$.

SKOV-3 hücre hattı üzerinde ROS sonuçları değerlendirildiğinde, 24 saat boyunca duloksetinin 4, 8, 10, 20, 30 µM değişen konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücrelerde 4,8,10 µM'lık konsantrasyonda kontrol grubuna göre reaktif oksijen türlerinde artış görülmediği için istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. 20 µM'lık konsantrasyonda kontrol grubuna göre %15' lik, 30 µM'lık konsantrasyonda kontrol grubuna göre %35 lik, deneysel kontrol grubunda kontrol grubuna göre %214 reaktif oksijen türlerinde artış saptanmıştır.

4.4. Tüp Formasyon Testi Sonuçları





Şekil 4.7: Duloksetinin HUVEC hücrelerinin tüp oluşturması üzerine olan etkisinin görüntüleri

A: kontrol **B:** %0,1 DMSO **C:** 4 μ M Duloksetin **D:** 8 μ M Duloksetin **E:** 10 μ M Duloksetin **F:** 20 μ M Duloksetin

Anjiyogenez, kanser hücrelerinin büyümesi ve gelişmesinde önemli mekanizmalardan birisidir. Anjiyogenezin oluşumunun önlenmesine yönelik tedavilerin geliştirilmesi, yeni ilaç ve bileşiklerin keşfi için önemlidir. Tez çalışmasında, duloksetinin antianjiyojenik etkilerini görmek amacıyla HUVEC tüp formasyon testi yapılmıştır.

HUVEC hücrelerinde kontrol ve çözücü gruplarında tüp oluşumu tam olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.7 a-b). Tüp oluşumu 4 μ M'lık dozda gerçekleşmektedir. 8 μ M'lık dozda parçalara ayrılmış tüp izlenimi verecek şekilde hücrelerin yan yana geldiği, 10 μ M'lık dozda hücrelerin 8 μ M'lık doza göre daha az sayıda hücrenin yan yana gelerek küme oluşturduğu ve tüp oluşturamadığı görülmüştür. 20 μ M'lık dozda ise doz artışına bağlı olarak canlı hücre sayısında azalma olduğu ve hücrelerin yanyana gelip küme oluşturmadıkları görülmüştür.

5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

HUVEC hücre hattı üzerinde MTT sonuçları değerlendirildiğinde, 24 saat boyunca duloksetinin 4, 8, 10, 20, 30 μ M konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücrelerde 4 μ M'lık dışındaki uygulanan tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 48 saat boyunca duloksetinin 8, 10, 20 ve 30 μ M

konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmuştur 4 μM 'lık duloksetin konsantrasyonu uygulanan hücrelerde ise kontrol grubuna göre hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

SKOV-3 hücrelerine duloksetinin 4-8-10-20-30 μM konsantrasyonları 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. 24 saatlik uygulama sonucunda kontrol grubuna göre, 10 ve 30 μM 'lık konsantrasyonlarında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemlenirken; duloksetinin 4, 8 ve 20 μM konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre hücre canlılığında anlamlı farklar saptanmamıştır. Duloksetinin 48 saatlik uygulama sonucunda ise; kontrol grubuna göre uygulanan tüm konsantrasyonlarında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır.

Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonunun (IC_{50}) belirlenmesi için GraphPad Prism 9,5 programı kullanılmıştır. Duloksetinin 4-8-10-20-30 μM konsantrasyonları uygulanan HUVEC ve SKOV-3 hücrelerinde 24 saatin sonunda IC_{50} değeri R^2 değerinin küçük olması sebebi ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak 48 saat sonundaki IC_{50} değeri HUVEC hücrelerinde 17,91 μM olarak saptanırken, Skov-3 hücrelerinde IC_{50} değeri 19,12 μM olarak belirlenmiştir.

HUVEC hücrelerine duloksetinin 4-8-10-20-30 μM konsantrasyonları 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. 24 saatlik uygulama sonucunda kontrol grubuna göre, 20 μM konsantrasyonda %14 ve 30 μM konsantrasyonda ise %39 oranında hücre dışına LDH salınımı gözlemlenmiştir. 4-8-10 μM konsantrasyonlarda hücre dışı LDH salınımı kontrole grubuna yakın olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

48 saatlik duloksetin uygulaması ardından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde ise; 4 ve 8 μM duloksetin uygulanan HUVEC hücrelerinde hücre dışı LDH salınımı kontrol grubuna yakın olduğu saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak uygulanan 10-20 ve 30 μM konsantrasyonlar da ise hücre dışı LDH salınımı sırasıyla kontrole göre %28, %57 ve %69 oranında arttığı belirlenmiştir.

SKOV-3 hücrelerine duloksetinin 4-8-10-20-30 μM konsantrasyonları 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. 24 saatlik uygulama sonucunda kontrol grubuna göre, 20 μM konsantrasyonda %14 ve 30 μM konsantrasyonda ise %39 oranında hücre dışına LDH salınımı gözlemlenmiştir. 4-8-10 μM konsantrasyonlarda hücre dışı LDH salınımı kontrole grubuna yakın olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. 48 saatlik duloksetin uygulaması ardından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde ise; 4 ve 8 μM duloksetin uygulanan HUVEC hücrelerinde hücre dışı LDH salınımı kontrol grubuna yakın olduğu saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak uygulanan 10-20 ve 30 μM konsantrasyonlar da ise hücre dışı LDH salınımı sırasıyla kontrole göre %28, %57 ve %69 oranında arttığı belirlenmiştir.

HUVEC hücre hattı üzerinde ROS sonuçları değerlendirildiğinde, 24 saat boyunca duloksetinin 4, 8, 10, 20, 30 μM değişen konsantrasyonlarda maruz bırakılan hücrelerde 4,8,10,20 μM 'lık konsantrasyonda kontrol grubuna göre reaktif oksijen türlerinde artış istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

30 μM lık konsantrasyonda kontrol grubuna göre %39 luk, deneysel kontrol grubunda kontrol grubuna göre %450 reaktif oksijen türlerinde artış saptanmıştır.

SKOV-3 hücre hattı üzerinde ROS sonuçları değerlendirildiğinde, 24 saat boyunca duloksetinin 4, 8, 10, 20, 30 μM değişen konsantrasyonlarda maruz bırakılan hücrelerde 4,8,10 μM 'lık konsantrasyonda kontrol grubuna göre reaktif oksijen türlerinde artış istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. 20 μM 'lık konsantrasyonda kontrol grubuna göre %15' lik, 30 μM 'lık konsantrasyonda kontrol grubuna göre %35 lik, deneysel kontrol grubunda kontrol grubuna göre %214 reaktif oksijen türlerinde artış saptanmıştır.

Duloksetin uygulanmış HUVEC hücrelerinin tüp oluşumu kontrol ve çözücü gruplarında kontrol gruplarında tüp oluşumu tam olarak gerçekleşmiştir. Tüp oluşumu 4 μM 'lık dozda gerçekleşmektedir. 8 μM 'lık parçalanmış bir görüntüde tüp izlenimi verecek şekilde hücrelerin yan yana geldiği, 10 μM 'lık dozda hücrelerin 8 μM 'lık doza göre daha az sayıda hücrenin yan yana gelerek kümeleştiği ve tüp oluşturamadığı görülmüştür. 20 μM 'lık dozda hücrelerin sayısında doz artışına bağlı olarak azalma olduğu ve hücrelerin yanyana gelip küme oluşturmadaıkları görülmüştür.

5.2.Tartışma

Kanser, küresel çapta önemli bir halk sağlığı sorunudur ve dünya çapında ikinci önde gelen ölüm nedenidir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (IARC) son tahminine göre, 2020 yılında dünya çapında 10,0 milyon kanser ölümü ve 19,3 milyon yeni vaka rapor edilmiştir.2040 yılına gelindiğinde yeni kanser hastası sayısının 30,2 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir. Bu da mevcut seviyenin neredeyse iki katına çıkmasına neden olacaktır [3.82-84].

İlaçların yeniden kullanımı veya yeniden konumlandırılması, eski ilaçlara yeni kullanım alanları bulmak adına cazip bir yaklaşımdır. Bu tür bir ilacın yeniden kullanımı, Faz I klinik araştırmaları ortadan kaldırarak daha kısa üretim süresi ve de yeni ilaç keşfine kıyasla daha düşük maliyet gibi bir dizi avantajı beraberinde getirmektedir [13,14,28,90].

Mevcut ilaçlar dirençle karşılaşmakta ve bazen tahammül edilemez istenmeyen etkilere sahip olabilmektedir. Bilim camiası genellikle mevcut ilaçların sorunlarını ve direncini ele almak için alternatif kanser kemoterapötik ajanlarını araştırmaya teşvik edilmektedir. Onkoloji dışı ilaçların hem temel hem de klinik düzeyde kanser tedavisine yönelik olarak yeniden tasarlandığını gösteren sürekli çalışmalar vardır [13,14,28,90].

Son 30 yılda, bir dizi çalışma, altta yatan mekanizmaları apoptozu tetikleme, hücrel enerji metabolizmasını kısıtlama, antioksidan aktivite gösterme, anjiyogenezi inhibe etme, bağışıklık sistemini düzenleme vb. olan antidepresanların kanser karşıtı özelliklerini *in vitro* ve *in vivo* olarak göstermiştir. Kanser karşıtı antidepresanlar, trisiklik antidepresanları (TCA'lar), tetrasiklik antidepresanları (TeCA'lar), seçici serotonin geri alım inhibitörlerini (SSRI'ler) ve serotonin-norepinefrin geri alım inhibitörlerini (SNRI'ler) kapsamaktadır [85-92,94-97].

Antidepresan ilaçlar, depresyon bozukluklarına yatkın kanser hastalarının tedavisinde önemli bir role sahiptir. İlk gözlemler, antidepresanların kanserin gelişmesi ve büyümesi üzerindeki etkisine ilişkin çelişkili bulgular göstermiştir. Daha sonraki çalışmalar, trisiklik antidepresanlar (TCA'lar) ve seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI'ler) dahil olmak üzere antidepresan ilaçların, çeşitli etki mekanizmaları aracılığıyla kanser tedavisine eklenmesi konusunda büyük potansiyelini ortaya koymuştur [85-90].

Depresyon kanser hastalarında çok yaygın görülen bir psikolojik bozukluktur. Kronik stres, antitümör bağışıklık tepkisini azaltır ve tümör büyümesini destekler.

Hayvan modellerini kullanan çeşitli çalışmalar, davranışsal stresin yumurtalık, pankreas, prostat ve meme kansinimleri ve malign melanomların hızlı ilerlemesini uyardığını bulmuştur. Duloksetin yaygın olarak depresyonu tedavi etmek için kullanılır ve kanser ağrısı tedavisinde adjuvan tedavi olarak önerilmektedir [92].

Sisplatin, doksorubisin, dosetaksel ve benzeri yaygın antikanser ilaçlarının birçok yan etkiye sahip olması nedeniyle, normal hücrelere daha az toksisiteye sahip ve kötühuylu hücrelere karşı yüksek toksisiteye sahip yeni ilaçların geliştirilmesi ve kullanılması yönünde eğilimler bulunmaktadır [49].

Rehem ve arkadaşları (2024) duloksetinin, planktonik hücrelere karşı antifungal aktivite sahip olduğu rapor etmişlerdir [93].

Yamamoto ve ekibi (2024) duloksetinin nöron koruyucu etkiye sahip olduğunu SHSY-5Y hücreleri kullanarak saptamışlardır [94].

Matsushima ve ekibi (2023) Duloksetinin insan hepatosellüler kansinom (HCC) kaynaklı HuH7 hücrelerinde serotonin geri alım inhibisyonu yoluyla *c-Jun* N-terminal kinazının dönüştürücü büyüme faktörü- α ile uyarılan aktivasyonunu önemli ölçüde artırdığını ancak norepinefrini artırmadığını ilk kez saptanmış ve bunun sonucunda hücre göçünü artırdığı tespit edilmiştir [95].

Zinnah ve Park (2018), A549, HCC-15 ve Calu-3 hücreleri üzerinde duloksetinin 5-10-20 mikromolarlık konsantrasyonlarının hücre çoğalması üzerindeki etkilerini 18 saatlik maruziyet sonrası değerlendirmişler ve 20 mikromolarlık konsantrasyonun üç hücre hattında da hücre sayısında düşüşe neden olduğunu rapor etmişlerdir [9].

Hassani ve ekibi (2019) Duloksetinin MKN45 kanser hücre dizisi ve NIH3T3 normal hücre dizisi üzerindeki sitotoksitesini araştırmışlardır. Duloksetin, NIH3T3 hücreleriyle karşılaştırıldığında MKN45 hücrelerinde daha yüksek IC₅₀ sergilemiştir. Ayrıca bu çalışmada duloksetinin genotoksik etkisi mikronükleus analizi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar, duloksetinin 100 ve 200 μ M'de daha fazla DNA hasarı oluşturduğunu ve 200 μ M'de sisplatine göre anlamlı bir fark yaratmadığını, ancak 100 ve 50 μ M konsantrasyonlarda daha az genotoksik etkiye sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır [10].

Sagara ve ekibi (2021) duloksetinin pankreas kanserli hücrelerin etrafını çeviren stromayı üreten pankreas yıldız hücrelerinin aktivasyonunu baskıladığını ve böylece

tümör-stroma ilişkisini bozduğunu saptayarak, duloksetinin pankreas kanserinin tedavisinde kullanılabileceğini rapor etmişlerdir. [11].

Duloksetinin epidermal büyüme faktörü reseptör-tirozin kinaz inhibitörleri (EGFR-TKI'ler) ile 48 saatlik kombine kullanımının küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücre dizileri olan H1299, H460 ve A549 hücrelerinin çoğalmasında doza bağlı olarak düşürdüğünü ve böylece küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin tedavisinde kullanılabileceği Jang ve ekibi (2024) tarafından saptanmıştır [12].

Yapılan bu tez çalışmasında da JANG ve ekibinin etkili olduğunu tespit ettiği duloksetin dozları temel alınarak SKOV-3 ve HUVEC hücreleriyle muamele edilmiştir. Duloksetinin SKOV-3 hücreleri üzerinde konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücre sayısında düşüş meydana getirdiğini gözlemlenmiştir.

Duloksetinin, agresif bir kanser türü olan pankreas duktal adenokarsinoma hücrelerinin ve kanserle ilişkili fibroblast hücrelerinin çoğalmasında engellediği ayrıca pankreas duktal adenokarsinoma hücrelerinin migrasyon ve invazyon yeteneklerini inhibe ettiği Kajiwarra ve ekibi (2020) tarafından bildirilmiştir [96].

Tez çalışmamızda HUVEC hücreleri ni kullanarak yaptığımız tüp oluşturma deneyinde 8 μM 'lık konsantrasyondan başlayarak artan konsantrasyonlarda HUVEC hücrelerinin kılcal damar benzeri yapıları meydana getiremediğini gözlemledik. Elde ettiğimiz sonuçlar duloksetinin HUVEC hücrelerinin migrasyon yeteneğini engellediğini göstermektedir.

İnsan plasental BeWo hücreleri, sinsitiotrofoblastların bir modeli olarak kullanılan insan kökenli plasental koryokarsinom epitel hücreleridir. BeWo hücreleri sıklıkla ilaçların plasentadan transferinde taşıyıcıların rolünü ve ilaçların plasenta hücreleri üzerindeki toksisitesini incelemek için kullanılmaktadır. Nabekura ve arkadaşları (2023) yaptıkları çalışmada duloksetin ve bazı antidepresanların BeWo hücreleri üzerindeki toksisitelerini WST-8, LDH ve ROS deneylerini uygulayarak araştırmışlardır. Duloksetinin BeWo hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını, ekstrasellüler laktat dehidrogenaz aktivitesini ve ROS üretimini arttırdığını bildirmişlerdir. [97].

5.3. Öneriler

Bu tez çalışmasının sonucunda elde edilen verilerle, bir serotonin ve noradrenin geri alım inhibitörü olan duloksetin'in SKOV-3 ve HUVEC hücre hattı üzerindeki hücre çoğalmasını engelleyici etkileri MTT testi ile sitotoksik etkileri ise LDH testi ile tespit edilmiştir. Duloksetinin 19,1 μM 'lık konsantrasyonunun SKOV-3 hücrelerinde 48 saatlik uygulama sonrasında hücre sayısında kontrole göre yaklaşık %50 oranında azalmaya neden olduğu MTT testi ile saptanmıştır. Duloksetinin konsantrasyon artışıyla birlikte LDH artışı olmuştur. Duloksetinin artan konsantrasyonlarının SKOV-3 ve HUVEC hücrelerinde ROS üretimini indüklediği gözlemlenmiştir. HUVEC hücrelerinde anti- anjiyogenez aktivitesini belirlemek için yapılan tüp oluşumu deneyinde, duloksetinin 4 μM 'lık konsantrasyonun tüp oluşumu üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olmadığı; 8, 10 ve 20 μM 'lık konsantrasyonların ise tüp oluşumunu engelleyici etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Literatürde duloksetinin anjiyogenez üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

Elde ettiğimiz verilerle duloksetinin anti-anjiyojenik bir etkiye sahip olduğunu gözlemlenmiştir. Duloksetinin farklı hücre hatları kullanılarak sitotoksikite ve genotoksikite testleri uygulanarak *in vitro* deneylerle araştırılmasıyla elde edilecek verilerin bu serotonin nörepinefrin geri alım inhibitörü maddenin antikanser ve anti-anjiyojenik etkilerinin belirlenmesi konusunda daha aydınlatıcı olacağı düşünülmektedir. Elde edilen bu bulguların, anjiyogenez üzerine etkili olan yollar araştırılarak geliştirilmesinin ileride duloksetinin anti-anjiyojenik bir ilaç olarak kullanımına olanak sağlayabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışması ile bilinen sitotoksik, genotoksik, mutajenik, kanserojenik ve teratojen etkileriyle birlikte duloksetinin SKOV-3 ve HUVEC hücre hattı üzerindeki etkileri hakkında öngörüye sahip olarak yapılacak konuyla ilgili sonraki çalışmalar için başlangıç olacak veriler literatüre kazandırılmıştır.

KAYNAKÇA

1. Roy, P.S. and B.J. Saikia (2016), Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J Cancer*,. 53(3): p. 441-442.
2. Wang JJ, Lei KF, Han F. (2018) Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*.;22(12):3855-3864.
3. Amjad, M.T., A. Chidharla ve A. Kasi, (2024) Cancer Chemotherapy, in StatPearls., *StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL)*.
4. Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165.
5. Özkara, G., Öztürk, O., & Yılmaz Aydoğan, H. (2020). Cancer and Metastasis: Importance of Cell Adhesion Molecules and Cell Junctions. *Experimed*, 10(1), 38-48.
6. Abudayyak, Mahmoud; Yalçın, Can Özgür; Korkut, Esra. (2018): Pharmacological Approaches for Treatment and Prevention of Chemoteraphy Induced Pheripheral Neuropathy. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*; Ankara Vol. 43, Iss. 2, 113-127
7. Genç, A. and S. Oğuz, (2018) Kanserli hastalarda progresif gevşeme egzersizlerinin kemoterapinin yan etkileri üzerine etkisi. *GUSABDER*. 2018;517–524.

8. Song, S. Y., Ko, Y. B., Kim, H., Lee, et al. (2020). Effect of serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors for patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy: A meta-analysis. *Medicine*, 99(1), e18653.
9. K.M.A. Zinnah, Sang-Youel Park (2019) Duloxetine Enhances TRAIL-mediated Apoptosis via AMPK-mediated Inhibition of Autophagy Flux in Lung Cancer Cells. *Anticancer Research* Dec,39 (12) 6621-6633
10. Hassani, M., vd. (2019). Cytotoxic Effects Of Duloxetine On Mkn45 And Nih3t3 Cell Lines And Genotoxic Effects On Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Arquivos de gastroenterologia*, 56(4), 372–376.
11. Sagara, A., vd. (2021). Repositioning of duloxetine to target pancreatic stellate cells. *Oncology letters*, 22(4), 744.
12. Jang, S. K., vd (2024). Duloxetine enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer cells to EGFR inhibitors by REDD1-induced mTORC1/S6K1 suppression. *American journal of cancer research*, 14(3), 1087–1100.
13. Parvathaneni, V., Kulkarni, N. S., Muth, A., & Gupta, V. (2019). Drug repurposing: a promising tool to accelerate the drug discovery process. *Drug discovery today*, 24(10), 2076–2085.
14. Pillaiyar, T., vd (2020). A medicinal chemistry perspective of drug repositioning: Recent advances and challenges in drug discovery. *European journal of medicinal chemistry*, 195, 112275.
15. Ada, S., Ertürk, C., Uçar, A., Akyüz, S., vd. (2021). KANSER HÜCRE METABOLİZMASI. *Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı Dergisi*, 4(3), 66-75
16. <https://www.drozdogan.com/kanser-nedir-neden-ve-nasil-olusur-ozetle-tum-surec/> erişim tarihi 27 Mayıs 2024
17. Torke, S., Walther, W., & Stein, U. (2024). Immune Response and Metastasis—Links between the Metastasis Driver MACC1 and Cancer Immune Escape Strategies. *Cancers*, 16(7), 1330.
18. Qiu, Y., Gao, T., & Smith, B. R. (2024). Mechanical deformation and death of circulating tumor cells in the bloodstream. *Cancer and Metastasis Reviews*, 1-22.
19. <https://tke.tuseb.gov.tr/kanser-hakkinda/kanser-nedir> erişim tarihi 28 Mayıs 2024
20. Tuncer ve Kozacı (2022) Büyüme Faktörleri ve Sinyal İletimi. *KTO Karatay Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2022, Cilt 3, Sayı 2, 91-107

21. İNAN, S. (2016). Kanser Metastazında Sinyal Yolakları. *Türkiye Klinikleri Radiation Oncology-Special Topics*, 2(1), 14-30.
22. ÖZTÜRK, M., & PEHLİVAN, S. B. (2024). Kanser Tedavisinde Bakteri Destekli İlaç Taşıyıcı Sistemler. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 44(1), 75-91.
23. BABAÇ M, EKİNCİ M, İLEM-ÖZDEMİR D (2023) Kanser Tanısı Ve Tedavisinde Kullanılan Monoklonal Antikorlar. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* Ocak 2023;47(1):295-310. doi:10.33483/jfpau.1196392
24. Liu, Z. L., vd (2023). Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 198.
25. Bray, F., vd (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal of Clinicians*, 68(6),394-424.
26. Bray F, vd. (2024) Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 1-35
27. Sağlık Bakanlığı. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı. Türkiye Kanseri İstatistikleri (2017). Rapor 2017 (https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2017.pdf) erişim tarihi 20.05.2024
28. GLOBOCAN <https://gco.iarc.fr/today/en/fact-sheets-populations#countries> erişim tarihi 27 Mayıs 2024
29. Torre, L. A., vd (2016). Global cancer incidence and mortality rates and trends an update. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 25(1), 16-27.
30. Öztürk, H. (2022). Türkiye kanser istatistikleri ve kansere yönelik politikalar. *Sağlık bilimlerinde güncel tartışmalar Bilgin Kültür Sanat Yayın Dağıtım Pazarlama Ltd. Şti* s. 470-491.
31. Önder, E. (2022). *Skov-3 ovarian adenokarsinoma hücre hattında, alfa lipoik asit uygulanmasının epitelial mezenkimal geçişi ve migrasyon üzerine etkisi* [Yayımlanmış yüksek lisans tezi]. Pamukkale Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı.
32. Afşin, Y., Kamalak, Z., & Ekinci, A. (2022) Over kanserinde güncel yaklaşımlar ve tedavi yöntemlerinin değerlendirilmesi. İksadyayinevi. Ankara

33. Peres LC, vd (2019) Invasive epithelial ovarian cancer survival by histotype and disease stage. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*.;111(1):60-8
34. Yılmaz S. (Mayıs 2024). Endometrioid Over Kanseri ile Berrak Hücreli Over Kanseri Olan Olguların Prognozlarının Karşılaştırılması. *J Biyoteknoloji ve Stratejik Sağlık Arş.*;8(1):58-65.
35. Evgin, H., & Şahin, N. H. (2022). Over Kanseri Farkındalık Ölçeği'nin Türkçe'ye Uyarlanması: Geçerlik ve Güvenirlik Çalışması. *Hacettepe University Faculty of Health Sciences Journal*, 9(3), 679-700.
36. Soong T.R., vd (2018) Frontiers in the Pathology and Pathogenesis of Ovarian Cancer: Cancer Precursors and "Precursor Escape", *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 32(6), 915-928.
37. Tanha, K., vd (2021). Investigation on factors associated with ovarian cancer: an umbrella review of systematic review and meta-analyses. *Journal of ovarian research*, 14(1), 153.
38. <https://www.tevfikguvenal.com/over-yumurtalik-kanseri/> erişim tarihi 28 Mayıs 2024
39. Ateş, E. A. (2023). Over kanserinde HMGA2 geni metilasyon paterni ve prognoz arasındaki ilişki [Yayımlanmamış doktora tezi]. *İstanbul Üniversitesi*
40. Bandara, V., vd (2024). Engineered CAR-T cells targeting the non-functional P2X purinoceptor 7 (P2X7) receptor as a novel treatment for ovarian cancer. *Clinical & translational immunology*, 13(5), e1512.
41. Schmitt, J., & Matei, D. (2012). Targeting angiogenesis in ovarian cancer. *Cancer treatment reviews*, 38(4), 272-283.
42. Alwosaibai, K., vd (2022). PAX2 induces vascular-like structures in normal ovarian cells and ovarian cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 23(6), 1-12.
43. Yang, Y., vd (2020). Lapatinib promotes ovarian cancer cell apoptosis through mROS-HtrA2/Omi pathways. *Eur. J. Gynaecol. Oncol*, 41(4), 598-603.
44. Ding, Y., Wang, Y., Cui, J., & Si, T. (2020). Endostar blocks the metastasis, invasion and angiogenesis of ovarian cancer cells. *Neoplasma*, 67(3).
45. Morand, S., vd. (2021). Ovarian cancer immunotherapy and personalized medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6532.
46. Webb, P. M., & Jordan, S. J. (2024). Global epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 1-12.

47. Yapar Taşköylü, B., vd. (2021). Over kanserinde nötrofil/lenfosit, trombosit/lenfosit, CRP/Albümin oranları ile klinikopatolojik özellikler ve sağkalım arasındaki ilişki. *Pamukkale Medical Journal*, 14(3), 666-674.
48. Wang, K., Chen, Q., Liu, N., Zhang, J., & Pan, X. (2021). Recent advances in, and challenges of, anti-angiogenesis agents for tumor chemotherapy based on vascular normalization. *Drug Discovery Today*, 26(11), 2743-2753.
49. McCormick, B., vd (2016). MitoVitE, a mitochondria-targeted antioxidant, limits paclitaxel-induced oxidative stress and mitochondrial damage in vitro, and paclitaxel-induced mechanical hypersensitivity in a rat pain model. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, 117(5), 659-666.
50. Ulus, G., Koparal, A. T., Baysal, K., Yetik Anacak, G., & Karabay Yavaşoğlu, N. Ü. (2018). The anti-angiogenic potential of ($\pm$) gossypol in comparison to suramin. *Cytotechnology*, 70(6), 1537–1550.
51. Yüzbaşıoğlu*, D., Yılmaz*, E. A. ve Ünal*, F. (2016). Antidepresan ilaçlar ve genotoksisite. *Tübav Bilim*, 9(1), 17-28.
52. Namlı, Zeynep vd. (2021) “Antidepresanların İlaç ilişkili Hareket Bozuklukları Ve Cinsel Yan Etkiler açısından karşılaştırılması”. *Cukurova Medical Journal*, c. 46, sy. 2, ss. 610-2,
53. ZENGİN, S., & SABAK, M. (2023). Trisiklik Antidepresan Zehirlenmeleri. *Türkiye Klinikleri Emergency Medicine-Special Topics*, 9(2), 77-82.
54. Osmaniye, D. & Sağlık, B. N. (2022). Monoaminoksidaz İnhibitörü Olarak Propargil Yan Zinciri Taşıyan Yeni Şalkon Türevlerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Moleküler Modelleme Çalışmaları. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 22 (2), 268-274.
55. Kuwahara, J., vd. (2015). Comparison of the anti-tumor effects of selective serotonin reuptake inhibitors as well as serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors in human hepatocellular carcinoma cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38(9), 1410-1414
56. Stapel, B., vd (2021). Effect of SSRI exposure on the proliferation rate and glucose uptake in breast and ovary cancer cell lines. *Scientific reports*, 11(1), 1250.
57. Christensen, D. K., vd. (2016). SSRI use and clinical outcomes in epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*, 7(22), 33179.

58. Feng, S., vd (2019). In-vitro and in situ assessment of the efflux of five antidepressants by breast cancer resistance protein. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(7), 1133-1141.
59. Boucherie, D. E., Reneman, L., Ruhé, H. G., & Schranke, A. (2023). Neurometabolite changes in response to antidepressant medication: A systematic review of ¹H-MRS findings. *NeuroImage. Clinical*, 40, 103517.
60. Yüksel, N. (2009). Duloksetin: Farmakolojisi. *Klinik Psikiyatri*, 12(1), 3-8.
61. Radkhah, H., vd., (2024) Comparative Study of the Effects of Duloxetine and Venlafaxine on Acute Symptomatic Taxane-induced Neuropathy in Breast Cancer Patients: A Randomized Clinical Trial. *J Community Hosp Intern Med Perspect*, 14(1): p. 18-24.
62. Demirdaş A, Nazıroğlu M, Övey İS. (2017) Duloksetin, Sıçanların Hipokampus ve Dorsal Kök Ganglionunda TRPM2 ve TRPV1 Kanallarının Modülasyonu Yoluyla Oksidatif Stresi, Apoptozu ve Ca²⁺ Girişini Azaltır. *Mol Nörobiol.*;54(6):4683-4695.
63. Karakuş K, vd. (2024) Duloksetinin Sıçan Beyin Dokularında Oksidan-Antioksidan Sistem Üzerine Etkileri. *Phnx Med J*. 2024;6(1):16-21.
64. Gao, W., vd. (2020). Duloxetine-Induced Neural Cell Death and Promoted Neurite Outgrowth in N2a Cells. *Neurotoxicity research*, 38(4), 859–870.
65. Akpınar, A., Uğuz, A. C., & Nazıroğlu, M. (2014). Agomelatine and duloxetine synergistically modulates apoptotic pathway by inhibiting oxidative stress triggered intracellular calcium entry in neuronal PC12 cells: role of TRPM2 and voltage-gated calcium channels. *The Journal of membrane biology*, 247, 451-459.
66. Lee, K. T., Bulls, H. W., vd. (2024). Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (CIPN): A Narrative Review and Proposed Theoretical Model. *Cancers*, 16(14), 2571.
67. Duruel, H. E. E., Çağan, N. S., Işık, S., & Kayhan, F. E. (2021). Hücre kültürlerine genel bakış. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 47(2), 136-149.
68. Erkekoğlu P, Baydar T. (2021) Güncel İn Vitro Sitotoksikite Testleri. *HUJPHARM*. 2021;41(1):45-63.
69. Şahin Mazlumoğlu B (May 1, 2023) In Vitro Cytotoxicity Test Methods: Mtt And Nru. *International Journal of PharmATA* 3 2 50–53.

70. Van Tonder, A., Joubert, A. M., & Cromarty, A. D. (2015). Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC research notes*, 8, 47.
71. Ghasemi, M., vd (2021). The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12827.
72. Claps, G., Faouzi, S., Quidville, V., Chehade, F., Shen, S., Vagner, S., & Robert, C. (2022). The multiple roles of LDH in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 19(12), 749-762.
73. Farhana A, Lappin SL. (2024 Jan) Biochemistry, Lactate Dehydrogenase. *Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*; 2024 Jan-.
74. Zorov, D. B., Juhaszova, M., Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews*, 94(3), 909-950.
75. Moloney, J. N., Cotter, T. G. (2018, August). ROS signalling in the biology of cancer. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 80, pp. 50-64).
76. Yang, S., & Lian, G. (2020). ROS and diseases: Role in metabolism and energy supply. *Molecular and cellular biochemistry*, 467, 1-12.
77. <https://www.atcc.org/products/crl-1730> erişim tarihi 25 Mayıs 2024
78. Medina-Leyte, D. J., Domínguez-Pérez, vd. (2020). Use of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as a model to study cardiovascular disease: A review. *Applied Sciences*, 10(3), 938.
79. Liu, Y., Li, Y., vd. (2023). The long non-coding RNA NEAT1 promotes the progression of human ovarian cancer through targeting miR-214-3p and regulating angiogenesis. *Journal of Ovarian Research*, 16(1), 219.i
80. <https://enfeksiyonhastaliklari.com/thoma-lami-ile-hucre-sayimi/?print=pdf> erişim tarihi 26 Mayıs 2024
81. Gottschalk, E., Aksoy, B. A., Aksoy, P., & Hammerbacher, J. (2019). In vitro pmel-1 T cell-mediated cytotoxicity assay with CytoTox-ONE Homogenous Membrane Integrity Assay (Promega).
82. Huo, Y. L., Qiao, J. M., & Gao, S. (2018). Association between antidepressant medication use and epithelial ovarian cancer risk: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *British journal of clinical pharmacology*, 84(4), 649-658

83. Cheng, F. Vd (2023). Oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity in colorectal cancer patients: mechanisms, pharmacokinetics and strategies. *Frontiers in pharmacology*, 14, 1231401.
84. Akeren, Z., & Hintistan, S. (2021). Kanser Hastalarının Semptom Yönetiminde Aromaterapi Kullanımı. *Sakarya Üniversitesi Holistik Sağlık Dergisi*, 4(3), 136-154
85. Somasegar, S., vd. (2024). Controversies in the Surgical Management of Gynecologic Cancer: Balancing the Decision to Operate or Hesitate. *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, 44(3), e438550.
86. Bavadekar S, Panchal P, Hanbashi A, Vansal S. (2014) Cytotoxic effects of selective serotonin-and serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors on human metastatic breast cancer cell line, MCF-7. *FASEB J.*;28(1 Supplement):842-3.
87. Hotun Şahin, N., vd (2024). Jinekolojik Kanserli Kadınlarda Kişilik Tiplerinin İncelenmesi. *Etkili Hemşirelik Dergisi*, 17(2), 270-282.
88. Jin, Z., Chenghao, Y., & Cheng, P. (2022). Anticancer effect of tanshinones on female breast cancer and gynecological cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 824531.
89. Zheng, G., Baandrup, L., Wang, J., vd., (2024). Antidepressant use and ovarian cancer risk: Evidence from nationwide studies with > 14,000 cases from Denmark and Sweden. *Maturitas*, 185, 108009.
90. Song, Y., Yang, X., & Yu, B. (2022). Repurposing antidepressants for anticancer drug discovery. *Drug discovery today*, 27(7), 1924-1935.
91. Kadasah, S. F., Alqahtani, A. M., Alkhamash, A., & Radwan, M. O. (2024). Beyond Psychotropic: Potential Repurposing of Fluoxetine toward Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(12), 6314.
92. He, L., Fu, Y., vd. (2023). Antidepressants as Autophagy Modulators for Cancer Therapy. *Molecules*, 28(22), 7594.
93. Rehem, A. R., vd., (2024). Antifungal and antibiofilm effect of duloxetine hydrochloride against *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Folia microbiologica*, 10.1007/s12223-024-01164-1.
94. Yamamoto, K., Tsuji, M., Oguchi, T., vd., (2024). Comparison of Protective Effects of Antidepressants Mediated by Serotonin Receptor in A β -Oligomer-Induced Neurotoxicity. *Biomedicines*, 12(6), 1158.

95. Matsushima-Nishiwaki, R., Kamoi, S., & Kozawa, O. (2023). Upregulation by duloxetine of the transforming growth factor- α -induced migration of hepatocellular carcinoma cells via enhancement of the c-Jun N-terminal kinase activity. *Cell biochemistry and function*, 41(7), 814–822.
96. Kajiwara, I., Sano, M., Ichimaru, Y., vd., (2020) Duloxetine improves cancer-associated pain in a mouse model of pancreatic cancer through stimulation of noradrenaline pathway and its antitumor effects. *PAIN* 161(12): p 2909-2919, December 2020
97. Nabekura, T., Ishikawa, S., Tanase, M., Okumura, T., & Kawasaki, T. (2022). Antidepressants induce toxicity in human placental BeWo cells. *Current research in toxicology*, 3, 100073.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Fatma KALAŞ

Yabancı Dil: İngilizce

Doğum Yeri ve Yılı:

E-posta:

EĞİTİM DURUMU

Yüksek Lisans (2024)

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. A. Tansu Koparal

Tez Konusu: Duloksetinin Anti Kanser Aktivitelerinin Skov-3 Ve Huvec Hücreleri Üzerinde Araştırılması

Lisans (2017)

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

Lisans Bitirme Tezi: Karaciğer Hastalıklarında İlaç- Doz Önerileri

Danışman: Prof. Dr. Sinan Süzen

İŞ DENEYİMİ

Kalaş eczanesi (2018- ...) sahibi ve mesul müdürü

STAJLAR

Sivrihisar eczanesi – stajyer eczacı	2014-2015
Vilsan Veteriner İlaçları San. Tic. A.Ş. AR-GE bölümü	2016
Drogsan İlaçları San. ve Tic. A.Ş. AR-GE bölümü	2017