

ESİN BAYRALI

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2020





**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS)

**KURKUMİN VE ANALOGLARININ DİRENÇ
MEKANİZMALARI İLE İLİŞKİLİ ADAY GENLER VE
MİRNA ÜZERİNE ETKİLERİNİN OVER KANSERİ
HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ**

ESİN BAYRALI

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. ÖZLEM TİMİRCİ KAHRAMAN**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Esin Bayralı



İTHAF

İyiliğe ve güzelliğe dair ne varsa kaynağım olan annem Ayşe Bayralı'ya ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim sırasında danışmanlığımı üstlenerek, görüş ve önerileri ile bana yol gösteren İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi saygıdeğer hocam Doç.Dr.Özlem TİMİRCİ KAHRAMAN'a hem akademik katkıları hem de manevi katkılarından dolayı içtenlikle teşekkür ederim.

Tüm yardım ve destekleri için Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı başkanı sayın Prof. Dr. İlhan YAYLIM'a ve tüm Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve çalışanlarına,

Tez çalışmamın Flow Sitometri analizleri sırasında yardımları ve değerli katkılarından dolayı Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Esin ÇETİN'e,

Tez çalışmam sırasında vermiş olduğu değerli katkılardan dolayı Yeni Yüzyıl Üniversitesi Öğretim Üyesi Dr.Öğr.Üyesi Mehmet Fatih SEYHAN'a

Deney sürecindeki yardımlarından dolayı MOLGEN çalışanlarına,

Tez dönemim boyunca her zaman yanımda olup, beni her zaman destekleyen Uzm. Biyokimyager Ali Rıza ÜLKER'e

Ve tüm eğitim hayatım boyunca hem sevgilerini hem de desteklerini her daim hissettiğim canım ailem Ayşe BAYRALI'ya, Zeynel Abidin BAYRALI'ya, Gülay BAYRALI'ya ve Uğur BAYRALI'ya içtenlikle teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:35365

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Over Kanseri	4
2.2. Over Kanseri Epidemiyolojisi	5
2.3. Over Kanseri Sınıflandırılması.....	5
2.4. Over Kanseri Risk Faktörleri	11
2.5. Over Kanseri Evreleme ve Tanı Yöntemleri.....	15
2.5.1. Tanıda Görüntüleme Yöntemlerinin Rolü... ..	17
2.6. Over Kanseri Tedavisi... ..	18
2.6.1. Sisplatin ve Direnç Mekanizmaları	20
2.7. Over Kanseri ve Direnç Mekanizmaları Arasındaki İlişki.....	22
2.8. GSTP-1 ve miRNA-133b.....	23
2.9. Over Kanseri ve Kemoterapötik İlaç Dirençliliğinde Doğal Ürünlerin Önemi.....	27
2.10. Kurkumin ve Analoglarının Antikanserojenik ve Kemoterapötik Özellikleri.....	28
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	31
3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE SARF MALZEMELER.....	31
3.3. Kullanılan Solüsyonlar.....	31
3.3.1. RPMI 1640 Besiyeri	31

3.3.2. Dondurma Besiyeri	31
3.3.3. PBS (Fosfat Tuz Tamponu) Hazırlanması	31
3.3.4. Kurkumin ve Kurkuminoidlerin Hazırlanması	32
3.3.4.1. Kurkumin ve Kurkuminoidlerin Ana Stok Solüsyonlarının Hazırlanması.....	32
3.3.5. Sisplatin Ana Stok Solüsyonunun Hazırlanması.....	32
3.4. Hücre Kültürü	32
3.4.1. Hücre Çözme	33
3.4.2. Hücre Ekme	33
3.4.3. Hücre Alt Kültürleme	33
3.4.4. Hücre Dondurma.....	34
3.5. Hücre Sayımı	34
3.6. WST-1 Yöntemi ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi	34
3.7. Anneksin V-FITC Yöntemi ile Apoptoz Tayini	36
3.8. miR-133-b ve GSTP-1 Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi.....	36
3.8.1. Total RNA İzolasyonu	36
3.8.2. RNA Miktarının Belirlenmesi.....	36
3.8.3. cDNA Eldesi ve Saklanması.....	36
3.9. miR-133b ve GSTP-1 Gen Ekspresyonunun Kantitatif Real Time PCR (Q-RT-PCR) ile Tespit Edilmesi	40
3.10. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılacak İstatiksel Yöntemler.....	40
3. BULGULAR.....	41
3.1. WST-1 YÖNTEMİ İLE HÜCRE CANLILIĞI VE SİTOTOKSİSİTE SONUÇLARI.....	41
3.2. Anneksin V-PI ile Apoptotik Değerlendirmeler... ..	59
3.3. GSTP-1 e MirRNA-133b Genine İlişkin Real Time PCR Sonuçları.....	62
4. TARTIŞMA... ..	65
KAYNAKLAR	72
HAM VERİLER	82
FORMLAR	83
ETİK KURUL KARARI	84
PATENT HAKKI İZNİ	85
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	86
ÖZGEÇMİŞ	87

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Tip I ve Tip II Karsinomların Klinik-Patolojik ve Moleküler Özellikleri

Tablo 2-2: Erken Evre Seröz Karsinom ile İleri Evre Seröz Karsinomun Karşılaştırılması

Tablo 2-3: Over Kanseri Risk Faktörleri

Tablo 2-4: FIGO Evreleme Sistemi Evre I Over Kanseri

Tablo 2-5: FIGO Evreleme Sistemi Evre II Over Kanseri

Tablo 2-6: FIGO Evreleme Sistemi Evre III Over Kanseri

Tablo 2-7: FIGO Evreleme Sistemi Evre IV Over Kanseri

Tablo 3-1: Deney Gruplarının Dizayını

Tablo 3-2: Total RNA-cDNA Denatürasyon Ortamı

Tablo 3-3: Total RNA-cDNA Reaksiyon Ortamı

Tablo 4-1: A2780cp Hücre Hattında Uygulanan Kurkumin'in İstatistiksel Veri Analiz Sonuçları

Tablo 4-2: A2780 Hücre Hattında Uygulanan Kurkumin'in İstatistiksel Veri Analiz Sonuçları

Tablo 4-3: A2780cp Hücre Hattında Uygulanan DMC'nin İstatistiksel Veri Analiz Sonuçları

Tablo 4-4: A2780 Hücre Hattında Uygulanan DMC'nin İstatistiksel Veri Analiz Sonuçları

Tablo 4-5: A2780cp Hücre Hattında Uygulanan BDMC'nin İstatistiksel Veri Analiz Sonuçları

Tablo 4-6: A2780 Hücre Hattında Uygulanan BDMC'nin İstatistiksel Veri Analiz Sonuçları

Tablo 4-7: A2780cp Hücre Hattında Uygulanan Sıplatin'in İstatistiksel Veri Analiz Sonuçları

Tablo 4-8: A2780 Hücre Hattında Uygulanan Sisplatin'in İstatistiksel Veri Analiz Sonuçları



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Over, Fallop Tüpü ve Uterusun Anatomisi ve Biyolojisi

Şekil 2-2: Sisplatinin Etki Mekanizması

Şekil 2-3: Over Kanserinde Sisplatin Direnç Mekanizmaları

Şekil 2-4: Sisplatin İnaktivasyonu

Şekil 2-5: Kurkuma Longa Bitkisinin Etken Maddeleri. A: Kurkumin,

B: Demetoksikurkumin, C: Bisdemetoksikurkumin

Şekil 4-1: A2780cp Hücre Hattı Üzerinde Kurkumin'in Doz ve Zaman Bağımlı Olarak Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Şekil 4-2: A2780 Over Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Kurkumin'in Doz ve Zaman Bağımlı Olarak Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Şekil 4-3: A2780cp Hücre Hattı Üzerinde DMC'nin Doz ve Zaman Bağımlı Olarak Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Şekil 4-4: A2780 Over Kanseri Hücre Hattı Üzerinde DMC'nin Doz ve Zaman Bağımlı Olarak Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Şekil 4-5: A2780cp Hücre Hattı Üzerinde BDMC'nin Doz ve Zaman Bağımlı Olarak Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Şekil 4-6: A2780 Over Kanseri Hücre Hattı Üzerinde BDMC'nin Doz ve Zaman Bağımlı Olarak Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Şekil 4-7: A2780cp Hücre Hattı Üzerinde Sisplatin'in Doz ve Zaman Bağımlı Olarak Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Şekil 4-8: A2780 Over Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Sisplatin'in Doz ve Zaman Bağımlı Olarak Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Şekil 4-9: A2780cp Hücre Hattında 1 μ M Doz-12.Saatte Sisplatinli Kombinasyon Gruplarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Şekil 4-10: A2780cp Hücre Hattında 1 μ M Doz-12.Saatte Kombinasyon Gruplarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Şekil 4-11: A2780 Hücre Hattında 1 μ M Doz-12.Saatte Sisplatinli Kombinasyon Gruplarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Şekil 4-12: A2780 Hücre Hattında 1 μ M Doz-12.Saatte Kombinasyon Gruplarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Şekil 4-13: A2780cp Hücre Hattında 12 h-1 μ M Konsantrasyonda Apoptoz-Nekroz Tayini

Şekil 4-14: A2780cp Hücre Hattında Sisplatinli Kombinasyon Gruplarının 12 h-1 μ M Konsantrasyonda Apoptoz-Nekroz Tayini

Şekil 4-15: A2780 Hücre Hattında 12 h-1 μ M Konsantrasyonda Apoptoz-Nekroz Tayini

Şekil 4-16: A2780 Hücre Hattında Sisplatinli Kombinasyon Gruplarının 12 h-1 μ M Konsantrasyonda Apoptoz-Nekroz Tayini

Şekil 4-17: A2780 ve A2780cp Hücre Hattında Herhangi Etken Madde Uygulaması Olmadan GSTP-1 ve Mir-133b mRNA Ekspresyonundaki Kat Değişimleri

Şekil 4-18: A2780cp Hücre Hattında 12. saat ve 1 μ M Doz Uygulama Sonrası GSTP-1 ile Mir-133b'nin mRNA Ekspresyonundaki Kat Değişimleri

Şekil 4-19: A2780cp Hücre Hattında 12. saat ve 1 μ M Doz Uygulama Sonrası GSTP-1 ile Mir-133b'nin mRNA Ekspresyonundaki Kat Değişimleri

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

EOC	İleri Evre Epitelyal Over Kanseri
OYE	Yumurtalık Yüzey Epiteli
EME	Endometrial Epitel
EMS	Endometriyal Stroma
BRCA	Meme Kanseri Duyarlılığı
STIC	Seröz Tubal İntraepitelyal Karsinom
HGSC	İleri Evre Seröz Karsinom
LGSC	Erken Evre Seröz Karsinom
ER	Östrojen Reseptörü
PR	Progesteron Reseptörü
MAPK	Mitojenle Aktifleştirilen Protein Kinaz
SBOT	Seröz Borderline Tümörler
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
LH	Luteinize Edici Hormon
FIGO	Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu
RMI	Malignite İndeksi
BT	Bilgisayarlı Tomografi
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
FDA	Federal İlaç Dairesi
RTOG	Radyasyon Tedavisi Onkoloji Grubu
CTR-1	Bakır Taşıyıcı -1
NER	Nükleotid Eksizyon Onarımı
ERCC1	Eksizyon Tamiri Çapraz Tamamlama Grubu 1
MMR	Yanlış Eşleşme Tamir Mekanizması
GSH	Glutatyon
GST	Glutatyon S-Transferaz
NRF2	Eritroid Kaynaklı Nükleer Faktör 2

DMC	Demetoksikurkumin
BDMC	Bisdemetoksikurkumin
MMP-9	Matris Metalloproteinaz-9



ÖZET

Bayralı, E. (2020). Kurkumin ve Analoglarının Direnç Mekanizmaları ile İlişkili Aday Genler ve miRNA Üzerine Etkilerinin Over Kanseri Hücrelerinde İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Over kanseri, jinekolojik maligniteler arasında beşinci sırada olmasına rağmen mortalite oranı en yüksek olan kanser türüdür. Son yıllarda, doğal ürünler aynı anda birçok hedefe ulaşabildiği, kemoterapötiklerin toksisitesini ortadan kaldırdığı ya da minimuma indirdiği için, bu ürünlerin kemoterapötikler ile kombine edilerek kullanılmasıyla ilaç direnç mekanizmalarına yönelik klinik çalışmalara başlanmıştır. Bu bilgiler ışığında, doğal ürünlerden kurkumin ve analoglarının (demetoksikurkumin ve bisdemetoksikurkumin) insan over kanseri ve sisplatine dirençli over kanseri hücre hattında tekli ve kombine uygulanması sonrası hücre proliferasyonu ve apoptoz üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Etken maddelerin hücre proliferasyonu üzerine etkisini incelemek amacıyla her iki hücre hattında geniş bir doz aralığında (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M) ve zaman diliminde (6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h) WST-1 analizi yapılmıştır. Yapılan WST-1 analizi sonucu her iki hücre hattında tekli ve kombinasyon uygulamalarının hücre proliferasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Belirlenen en uygun doz (1 μ M) ve zaman (12.saat) aralığında tüm grupların apoptoz deneyleri yapılmıştır. Her iki hücre hattında da uygulanan etken maddelerin erken apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca bu tez projesi ile sisplatin dirençli over kanseri hücre hattında olası direnç mekanizmalarından glutatyon metabolizması ile ilişkili aday bir genin (GSTP-1) ve mikroRNA'nın (miR-133b) ekspresyon çalışması yapılarak kurkumin ve analogları ile ilgili moleküler mekanizma çalışmalarına katkıda bulunulması hedeflenmiştir. Çalışmamızda, dirençli over kanseri hücre hattında etken maddelerin sisplatin ile kombine uygulanması GSTP-1 geninin ekspresyon seviyesinin azalmasını sağlamış ve bu durum direnç mekanizmasının aydınlatılmasına katkı sunmuştur. Sisplatin direnç mekanizmasında glutatyon metabolizmasının rolü ve miRNA arasındaki ilişkinin aydınlatılması ile yüksek mortalite oranına sahip over kanserinin tedavisinde alternatif yaklaşımların elde edilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda sisplatinin sitotoksik etkilerinin doğal bileşikler ile azaltılması öngörülmüştür.

Anahtar Kelimeler : Over, Kanser, Kurkuminoidler, Dirençlilik, Gen, Ekspresyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 35365

ABSTRACT

Bayralı, E. (2020). The Investigation of Curcumin and Its Analogues on Candidate Genes Associated with Resistance Mechanisms and miRNA in Ovarian Cancer Cells. Istanbul University, Institute of Health Science, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine. Master Thesis. Istanbul.

Ovarian cancer has the highest mortality rate although it ranks fifth among gynecological malignancies. In recent years, clinical studies have been initiated on drug mechanisms of using natural products in combination with chemotherapeutics because of these products can reach many target simultaneously, eliminate or minimize the toxicity of chemotherapeutics. In the light of this information, it was aimed to investigate the effects of natural products curcumin and its analogues (demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin) on cell proliferation and apoptosis after single and combined administration in human ovarian cancer and cisplatin resistant ovarian cancer cell line. WST-1 analysis was performed in both cell lines in a wide dose range (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M) and time period (6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h) to examine the effect of active substances on cell proliferation. Apoptosis experiments of all groups were analysed, after determining the most appropriate dose (1 μ M) and time (12th hour) interval. It has been shown that the active substances applied in both cell lines induce early apoptosis. In addition, with this thesis project, it is aimed to contribute to molecular mechanism studies of curcumin and its analogues by expressing a candidate gene (GSTP-1) and microRNA (miR-133b) related to glutathione metabolism, one of the possible resistance mechanisms in the cisplatin resistant ovarian cancer cell line. In our study, the combined application of active substances with cisplatin in resistant ovarian cancer cell line led to a decrease in the expression level of the GSTP-1 gene and this situation contributed to the elucidation of the resistance mechanism. It is aimed to elucidate the relationship between glutathione metabolism and miRNA in the cisplatin resistance mechanism and to obtain alternative approaches in the treatment of ovarian cancer with high mortality. At the same time, it was thought that the cytotoxic effects of cisplatin would be reduced by natural compounds.

Key Words: Ovarian, Cancer, Curcuminoids, Resistance, Gene, Expression

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No.35365

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Over kanseri, kadınlarda görülen en sık beşinci kanserdir ve en yaygın görülen türü ise epitelyal over kanseridir. Epitelyal over kanseri, jinekolojik maligniteler arasında mortalite oranı en yüksek olan ve sadece kadınlarda ortaya çıkan bir kanser türüdür. Over kanserindeki en önemli prognostik faktör, tanı anındaki hastalığın evresidir. Son yıllarda teknolojinin ilerlemesi ile birlikte hızla artan yeni tedavi seçeneklerine rağmen, over kanserine bağlı mortalite de önemli bir azalma olmamış ve beş yıllık yaşam süresi %47 düzeylerinde kalmıştır (1). Over kanserinin, diğer jinekolojik kanserlerden farklı olarak, hastaların hekime başvurmasına sebep olacak erken ve özgül uyarıcı belirtileri olmaması ve etkin bir tarama yönteminin olmamasından dolayı bu hastaların 2/3'ünden fazlası ancak evre III-IV'te tanı almaktadır (2). İleri evre epitelyal over kanseri (EOC) hastalarında sağ kalım, cerrahi ve kemoterapideki modern gelişmelere rağmen hala kötüdür. Kombine kemoterapi uygulamalarının geliştirilmesi ile platin ve taksanların (paklitaksel, dosetaksel) birlikte kullanımının hastalarda sağkalımı uzattığı gözlenmiştir. Ancak çoğu hastada 1-2 yıl içinde hastalık nüks etmektedir ve 5 yıldan fazla sağkalım oranı yalnızca %30'dur. Bu sonuçlara bağlı olarak kemoterapötiklerin kullanımı sırasında ilaçlara karşı bir direnç mekanizmasının geliştiği gösterilmiştir (3). Klinikte kullanılan biyobelirteçlere, çok sayıda kemoterapötik dirençli hastalar arasında EOC'de platine dirençli tümörleri belirlemek amacıyla önemli derecede ihtiyaç vardır.

Tez projemiz kapsamında; kurkumin ve analoglarının (demetoksikurkumin, bisdemetoksikurkumin) ve kemoterapi ilacı olarak kullanılan sisplatinin tekli ve kombine kullanımda olası antiproliferatif, apoptotik ve kemoterapötik etkilerinin in vitro olarak duyarlı ve dirençli over kanseri hücreleri üzerinde incelenmesi amaçlanmıştır. Bu sayede; kemoterapi/radyoterapi tedavilerine bir alternatif olarak, yan etkisi olmadığı bilinen doğal bir üründen elde edilen etken maddelerin kanser tedavisinde kullanılması ve eğer bu etken maddeler kemoterapötik etkisini potansiyalize ederse ve sinerjistik bir etkileşim görülürse kemoterapötik dozunun azaltılarak yan etkilerinin önlenmesi yada azaltılması hedeflenmiştir. Ayrıca sisplatin duyarlı ve dirençli over kanseri hücrelerinde kurkumin ve analoglarının direnç

mekanizmalarından glutatyon metabolizması ile ilişkili GSTP-1 ve miR-133b genlerinin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızın Özgün Değeri;

- Over kanserine yönelik olarak literatürde farklı tedavi yaklaşımlarını kapsayan birçok çalışma bulunmaktadır. Fakat literatür bilgileri göz önüne alındığında; demetoksikurkumin ve bisdemetoksikurkumin'in dirençli over kanseri hücrelerine uygulanması ile GSTP-1 ve miR-133b ekspresyon düzeylerinde nasıl bir değişim olduğunu inceleyen bir çalışma bulunmaması çalışmamızı özgün kılmaktadır.
- Kurkumin analoglarının kullanımının over kanseri tedavisinde antiproliferatif ve apoptotik etkinliğinin yanı sıra özellikle direnç azaltıcı etkinliğinin olup olmadığının in vitro olarak araştırılması bu alanda yeni bir yaklaşım olarak sunulmuştur.
- Literatürde bir ilk olarak her iki hücre hattında 14 farklı tekli ve kombinasyon grupları, geniş doz aralığı (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M) ve saat diliminde (6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h) uygulanmıştır.
- Tez projemiz kapsamında aktif bileşenlerin kemoterapi ilacı olarak kullanılan sisplatin ile birlikte olası sinerjistik etkisi ve inhibitör dozu saptanmıştır. Tüm bunlar çalışmamızın özgün niteliğini arttırmaktadır.

Çalışmamızdan Beklenen Sonuçlar ;

- Over kanseri dirençli hücre hattı (A2780cp) ile over kanseri duyarlı hücre hattı karşılaştırıldığında (A2780) GSTP-1 ekspresyon seviyesinin dirençli hatta artmış olmasını bekliyoruz.
- Kurkumin ve analoglarının etken madde olarak uygulanmasının ardından inhibisyona bağlı olarak GSTP-1 ekspresyon seviyesinin azalmasını bekliyoruz.
- Projemizde kurkumin ve analoglarının direnç mekanizmasına etkisini araştırmayı hedeflediğimiz için dirençli hatta kurkumin-GSTP1-sisplatin bağlantısı kurup, etken maddelerin GSTP-1 ekspresyonunu azaltarak direnç gelişimini önlediğini savunuyoruz.
- Ayrıca miR-133b ekspresyon seviyesinin literatür ile uyumlu olarak dirençli hücre hattında anlamlı derece de azalmış olmasını bekliyoruz.

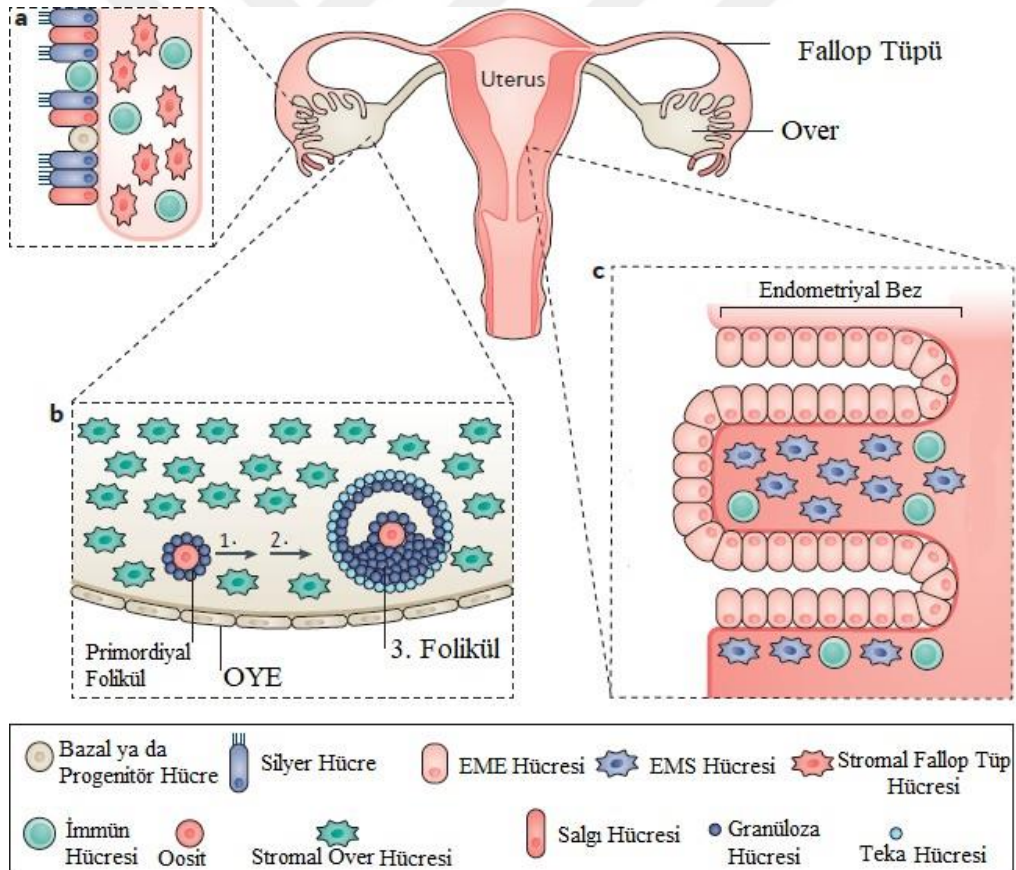
- Kombine uygulama sonrasında sinerjistik bir etkileşim görülürse kemoterapötik dozunun azaltılarak yan etkilerinin önlenebileceği ya da azaltılabileceği görüşündeyiz.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Over Kanseri

Kansere bağlı ölümlerde beşinci sırada yer alan, moleküler heterojenite özelliği gösteren over kanseri, kadınlarda en fazla ölüme neden olan jinekolojik kanser türüdür. Over kanserinin patogenezi, öncü lezyonları ve biyolojisi çok uzun yıllar boyunca anlaşılmamış ve araştırma konusu olmuştur (4). Şekil 1-a'da gösterildiği gibi over fallop tüpü epitelyumu, salgı hücreleri ve silyer hücreler olan iki ana tip epitel hücrelerinden oluşur. Silyer hücreler ile yumurtanın taşınması, fallop tüpün kas duvarının kasılmalarıyla kolaylaştırılır. Bazal olarak yerleştirilmiş küçük hücreler, son zamanlarda karakterize edilmiş epitelyal kök veya progenitör hücreleri göstermektedir.



Şekil 2-1. Over, Fallop Tüpü ve Uterusun Anatomisi ve Biyolojisi (5)

Şekil 1-b'de yumurtalık iç kısmı, yumurtalık korteksi/yumurtalık yüzeyi epitelinin (OYE), yumurtalık stromal hücrelerinin ve yumurtalık foliküllerinin oositler, granüloza hücreleri ve teka hücreleri gibi çeşitli olgunlaşma aşamalarındaki hücrelerini gösterir. Granulosa hücreleri östrojenleri sentezlerken, teka hücreleri de androjenleri sentezler ve oosit gelişimini destekler. Şekil 1-c'de ise endometrium; endometriyal epitel (EME) ve endometriyal stroma (EMS) hücrelerinden oluşur. Döllenme ve implantasyon sırasında, bu hücreler embriyonun beslenmesini destekler. Bu iki hücre tipi; EME ve EMS ektopik endometriyal doku da yani endometriyoziste bulunur. Endometriyal fizyolojisi kapsamlı bir şekilde incelenirken, fallop tüp epitelinin biyolojisi ve stroması tam olarak anlaşılamamıştır (5).

2.2. Over Kanseri Epidemiyoloji

Kanser insidansı ve mortalite oranları dünya çapında artarken 2018 yılında 295.000'den fazla kadına over kanseri teşhisi konuldu ve yaklaşık 185.000 kadın hayatını kaybetti (6). 2000'li yılların başından bu yana ölüm oranlarında yılda %2,3 oranında azalma kaydedilirken, görülme sıklığında ise yılda %1,6 oranında düşüş izlenmiştir (7). Ancak, 2020 yılında sadece Amerika'da yaklaşık 22.000 yeni vaka, 14.000'ne yakın over kanserine bağlı ölüm beklenmektedir (8). Genellikle spesifik belirti göstermediği hatta çoğu zaman asemptomatik seyreden over kanseri hastalarının %70'den fazlası ise evre III ve IV'e kadar tanı koyulamadığı için 5 yıllık sağ kalım oranı %29'dur. Over kanseri hastalarının sadece %15'i erken evre tanısı almakta ve 5 yıllık sağ kalım oranı %92'dir. Dolayısıyla over kanseri farkındalığına rağmen çok az hastanın erken evre over kanseri tanısı almasının dışında, 5 yıllık sağ kalımda önemli ölçüde bir değişim izlenmemiş ve genellikle sessiz katil olarak adlandırılan over kanserinin 5 yıllık sağ kalımı %50'nin altında kalmıştır (9,10).

2.3. Over Kanseri Sınıflandırılması

Morfolojik ve genetik özellikleri açısından birbirinden farklı olan her bir alt tipin tanımlanması, risk faktörlerinin belirlenmesi; hastalığın prognozunu, tanı ve tedavisini etkilediği için büyük öneme sahiptir.

Over kanseri; epitelyal (en sık görülen), germ hücreli ve sex-cord stromal olmak üzere 3 temel sınıfa ayrılabilir. Epitelyal over kanserinin 4 ana histolojik alt tipi vardır; seröz, endometriyoid, müsinöz ve berrak hücreli. Seröz tümörler ise; ileri evre seröz karsinomlar ve erken evre seröz karsinomlar olarak sınıflandırılır (11).

2.3.1. Epitelyal Over Kanseri

Kurman ve arkadaşları yapılan morfolojik ve moleküler genetik çalışmalara dayanarak epitelyal over kanserinin tek bir hastalık sınıfı olmadığını; tip I ve tip II olarak iki gruba ayıran dualistik bir model önermiştir (12).

Tip I tümörler genellikle erken evrede bulunan, belirgin morfolojik farklılıklara sahip düşük dereceli seröz, düşük dereceli endometriyoid, berrak hücreli ve müsinöz karsinomlardır. Tip II tümörlere kıyasla daha stabil olup, spesifik alt tiplerde belirgin mutasyon modeli gösterirler. Tip II tümörler ise daha agresif olup, hemen her zaman ileri evrede bulunan, hızlı gelişen, alt sınıflandırılmada morfolojik farklılıklar daha belirsiz olup; papiller, glandüler ve solid paternler gösterip ve baskın paterne bağlı olarak yüksek dereceli seröz, yüksek dereceli endometriyoid ve farklılaşmamış karsinomlar olarak tanı konurlar. Bu neoplazmalara ek olarak, tip II karsinomlarla özdeş epitel bileşenlerine sahip oldukları için malign karışık mezodermal tümörler (karsinosarkomlar) tip II kategorisine dahil edilir. Tüm epitelyal over karsinomlarının yaklaşık %75'ini oluşturdukları ve nispeten benzer morfolojik özelliklere sahip olduklarından, over kanseri hastaları tek bir hastalık olarak kabul edilmiştir. Ancak, moleküler genetik çalışmaları ve her alt tipin sergilediği mutasyon modeli ile farklı moleküler yollar boyunca farklı yumurtalık karsinomlarının geliştiği gösterilmiştir (12–14). Tip I ve tip II tümörler arasındaki belirgin klinik-patolojik ve moleküler farklılıklar Tablo 2-1'de gösterilmiştir.

Tablo 2-1: Tip I ve Tip II Karsinomların Klinik-Patolojik ve Moleküler Özellikleri

Özellikler	Tip I	Tip II
Evre	Sıklıkla Erken Evre	Hemen Her Zaman İleri Evre
Tümör Derecesi	Düşük Dereceli*	Yüksek Dereceli
Proliferasyon Aktivitesi	Genellikle Düşük	Her Zaman Yüksek
Kemoterapiye Yanıt	Orta	İyi (Sonrasında Tekrar Eder)
Erken Tanı	Mümkün	Zorlayıcı
Tümör İlerlemesi	Yavaş ve sakin	Hızlı ve agresif
Genek Klinik Durum	İyi	Kötü
Risk Faktörü	Endometriyozis	Yumurtlama döngüsü; BRCA Mutasyonu
Öncü Lezyon	Atipik Proliferatif (Borderline) Tümörler	Çoğunlukla STIC
Kromozomal Kararlılık	Düşük	Yüksek
TP53 Mutasyonu	Seyrek	Neredeyse Her Zaman
Homolog Rekombinasyon Onarımı	Nadiren Defektif	Sıklıkla Defektif

*Berrak Hücreli Karsinom derecelendirmemekle birlikte genellikle ileri evre olarak kabul edilir.

STIC; Seröz Tubal İntraepitelyal Karsinom

Genetik olarak daha kararlı olan Tip I tümörler KRAS, BRAF, ERBB2, CTNNB1, PTEN ve PIK3CA'yı içeren ancak nadiren TP53 gibi spesifik mutasyonlarla karakterize edilir. Tip II tümörler ise TP53 mutasyonlarının çok yüksek bir frekansına sahip olup, tip I tümörlerde saptanan mutasyonları nadiren barındırırlar. Genetik olarak oldukça kararsızdırlar. KRAS, BRAF ve ERBB2 mutasyonları düşük dereceli seröz karsinomların yaklaşık üçte ikisinde görülürken, bu tümörlerde TP53 mutasyonları nadirdir (15). Düşük dereceli endometrioid karsinomlar ise Wnt sinyal yolağında, CTNNB1 (β -katenin kodlayan), PTEN ve PIK3CA'nın somatik mutasyonlarını içeren anomalilere sahiptir. Müsinöz karsinom örneklerinin %50'sinden fazlası KRAS mutasyonlarına sahiptir (16). Berrak hücreli karsinom yüksek oranda PIK3CA aktive edici mutasyonlara sahip olması bakımından benzersizdir. Tip II tümörlerin prototipi olan yüksek dereceli seröz karsinom, çok sık görülen TP53 mutasyonları (vakaların > %80'i) ve CCNE1 (siklin E1) amplifikasyonu, ancak KRAS, BRAF, ERBB2 gibi çoğu tip I tümörü karakterize eden nadir mutasyonlarla karakterizedir. Her ne kadar sadece az sayıda malign karışık mezodermal tümör moleküler olarak analiz edilmiş olsa da,

çok az sayıda benzer moleküler genetik profil sergilemiştir. Geçiş hücresi (Brenner) tümörlerinde çok az moleküler genetik veri olduğundan Tablo 2-1’de yer almamıştır (17).

2.3.2. İleri Evre Seröz Karsinom

İleri evre seröz karsinom (HGSC), tüm epitelyal over kanserlerinin %75’ini oluşturan en yaygın over kanseri türüdür. 45 ile 65 yaş arasındaki kadınları sıklıkla etkilemekle birlikte hemen hemen her zaman derece III veya IV de tanı alan genel prognozu kötü olan bir karsinomdur. Tanı alan olguların çok azı (< %10) overde sınırlıdır. Epitelyal over kanserlerinin kökeni ve patogenezi yapılan birçok çalışmaya rağmen hala bulunamamıştır. HGSC’nin patogenezinde en yaygın görüş ise yumurtalık yüzey epitelinin ya da kortikal inklüzyon kistlerinden gelişmiş olmasıydı ancak yumurtalık da tatmin edici bir öncü lezyon bulunamadı. Seröz tümörler düşünüldüğü gibi kortikal inklüzyon kistlerinden gelişse bile yumurtalık yüzey epitelinin metaplazi işlemi ile değil tubal implantasyon (mülleryan tip) yolu ile gerçekleşebilir. Yapılan moleküler genetik çalışmalarda öncü lezyonun “seröz tubal intraepitelyal karsinom” (STIC) adı verilen fallop tüpünün fimbrial bölgesinde bilinmeyen bir epitelyal karsinom olduğu gösterilmiştir (18,19).

2.3.3. Erken Evre Seröz Karsinom

Erken evre seröz karsinom (LGSC); tüm over kanserlerinin %5’inden daha azını oluşturup ileri evre seröz karsinomdan farklı klinik ve moleküler özelliklere sahiptir. HGSC ile karşılaştırıldığında, LGSC genç kadınlarda ortaya çıkma eğiliminde ve daha iyi prognoza sahiptir. III ve IV derece 5 yıllık sağ kalım HGSC için % 32,1 iken LGSC için % 54,2’dir. Ancak; HGSC gibi LGSC’nin yaklaşık %70’i tanı aldığında ileri evrededir (20,21). LGSC’lar genellikle seröz borderline tümörlerden (SBOT) köken alıp ve yüksek oranda BRAF, KRAS mutasyonlarına sahiptir. LGSC’lar daha fazla östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve TP53 ekspresyonuna sahiptir. Kümülatif araştırmalar mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolunun erken evre seröz karsinomun patogenezinde rol oynadığını göstermektedir. Patogeneizde hormonal rolün etkisi yüksek olabileceği için de menopoz öncesi LGSC gelişimi artmaktadır. LGSC’lar genellikle seröz borderline tümörlerde (SBOT) ortaya çıkar ve yüksek oranda BRAF (%0-33, ortalama %5) ve KRAS (%19-55) mutasyonları görülür.

Ayrıca araştırmalar NRAS mutasyonlarının LGSC gelişiminde onkojenik bir gen olabileceğini düşündürmektedir (22,23).

Tablo 2-2: Erken Evre Seröz Karsinom ile İleri Evre Seröz Karsinomun Karşılaştırılması

	Erke Evre Seröz Karsinom	İleri Evre Seröz Karsinom
Tanı alındığında Ortalama Yaş	55 Yaş	63 Yaş
Görülme Sıklığı	%6-10	70%
Toplam Sağ Kalım	99 Ay	57 Ay
5 Yıllık Sağ Kalım*	75%	40%
Kemosensitivite**	%23.1	%90.1
Öncü Lezyon	Papiller Tubal Hiperplazi	STIC
Risk Faktörleri	Endometriyozis	Düşük Doğum Sayısı
Moleküler Mutasyon	KRAS, BRAF, ERBB2, NRAS	TP53 ve BRCA

2.3.4. Endometriyoid Karsinom

Tüm epitelyal over kanserlerinin %5 ile %10'unu oluşturan endometrioid karsinom; sıklıkla 50'li ve 60'lı yaş grubundaki kadınları (ortalama 57 yaş) etkilemektedir (24). Endometrioid over karsinomlarının önemli bir kısmı (%10-50) endometriozisden, yaklaşık %20'si endometriyal kanserle ilişkilidir. Ultrasonda genellikle kist sıvısının düşük seviyeli ekojenitesi veya katı kitleleri olan büyük, tek taraflı, multiloküler katı tümörlerdir. Seröz karsinomlardan farklı olarak çoğunlukla erken evrede tanımlanır ve çok daha iyi prognoz özelliği gösterirler (25). Lynch sendromu ile ilişkili olduğu bilinen endometriyoid over karsinomu için çeşitli gen mutasyonları kaydedilmiştir (26). Endometrioid karsinomlar sıklıkla WNT sinyal yolunda (CTNNB1), PI3K yolunda (PIK3CA ve PTEN) ve SWI/SNF kompleksinde (ARID1A) mutasyonlar barındırır. En yaygın görülen mutasyon ise PTEN somatik mutasyonudur (27).

2.3.5. Müsinöz Karsinom

Müsinöz karsinomlar, epitelyal over kanserlerinin %2-4'ünü oluşturan nadir histolojik alt tiptir (28). Primer müsinöz tümörlerin görülme sıklığı çok yaygın olmasa da iyi huylu kistadenomlar, müsinöz borderline tümörler (atipik proliferatif müsinöz tümörler) ve müsinöz adenokarsinomlar olarak sınıflandırılırlar. Müsinöz adenokarsinomlar da iyi huylu, kötü huylu ve borderline adenokarsinomlar olarak geniş

bir yelpazede morfolojik özellik gösterirler. Hastalar çoğunlukla erken evrede tanı alıp cerrahi müdahale sonrası çok iyi prognoz gösterirler. Tüm müsinöz karsinomlar için de müsinöz borderline tümörler, en yüksek sağkalım oranına sahipken (5 yıl > %95), tekrarlayan veya metastatik müsinöz karsinomların prognozu kötüdür. Yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada vakaların %65'inden fazlasında KRAS aktive edici mutasyon saptanmış, müsinöz karsinomlarda en sık görülen tek moleküler genetik değişiklik olarak gösterilmiştir. P16 tümör baskılayıcı proteinini kodlayan CDKN2A geni ayrıca borderline tümörlerde ve adenokarsinomlarda mutasyona uğramaktadır (29–31).

2.3.6. Berrak Hücreli Karsinom

Berrak hücreli karsinom, etnik popülasyona bağlı olarak değişen insidans oranları ile benzersiz klinik, histopatolojik ve genetik özellikler gösterir. Genellikle Batı ülkelerinde görülme sıklığı az iken Asya'da geniş dağılım gösterir (32). Berrak hücreli karsinom için yapılan çalışma da insidans oranlarının beyazlarda %4,8, siyahlarda %3,1 ve Asyalılarda %11,1 olduğu gösterilmiştir. Dünya genelinde insidansdaki bu farklılıkların nedenleri ise henüz bilinmemektedir (33). Berrak hücreli karsinom; bol miktarda berrak sitoplazma ve hobnail hücreleri içeren glikojen ile dolu hücrelere sahiptir. Tübülökistik, papiler, solid paternler içerebilir. Endometriotik kist içinde siliyer hücrelerden gelişim gösterir. Genellikle erken evre (I)'de tanı konulduğu için prognozu iyidir. Ancak ileri evrede prognoz kötüleşir ve standart kemoterapi tedavisine direnç gelişir (34). Sugiyama ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma da evre III berrak hücreli karsinom tanısı alan hastaların genel sağ kalımlarının evre III seröz adenokarsinomlu hastalardan dikkate değer ölçüde daha kötü olduğu gösterilmiştir (35). Moleküler genetik özellikleri içinde kromatin yeniden biçimlenme SWITCH/Sükroz Nonermentable kompleksinin bir alt birimi olan ARID1A, berrak hücreli karsinomların yaklaşık yarısında mutasyona uğraması ve inaktive etmesi ile dikkat çekmektedir. ARID1A kaybı, PI3K yolunun aktivasyonu ile ilişkili olduğu ve proliferasyonu desteklediği düşünülmektedir. Bir hepatosit transkripsiyon faktörü olan HNF1B ise epigenetik mekanizmalar yoluyla berrak hücreli karsinomlarda aşırı eksprese edilir. HNF1B'nin aşırı ekspresyonu proliferasyonu artırır, hücre göçünü bastırır, aerobik

glikoliz ve glikojen birikimini destekler, böylece berrak hücreli karsinomların büyük ölçüde fenotipleri belirlenir. PIK3CA mutasyonları, MET ve HER2 amplifikasyonları da sıklıkla görülen diğer genetik değişikliklerdir (36,37).

2.4. Over Kanseri Risk Faktörleri

Over kanserinin etiyolojisi hala belirsizliğini korumakta ve güncel araştırma konusu olarak yerini almaktadır. Karın ağrısı, karın şişliği, idrar sıklığı, bağırsak hareketliliği, erken tokluk ya da doyumluk hissi gibi belirgin ve spesifik olmayan belirtiler gösterdiği için hastalara erken tanı koyulabilmesi açısından risk faktörlerini tanımlamak büyük önem taşımaktadır (38). Tablo 2-3'de ifade edilen genetik ve aile öyküsünün dahil olduğu değiştirilmesi mümkün olmayan risk faktörleri ile yaşam şekli, sigara kullanımı gibi değiştirilebilir risk faktörlerinin tanımlanması doğru yönlendirilmiş sağlık hizmetinin alınmasını ve hastalığın erken tanısına olanak sağlamaktadır (39).

Tablo 2-3: Over Kanseri Risk Faktörleri

Değiştirilebilir Faktörler	Değiştirilemeyen Faktörler
Sigara	BRCA1/BRCA2 Mutasyonu
Hormon Replasman Tedavisi	Aile Öyküsü
Beslenme Faktörü	Lynch Sendromu
	Ovulasyon Döngüsü
	Endometriyozis
	İrk

Over kanseri gelişiminde en güçlü risk faktörü, ailede meme ve over kanseri öyküsü olmasıdır. Kalıtsal meme ve over kanseri sendromu olarak bilinen bu genetik bağlantı, tümör baskılayıcı genler olan BRCA1 ve BRCA2'nin mutasyonları ile ilişkilidir. BRCA mutasyonları neredeyse her zaman over tümörlerinin seröz histolojik alt tipinde görülür. Birinci derece akrabalarda tanı konmuş, bir ya da daha fazla meme ve over kanseri öyküleri; yaşam boyunca over kanseri gelişme riskini yaklaşık %40-50

oranında arttırmaktadır (40). Ayrıca ailede erken başlangıçlı kolon ya da endometriyal kanser öyküsü, gastrointestinal ve genitoüriner sistemin çoklu malignite göstermesi ile karakterize Lynch sendromu da over kanseri gelişme riski ile ilişkilidir. DNA onarım genleri olan MSH2, MLH1, PMS1 ve PMS2'de meydana gelen mutasyonlar ile genomik kararsızlık sonucu over kanseri gelişim riski %10 ile %13 oranında artmaktadır (41).

Diğer bir faktör ise yapılan klinik ve epidemiyolojik çalışmalar da gösterildiği gibi yumurtalık epiteli hormonal yanıtta hedef organ olduğu için hormonal denge bozulduğunda kadınlarda jinekolojik kanser gelişme riski artmaktadır. Yüksek düzeyde karşılanmamış östrojene uzun süre maruz kalınması, homeostazinin progesteron hormonu ile dengelenmemesi ile meme, endometriyal ve over kanseri gelişme riski artmaktadır (42). Postmenapoz döneminde özellikle 5 yıldan fazla hormon replasman tedavisi alan kadınların, progesteron ile karşılanmamış östrojen hormonuna maruz kalması nedeni ile over kanseri riski artmıştır (43). Benzer şekilde birden fazla doğum öyküsü olan kadınların hiç doğum yapmamış kadınlara kıyasla over kanseri gelişme riskine karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Bir veya daha fazla çocuk sahibi olan kadınların azalan östrojen seviyeleri ile ilişkili olarak over kanseri riskinde de azalma kaydedilmiştir. Hiç doğum yapmamış kadınlara kıyasla bir, iki, üç kez hamilelik geçirmiş kadınların sırasıyla %28, %43, %54 oranında daha az risk taşıdığı gösterilmiştir (44,45).

Emzirme ve hamilelik döneminde over yüzey epitelinin fizyolojik dinlenmesine olanak sağlayan geçici ovulasyonun durması benzer şekilde over kanserine karşı koruyucu etki göstermektedir. Emzirme süresi ile ilişkili olarak 6 aydan daha az emiren kadınların %21, 6 ay ile 12 ay arasında emziren kadınların %28 ve son olarak 13 aydan daha uzun süre emziren kadınların %33 oranında over kanseri gelişme riskini azaltmaktadır. Hamilelik sırasında yüksek seviyede seyreden progesteron hormonunun, östrojenin kanserojenik etkisini inhibe etmesi, programlanmış hücre ölümünü artırması da ayrıca over kanseri gelişmesine karşı koruyucu etki göstermektedir (46). Hatta yapılan çalışmalarda BRCA mutasyonları ile over kanseri gelişme riskine sahip kadınlarda bile doğurganlık ve çoklu doğumun over kanseri gelişme riskinde önemli ölçüde azalma gösterilmiştir (47).

Overin yüzey epitel hücreleri, over kanseri riskini etkileyen folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH) gibi diğer üreme hormonlarından etkilenmektedir. Ovulasyonun sürekli olması durumunda, over sürekli olarak FSH ve LH'a maruz kalır ve böylece FSH ve LH'ın direk kanserojen etkisi ile ya da dolaylı olarak östrojen konsantrasyonunun artmasını stimüle ederek over kanseri gelişme riskini arttırmaktadır (48). Bu nedenle; hamilelik, emzirme, erken menapoz, çoklu doğum, oral kontraseptif kullanımı gibi ovulasyonun azaldığı durumlar over kanseri riskini azaltırken, kısırlık, düşük doğurganlık, erken menarj ve geç menapoz over kanseri riskinin artışı ile ilişkilidir. Özellikle 10 yıl oral kontraseptif kullanımı hem genel popülasyon da hem de BRCA1 ile BRCA2 mutasyonuna sahip kadınlar da %50 oranında over kanseri gelişme riskini azaltmaktadır (49).

Endometriyozis, uterus boşluğunun dışında yaygın olarak overler, fallop tüpleri ve pelvik peritonda endometriyum benzeri doku, stroma, bez varlığı ile karakterize, kronik, östrojen bağımlı, ilerleme gösteren bir hastalıktır. Premenopoz dönemdeki kadınlar arasında önde gelen ölüm nedenlerinden biri olan endometriyozis ile yapılan kapsamlı çalışmalara rağmen patogenezi ve öncü lezyonu hala tartışma konusudur. Malign transformasyona dönüşme özelliği belirgin olan endometriyozis; kısırlık, geç menapoz gibi artmış risk ve oral kontraseptif kullanımı, tubal ligasyonla azalmış risk faktörleri gibi over kanseri ile çok sayıda benzerliğe sahiptir (50). Yaklaşık 500.000 kadınlarda yapılan meta-analizle endometriyozis, over kanseri riskinde artış ile ilişkilendirilmiş ve vakaların genellikle yavaş büyüyen, daha az invaziv, düşük dereceli tümörler olduğu gösterilmiştir (51). Over kanseri gelişim riskinin kistlerin malign transformasyonu, SWI/SNF ailesinde yer alan ARID1A genindeki mutasyon ve bunun sonucunda BAF250a ekspresyonunun kaybı ile ilişkilendirilmiştir (52). Endometriyozise bağlı over kanserine yol açan iki potansiyel redoks dengesinin bozulması ile ilişkili senaryo önerilmiştir. İlki, endometriyozis de tekrarlayan kanamalar sonucu hemoglobinin, demir ve hem ekstrasellüler ortama salınır. Artan reaktif oksijen ürünleri ile hücre hasarına neden olarak sonuçta DNA hasarına bağlı mutasyonlar gelişir. İkincisi ise tümör ortamını destekleyecek sürekli antioksidan üretimidir. Her iki olasılık da redoks dengesinin bozulması ve PIK3CA, PTEN, ARID1A mutasyonlarının gelişmesi hastalığın malign transformasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Endometriyozis hastalığına sahip kadınların %5-10'ununda over kanseri birlikteliği gösterilmiş olmasının yanında over kanseri riskini 1,2 ile 1,8 kat arttırdığı gösterilmiştir (53). Ancak prognozu nasıl

etkilediği, hangi vakaların daha yüksek risk taşıdığı ve mutlak risk faktörünün hangi oranda olduğu net olmamakla birlikte daha geniş çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Over kanseri gelişme riski genetik mutasyonlar kadar etkilemese de etnik sınıf da risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. Beyaz kadınlarda over kanseri insidansı 100.000’de 12,2 iken İspanyol kadınlarda 100.000’de 10,6 Asya ile Pasifik Adaları bölgesinde 100.000’ de 9,5 siyahi kadınlarda 100.000’de 9,4’ dir. Gözlenen insidans farklılıklarının muhtemel çok faktörlü nedenleri olabileceği düşünülmekle birlikte, siyahi kadınların insidansındaki düşüklük yapılan çalışmalardaki vaka sayısının az olmasıdır (54).

Değiştirilebilir risk faktörlerini oluşturan sigara kullanımı, sadece müsinöz tip over karsinomların gelişme riskini arttırmaktadır. Yapılan çalışmalarda sigara içen vakalarda invaziv müsinöz kanser riski %30-50 oranında artarken, borderline müsinöz tümörlerde %80-130 gibi ciddi risk artışı bulunmuştur. Ancak seröz kanser gelişme riski ile sigara kullanımı arasında bir ilişki bulunmamakla birlikte endometrioid ve berrak hücreli kanserlerin gelişme riski %20 daha az bulunmuştur. Bu çalışma sigara içenlerin endometriyal kanser gelişme riskinin azalması ile tutarlı olup, sigara içenlerin idrar da düşük östradiol düzeyleri ile açıklanmaktadır (55)(56).

Over kanseri gelişim riskini etkileyebilecek diyet faktörleri için birçok çalışma yapılmış olsa da doğrudan herhangi bir risk oluşturacak gıda veya gıda grupları tanımlanamamıştır. Meyve, sebze tüketimi, A, C, E vitaminleri, folat, karotenoidler dahil olmak üzere mikro besin alımı ile over kanseri arasında belirgin bir risk faktörü oluşacak sonuç bulunamamıştır (56). Laktozun; glukoz ve galaktoza hidrolize olması, galaktozun ise oositlere toksik olabileceği şeklinde kurulan hipotez ise yapılan çalışmalarla 10 g laktoz başına %4’lük risk oluşturabileceği gösterilmiş olsa da başka bir kohort çalışmada laktoz alımı ile over kanseri riski arasında bir ilişki bulunamamıştır (57). Düşük enlemde bulunan ülkelerin güneş ışığından D vitaminin alınmasının azalması ile bu ülkelerdeki yüksek over kanseri arasında bir ilişki kurulmuş olsa da yapılan çalışma da herhangi bir risk faktörü bulunamamıştır. Ancak, 25-Hidroksi D vitaminin genetik biyobelirteçlerini kullanarak Mendel rasgele analiz ile 25-Hidroksi D vitamin de 20 nmol / L azalma için ileri evre seröz over kanser de %54 oranında önemli bir risk artışı bulunmuştur (58).

2.5. Over Kanseri Evreleme ve Tanı Yöntemleri

Kanser hastalarına erken tanının konulabilmesi ve uygun tedavinin mümkün olan en kısa sürede planlanması için ilk ve en önemli adım evrelemedir. Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) over kanseri evreleme sistemini ilk kez 1973'te yayınlamış ve en son 2014'de revize etmiştir (59).

Evre I over kanseri çok iyi sağkalım oranına sahip olmasına rağmen hastaların evre III ve IV gibi ileri evrede tanı almasından dolayı çok nadir görülmektedir. Evre I over kanseri için Tablo 2-4'de gösterildiği gibi FIGO evreleme sisteminde yapılan en önemli güncelleme, sistemin artık over tümörlerinin fallop tüpünü ve peritoneal kökenlerini toplu olarak dikkate almasıdır. Ayrıca tümör rüptürünün varlığı, evre IC düşündürmeli ve peritoneal yıkama yapılmalıdır (60).

Tablo 2-4: FIGO Evreleme Sistemi Evre I Over Kanseri

Evre I : Tümör over ya da fallop tüpünde sınırlıdır.

IA : Tümör kapsülü bozulmamış ve tek bir over ya da fallop tüpünde sınırlıdır. Over ve fallop tüp yüzeyinde tümör bulunmazken asit yıkamaların içinde de malign hücre yoktur.

IB : IA' dan farklı tümörün her iki over de ya da fallop tüpünde sınırlı olmasıdır.

IC : Tümör tek over de ya da her iki overde ya da fallop tüpü ile sınırlıyken aşağıdaki özelliklerden herhangi birini taşır

IC1: Operasyon sırasında cerrahi dökülme

IC2 : Over ya da fallop tüp yüzeyindeki tümör kapsülünün yırtılması

IC3 : Asit ve periton yıkamalarında malign hücre bulunması

Evre II tümörler, tüm over karsinomlarının %10'unu oluşturan küçük ve heterojen bir grup olmakla birlikte hala tanımlanmaları zordur ve kötü prognoz özelliği gösterirler. Tablo 2-5'deki over dışına ya da tubal pelvik organlar dışına ekstansiyon ya da metastaz varlığı olabilir ya da yakın organlara sadece ekstansiyon olup metastaz izlenmeyebilir (60,61).

Tablo 2-5: FIGO Evreleme Sistemi Evre II Over Kanseri

Evre II : Over ya da fallop tüpünde sınırlı olan tümöre primer peritoneal tümör ya da pelvik ekstansiyon eşlik eder

IIA : Uterus, fallop tüpleri ya da overlere implantasyon ya da ekstansiyon

IIB : Periton içine diğer pelvik dokulara ekstansiyon

IIC : 1988 evreleme sisteminde yer almasına rağmen 2014’de çıkarıldı.

Over kanseri vakaları, çoğunlukla tanı aldıklarında evre III’de bulunan ileri evre seröz karsinomlar olup bunların %84’ünün evre IIC oluşturur. Bu tümörler karakteristik olarak ince ve kalın bağırsak yüzeyleri, diyafram, karaciğer ve dalağın periton yüzeyleri dahil olmak üzere Tablo 2-6’da gösterildiği gibi hem pelvik hem de karın peritonu içeren yüzeyler boyunca yayılım gösterir. Asit bulgusu vakaların üçte ikisin de görülürken lenf nodu metastazı hastaların çoğunda vardır (62). Lenf nodu metastazı evre I hastaların %9’unda izlenirken evre II, III, IV’de ise sırası ile %36, %55, %88’dir (63).

Tablo 2-6: FIGO Evreleme Sistemi Evre III Over Kanseri

Evre III : Tümör over ve fallop tüplerinin dışında peritona, retroperitoneal lenf düğümlerine metastaz yapmıştır.

IIIA : Retroperitoneal lenf nodlarına metastaz olsun veya olmasın pelvisin ötesinde mikroskopik periton tutulumu izlenir.

IIIB: Retroperitoneal lenf nodlarına metastaz olsun veya olmasın, en büyük boyutta 2 cm'ye kadar pelvisin ötesinde makroskopik periton metastazı izlenir.

IIC : Retroperitoneal lenf düğümlerine metastaz olsun veya olmasın en büyük boyutta 2 cm’ den büyük pelvisin ötesinde makroskopik periton metastazı

Evre IV over kanseri, Tablo 2-7’de yer aldığı gibi uzak metastaz olarak tanımlanır. Hastaların %12 ila %21’ine parankimal karaciğer ya da dalak metastazı ya da ekstra abdominal metastaz ile tanı konur. Tümörün omentumdan dalak ya da karaciğere ekstansiyon göstermesi olan evre IIIC ile izole parankimal metastaz varlığı olan evre IVB birbirinden ayrılması önemlidir (64).

Tablo 2-7: FIGO Evreleme Sistemi Evre IV Over Kanseri

Evre IV : Peritoneal metastazın dışında uzak metastazın varlığı

IVA : Pozitif sitoloji ile plevral efüzyon

IVB : Parankimal metastaz dahil karaciğer, dalak veya ekstra abdominal organlara uzak metastaz

2.5.1. Tanı da Görüntüleme Yöntemlerinin Rolü

Ultrason, over ve overe komşu organlarda görülen kitlelerin ilk değerlendirilmesinde ve yüksek riskli hastaların taramasında kullanılan önemli bir yöntemdir. Morfolojik özellikler kullanılarak iyi huylu ve kötü huylu lezyonlar ayırt edilebilir (65). Endovajinal ultrason %100 duyarlılık, %83 özgüllük ile morfolojik skrolama yaparak lezyonların ayıricılığını sağlar (66). Malignite riskinin nicel değerlendirilmesinin yapılabilmesi için; ultrason muayenesi, menapoz durumu ve serum kanser antijeni (CA-125)’nin sonuçlarını içeren malignite indeksinden (RMI) yararlanılır. RMI için ultrason da izlenen multioküler kist, metastaz, asit varlığı, bilateral over lezyonlarının varlığı, solid yapı özelliklerinden herhangi birinin olması 1 puan, hiçbir özelliğin görülmemesi 0 puan, 2 veya daha çok özelliğin varlığı 3 puan olarak belirlenir. Menapoz durumu için eğer kadın hasta premenapozal dönemde ise 1 puan, postmenapoz döneminde ise 3 puan olarak değerlendirilir. Ultrason puanı, menapozal puan ve son olarak hasta serum CA-125 değeri çarpılarak RMI skoru hesaplanır. RMI skorunun 200’den yüksek olması malignite için belirgin; ultrason da malignite özellikleri olmayan hastaların, menapozal durumları ile serum CA-125 değerine bakılmaksızın RMI skoru 0 olarak değerlendirilir. RMI skor yönteminde üç boyutlu ultrason eklendiğinde ise özgüllüğü %99 oranına ulaşmaktadır. Ancak peritona

metastaz varlığında diğer tanı yöntemlerine kıyasla duyarlılık %69'a kadar düşmektedir. Ayrıca ultrason paternlerinin operatöre bağlı olması ve bulguları gizleyen bağırsak gazı gibi sınırlayıcı özellikleri vardır (67,68).

Bilgisayarlı tomografi (BT), tekrarlayan over karsinomlarının tanısında ve tümörün tedaviye yanıtını izlemek için sıklıkla kullanıldığı gibi over kanseri evrelemesinde de kullanılır. Ayrıca BT, peritona metastaz yapan 1 cm den büyük tümör implantlarını %83-93 oranında duyarlılık ile tespit edebilirken, 1 cm den küçük implantları saptamada duyarlılık %25-50 oranına düşer. Özellikle over kanseri olan kadınlarda sıklıkla karşılaşılan yüksek miktarda asit varlığında bile kullanımı yararlıdır (69). Ek olarak ileri evrede over kanseri hastalarının primer sitoredüktif cerrahisinden yararlanıp yararlanamayacağını belirleyerek gereksiz ameliyat geçirecek hasta sayısı minimize edilmesine olanak sağlar (70).

Manyetik rezonans görüntüleme (MRG), yağ ve kan ürünleri içeren lezyonları kolayca ayırt edebilmesinin yanında BT ve ultrasonda görülen belirsiz lezyonların da tanımlanmasını sağlar (70). İyi huylu ve kötü huylu lezyonları %83-91 doğruluk oranıyla ayırt edebilirken aynı zaman da konvansiyonel ve sarmal BT gibi evrelemede de kullanılabilir. Nitelikli yumuşak doku kontrast çözünürlüğü nedeni ile pelvik organların overe yaptığı invazyonun tanımlanmasına olanak sağlar. MRG, tümörün cerrahi olarak çıkarılabilirliğini tahmin edebilmek için %95 duyarlılık, %70 özgünlük ve %88 doğruluk oranına sahipken bu oranlar BT için sırası ile; %55, %86 ve %63'dür. Ancak tekrar eden over tümörlerinin tanımlanmasında BT ile MRG arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (71).

Pozitron emisyon tomografisi (PET)/BT, over kitlelerini tanımlamak için sınırlı özelliklere sahiptir ayrıca corpus luteum kistleri ya da gastrointestinal aktivite gibi inflamasyon süreçlerinde yanlış pozitif bulgular görülebilir. Bu sebeple over tümörlerinin tanısındaki kısıtlamaların yanında radyasyon tedavisinin planlanması, bölgeye özgü tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (60).

2.6. Over Kanseri Tedavisi

Over kanseri tedavisine yaklaşım, öncelikle hastalığın tanısı alınmadan veya ileri evre tanısı konulmadan hastalığın önlenabilir seçeneklerini içerir. Tanımlanan risk faktörleri ile ilişkili olarak hastalık önlenemez ise daha sonraki aşama tanı konmuş hastaların tedavi seçeneklerini içermektedir. Over kanseri risk faktörleri 2.4 bölümünde

de bahsedildiği gibi ovulasyonun azaldığı durumlar da over kanseri gelişim riski önemli ölçüde azalmaktadır. Dolayısıyla hastalık tanısı almadan çoklu gebelik, emzirme, oral kontraseptif kullanımı, histeroktomi ameliyatı, fallop tüplerin ya da overlerin cerrahi olarak çıkarılması gibi bir çok şekilde over kanseri gelişimi engellenebilmektedir. Ayrıca BRCA somatik mutasyon taşıyıcısı olan kadınlarda profilaktik bilateral salpingo-ooferektomi ameliyatı over kanseri gelişim riskini %80'nin üzerinde bir oranla azaltmaktadır. Diğer bir önleyici tedavi seçeneği olan inflamatuvar yanıtla ilişkilendirilen karsinogenezin, anti inflamatuvar ilaçlarla koruyucu etkisi görüşü kısıtlı çalışmalara sahiptir. Bazı çalışmalar günlük düşük doz aspirin kullanımının hiç kullanmayan hastalara göre over kanseri riskinin azalttığını göstermiş olsa da bazı çalışmalarda over kanseri gelişim riski ile aspirin kullanımı arasında bir ilişki bulunamamıştır (15).

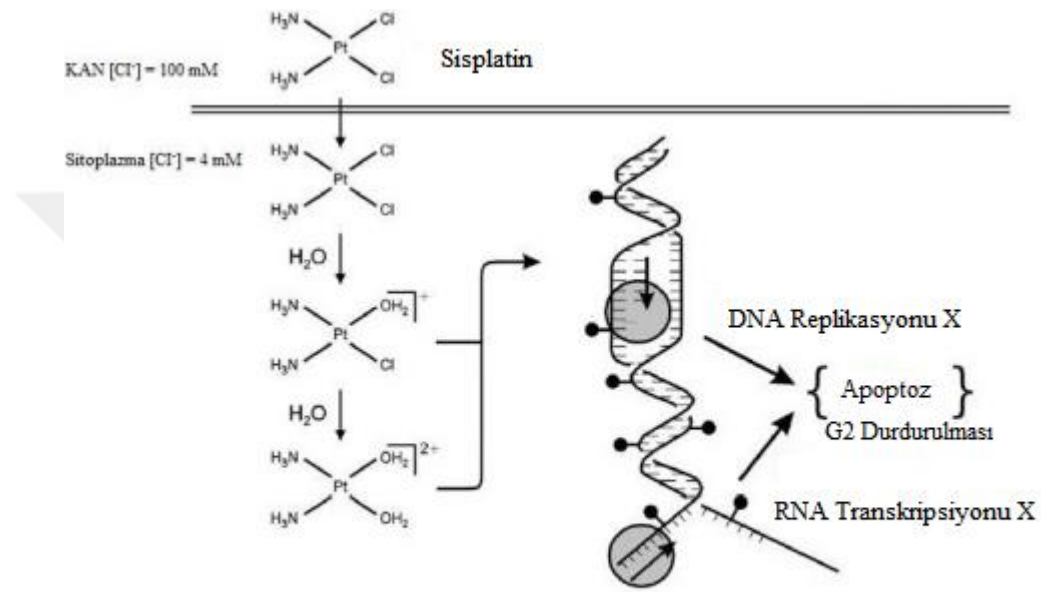
Önleyici tedavi seçeneklerinin dışında over kanseri tanısı almış hastalar için ise kemoterapi ve cerrahi tedavisinin bir çok kombinasyonu mevcuttur. İleri evre over kanseri tanısı alan hastaların tümör nodüllerinin çap veya kalınlığının 1 cm'den az olması durumunda ideal tedavi, tümör hacminin küçültülmesi olan debulking cerrahisidir. Ancak tümör boyutu büyük olan ya da rezidüel tümörlerin cerrahisinin, tedavinin etkinliğine olumsuz etkileri olduğu gösterilmiştir. Tümör mikro çevresine perfüzyonu engelleyerek doku hasarı oluşmasına dolayısıyla hücre hasar olasılığının artmasına ayrıca çoklu ilaç direncine sahip klonların büyümesine imkan tanımaktadır. Dolayısıyla debulking cerrahisinin fayda sağlayıp sağlayamayacağını belirlemek için daha az invaziv, yaşam kalitesinin iyileşmesi ile ilişkili laparoskopik ameliyatlara uygulanması uygun olabilir. Her debulking cerrahi sonrası üç adjuvan tedavi döngüsü dahil olmak üzere en az altı ay tedavinin devam etmesi önerilmektedir (72). Over kanseri tedavisinde cerrahi müdahale ile beraberliğinde ya da cerrahi sonrası tedavi seçenekleri içinde taksanlar, alkileyici ajanlar ile kombinasyon halinde sisplatin gibi platin bazlı bileşikler kemoterapinin önemli basamağıdır. Platin kemoterapisi, ilk olarak 1965 yılında sisplatinin (Cis-Diamindikloroplatinyum (II)) Escherichia Coli hücre bölünmesini tesadüfen engellemesinin görülmesiyle keşfedilmiştir. 1970 yılında sisplatinin kanser hücrelerinin bölünmesi üzerine etkisi hayvan çalışmalarında da doğrulanmış, ardından hızlıca klinik denemeler yapılmış ve testis, mesane, over kanserinin tedavisinde kullanılmak üzere Federal İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır. 30 yılı aşkın süredir klinik pratikte kullanılmakta olan sisplatin monoterapide bazı solid tümörleri ve %90'nın üzerinde iyileşme oranı ile testis

kanserinde kullanılmaktadır (73). İleri evre over kanserinde ise direnç gelişim mekanizmaları nedeni ile nadiren kullanılmış olup bazen yaşlı hastaların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu yüzden ileri evre over kanserinin tedavisinde olduğu gibi sisplatin yaygın olarak mitotik iğ düzeneğini bloke eden ve hücre bölünmesini durduran bir tübülün hedefi olan karboplatin ve paklitaksel kombinasyonu ile tedavi edilir. Sisplatin ayrıca dudak, ağız, dil, burun, boğaz, ses telleri, yemek borusu ve soluk borusunun bir kısmını içeren baş ve boyun kanserinin birincil basamak kemo-radyasyon tedavisinde kullanılır. Radyasyon Tedavisi Onkoloji Grubu (RTOG) programı tarafından en uygun tedavi rejimi; sisplatin ile geleneksel radyoterapinin bütünleşik olarak sırasıyla 1., 22. ve 43. günlerde 100 mg/m² olarak uygulanması önerilmektedir. Ek olarak dosetaksel ve flurourasil ilaçları ile kombinasyon halinde ilerlemiş baş ve boyun kanseri tedavisinde kullanılabilir. Kansere bağlı ölümlerin en sık nedeni olan akciğer kanserinin ve özellikle ileri evre III ve IV küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin tedavisinde kullanılan en popüler neoplastik ilaç olan sisplatin ayrıca sarkomların, prostat kanserinin, lenfomanın tedavisinde de kullanılmaktadır (74). Ancak uzun süreli sisplatine maruziyet sonrası nefrotoksisite, ototoksisite, gastrointestinal toksisite, nörotoksisite, hipomagnezemi, hipokalsemi ve kemik iliğinin baskılanması gibi yan etkiler ortaya çıkmakta ve tedavinin kısıtlanmasındaki en önemli faktör olan ilaç dirençliliği ortaya çıkmaktadır. Özellikle, ileri evre over kanseri hastaları sisplatin tedavisinin başlangıcında tedaviye duyarlılık gösterse de hastaların % 60'ından fazlası kemoterapi sonrası tekrarlayan over kanseri teşhisi almakta ve ilaca dirençli tümör hücrelerinin ortaya çıkması nedeni ile başarılı bir tedavi olanağı ortadan kalkmaktadır. Böylece ilaç direnci, over kanserinin tedavisinde önemli bir zorluk olmaya devam etmektedir (72,75).

2.6.1. Sisplatin ve Direnç Mekanizmaları

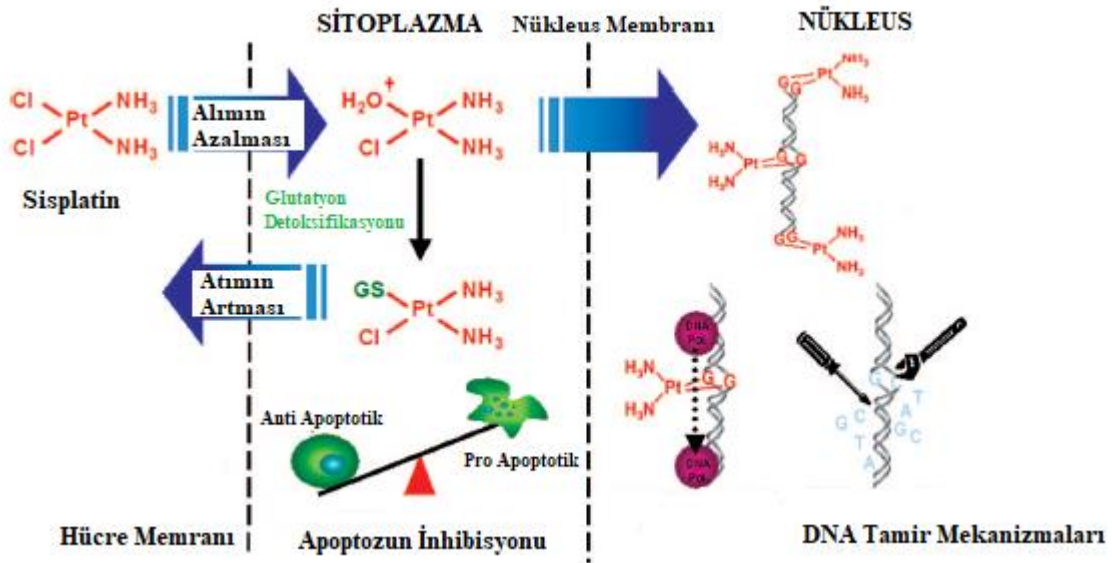
Sisplatin, hücre içi etki mekanizmasını hücre içi ile hücre dışı arasındaki klor konsantrasyonunun farklı olması sonucu göstermektedir. Damar içine uygulanan sisplatin yapısında bulunan klor iyonları ile kanda yaklaşık 100 mM konsantrasyon da bulunan klor iyonları ile birlikte dolaşırken hücre içine girdiğinde hücre içi klor konsantrasyonu yaklaşık 4 mM'a düşmektedir. Dolayısıyla sisplatin hücre içinde klor iyonlarını kaybederek su ile etkileşime geçmekte ve aqua formun da pozitif yüklü hal almaktadır. Şekil 2-2'de gösterildiği gibi hücre içinde pozitif yüklü sisplatin nükleofilik

moleküller olan DNA, RNA ve proteinler ile nükleofilik ataklar gerçekleştirir. Diğer platinleştirici ajanlar gibi sisplatin de daha çok DNA'yı sitotoksik hedef olarak kullanıp DNA'ya bağlanırken guanozin ve adenozin imidazol halkalarının N7 atomlarını tercih eder. DNA'nın çapraz iki zincirinin arasına ya da tek bir zincir arasında girerek DNA replikasyonunu, RNA transkripsiyonunu engeller, hücre döngüsünü G2 fazında durdurur ve programlanmış hücre ölümüne neden olarak etki gösterir (76).



Şekil 2-2: Sisplatinin Etki Mekanizması (76)

Ancak over kanseri hastaları başlangıçta %70 oranla sisplatine yanıt vermiş olsa da şekil 2-3'de gösterildiği gibi hücre içine ilaç alımının azalması, hücre dışına ilaç verilmesinin artması, glutatyon metabolizması, ilaç detoksifikasyonu, programlanmış hücre ölümünün inhibisyonu, DNA yanlış eşleşme tamir mekanizmaları, bakır taşıma sistemin de meydana gelen değişiklikler ile sisplatin direnci ortaya çıkmaktadır. Tek bir direnç mekanizması görülebileceği gibi birden fazla direnç mekanizması ile birlikte de görülebilmektedir (77).



Şekil 2-3: Over Kanserde Sisplatin Direnç Mekanizmaları (77)

2.7. Over Kanseri ve Direnç Mekanizmaları Arasındaki İlişki

Sisplatine dirençli hücrelerde görülen azalmış sisplatin birikiminden sorumlu mekanizma hücre içine ilaç girişinin azalması, hücre dışına ilaç çıkışının artması ya da her ikisinin birlikteliği olabilmektedir. Pasif difüzyon ya da kolaylaştırılmış taşıma ile hücre içine giriş yapan sisplatinin taşınması, bakır taşıyıcı-1 (CTR1) tarafından düzenlenir. Maya CTR1 geninde gerçekleşen bir delesyonun over kanseri hücre hatlarında sisplatin direnci gerçekleşmesi ve hücre içinde biriken sisplatinin azalması ile sonuçlanmıştır. Bakır taşınımından sorumlu ATP7A'nın over kanserinde aşırı eksprese olduğu, sisplatinin nükleer DNA ile etkileşimini engelleyerek direnç gelişimini indüklediği gösterilmiştir. Sisplatinin sitotoksitesi temelde DNA üzerine eklenti oluşturarak, DNA hasarı oluşturmaya dayandığı için hasar sonrası hücrede DNA tamir mekanizmaları denge oluşturmak adına devreye girer. DNA yapısına verilen hasarın türüne bağlı olarak farklı DNA tamir mekanizmaları, oluşan lezyonları onarmakta ya da DNA üzerindeki eklentileri uzaklaştırmaktadır. DNA hasarının onarılmasındaki ana mekanizma nükleotid eksizyon onarım (NER) sistemidir. NER yolağı ağırlıklı olarak hücresel DNA'daki sisplatin-DNA bağlantılarının onarımından sorumlu olup bu yolaktaki bir çok protein de bu amaçla görev yapmaktadır. Bu proteinlerden biri olan eksizyon tamiri çapraz tamamlama grubu 1 (ERCC1)'in yüksek mRNA ekspresyonunun, sisplatin kaynaklı DNA hasarını tamir etme kapasitesinin artmasıyla ilişkili olduğu, böylece ilaca direnç kazandırdığı birçok over kanseri hücre hattında gösterilmiştir. Ayrıca, hem hücre hatlarında hem de farelerde ERCC1 antisens

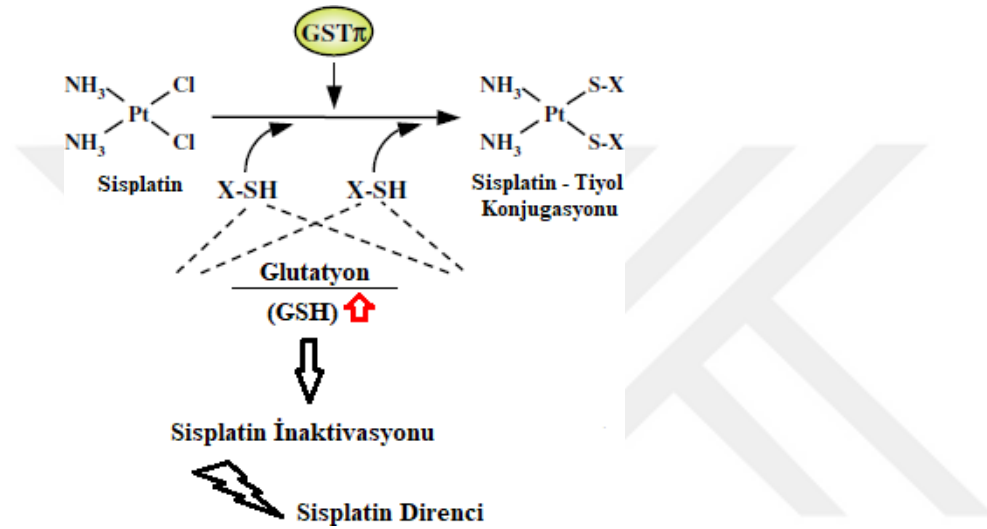
vektörleri kullanan transfeksiyon deneylerinin sonucunda platin ajanlarına karşı duyarlılığın artmış olduğu gösterilmiştir (78,79). Diğer bir DNA onarım mekanizması olan DNA yanlış eşleşme tamir mekanizmasında (MMR) gerçekleşen sapma, platinyum bazlı ilaçlarda direnç gelişimine neden olabilmektedir. Souliotis ve arkadaşları tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışmada DNA yanlış eşleşme onarım mekanizmasında yer alan hMLH1 promotor geninin hipermetilasyonu, sisplatinin apoptozu indüklemesini engelleyerek, direnç gelişmesine neden olmaktadır. Yapılan çalışmada sisplatine duyarlı over kanseri ile dirençli over kanseri hücre hatları incelenmiş, duyarlı over kanseri hücre hattında çok daha yüksek seviyede intrinsik DNA hasarı bulunmuştur (79,80). Over kanseri direnç mekanizmaları içerisinde 25'den fazla onkogenin; büyüme faktörü reseptörlerinin, sinyal moleküllerinin, transkripsiyon faktörlerinin, hücre döngüsü düzenleyicileri, apoptoz düzenleyicilerinin ekspresyonunu etkileyerek direnç gelişimine katkı sağladıkları gösterilmiştir. Yapılan biyoinformatik çalışmalar ile hücre döngüsünde önemli bir onkogen olan NEK2'nin over kanserinde ilaç direnci gelişmesine hücre döngüsü ve mikrotübüller aracılığı ile neden olabileceği bildirilmiştir (81).

Over kanseri direnç mekanizmaları içerisinde yer alan redoks sistemlerinde glutatyon (GSH), indirgeyici bir ajan ve bir antioksidan molekül olmasının yanında hücre farklılaşması, proliferasyon ve apoptoz gibi hücresel süreçlerde de çok önemli rol oynamaktadır. GSH'ın, ilaç alımının azaltılması ve hücre içi ilaç detoksifikasyonu ile inaktivasyonunun artması, artan DNA onarımı ve apoptoz ilacın neden olduğu oksidatif stresin inhibisyonu gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla hem sisplatin hem de karboplatine karşı dirence aracılık ettiği bilinmektedir. Spesifik olarak over kanserinde, yüksek GSH seviyeleri veya Glutatyon S-Transferaz P1 (GSTP-1) aktivitesini sisplatin veya karboplatin direnci ile ilişkilendirilmiştir (82). Sawers ve arkadaşları A2780 over kanseri hücrelerinde GSTP-1'in stabil silinmesinin hem sisplatin hem de karboplatine duyarlılığı önemli ölçüde ve seçici olarak arttırdığını göstermiştir (83). Ayrıca; Chen ve arkadaşları miR-133b'nin aşırı ekspresyonunun, glutatyon ve çoklu ilaç direnç protein 1 (MDR1) ekspresyonunu azaltarak hem sisplatin hem de paklitaksel karşı over kanseri hücresi duyarlılığını arttırdığını göstermiştir (84).

2.8. GSTP-1 ve miRNA-133b

Glutatyon S-Transferaz (GST) enzim ailesi glutatyonlu antikanser ilaçlar da dahil olmak üzere ksenobiyotiklerin konjugasyonunu katalizleyen faz II detoksifikasyon enzim ailesidir. GST enzimleri primer yapılarına, substrat spesifitelerine, kimyasal afinitelerine ve kinetik davranışlarına göre alfa (α), mü (μ), pi (π), sigma (σ), teta (θ), kappa (κ), zeta (δ) ve omega (ω) olarak gruplandırılır ve bu zengin alt sınıflara göre de birçok elektrofilik ve hidrofobik bileşiğin daha kolay atılabilen, daha az toksik metabolitlerin dönüşümünü katalizlerler. GST enzim ailesi sınıfına ait olan GSTP-1’de birçok toksik bileşiğin antioksidan üçlü peptit olan GSH ile konjuge ederek eliminasyonunu kolaylaştıran polimorfik faz II enzimidir (85). Hücre sitozolünde bulunan bu enzim ailesi tiyol grupları içermekte ve hücre içine girerek klor iyonlarını kaybeden sisplatin için nükleofilik hedef haline gelmektedirler. Kronik olarak sisplatine maruz kalan over kanser hücrelerinde tiyol grupları içeren GSH konsantrasyonlarının artması, hedef DNA ile etkileşim içinde olması gereken sisplatinin antitümör aktivitesinin düşmesine neden olmaktadır. GST’nin ilaç direnci üzerindeki rolünü iki şekilde açıklamak mümkündür; I: Enzimin ve ilaç direnç proteinlerinin ekspresyonlarındaki artış, tümör hücresine antikanser ajanın girmesiyle birlikte hücre içinde GST enziminin ifadesinde ve GSH düzeyinde artış olmaktadır (86). Anastasia ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptıkları bir çalışmada, ilaç dirençli tümörlerde aşırı ekspresyon gösteren antiapoptotik protein olan GSTP-1’in sisplatin bağlayan protein olarak rolü araştırıldığında, sisplatinin GSTP1-1’in glutatyon transferaz aktivitesi için bir substrat olmadığını, bunun yerine GSTP1-1 GSH konjugasyon aktivitesi elde ederken protein alt birimlerin çapraz bağlanması ile sonuçlanan iki çözücü tarafından erişilebilen sisteinlerin yardımı ile sisplatini etkisizleştirdiği ve ayırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, GSTP1-1’in c-Jun N-terminal kinaz’a (JNK) bağlanarak downstream apoptoz sinyali için gerekli olan JNK fosforilasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir (87). GST’ler elektrofilik substratlar üzerine GSH’nin nükleofilik atağını katalizleyerek, GSH’nin SH grubu ile ilgili bileşiklerin elektrofilik bölgelerini nötralize ederek bunların hücresel makromoleküller üzerine olan reaktifliklerini azaltmaktadırlar. Sitoplazmada hidrolize edilerek 2 su molekülü kazanan sisplatin, sülfür (tiyol) içeren GSH ile reaksiyona girebilecektir. Hücre içinde antioksidan olarak görev yapan GSH, sitoplazma ve nükleusta sisplatin ile bağlanarak GSH-sisplatin kompleksleri oluşturur. Böylece tekli-adductların çapraz bağlar oluşturması engellenir ve sitotoksik etkiler azaltılmış olur.

GSH-X pompası GSH-sisplatin komplekslerini ATP bağımlı mekanizma ile hücre dışına taşır ve enzimin ilaç direncindeki rolü açıklanmış olur. II: Enzimin sinyal iletimindeki rolünde ise GSH metabolizması serbest oksijen seviyeleri ile ilişkilidir. Nrf2 olarak adlandırılan eritroid kaynaklı nükleer faktör 2, antioksidan metabolizmasında bir transkripsiyon faktörüdür. GST'ler Nrf2 aktivasyonu ile üretilir ve bu yolağın ekspresyonundaki değişiklikler sisplatin direnci ile ilişkili olabilmektedir (88).



Şekil 2-4: Sisplatin İnaktivasyonu (88)

Sisplatinin antitümör aktivitesinin düşmesi ve ilaca dirençli klonların varlığı nedeni ile çoğu over kanseri hastası tekrar eden tümörler ile hastalığa yenik düşmektedir. Ayrıca başlangıçta tedaviye yanıt veren hastaların zamanla bir ya da birden fazla gelişen direnç mekanizmaları nedeni ile uzun dönemde tedaviden yanıt alınamamakta ve 5 yıllık yaşam ömrü hala daha %50'nin altında kalmaktadır. Dolayısıyla hastalar alternatif tedaviye yönelmekte ve kemoterapinin yan etkilerinden uzaklaşabilecek tedavi seçenekleri aramaktadır (89).

MikroRNA'lar (miRNA'lar), protein kodlama kapasitesi olmayan kısa (~ 19-24 nt) RNA molekülleri olup post translasyonel regülasyonda önemli rol oynamaktadır. Bu protein kodlamayan RNA molekülleri kendi nükleotid dizilerinin 5' ile tamamlayıcısı olan hedef mRNA'ların 3' çevrilmemiş bölgesi (3'UTR) arasına bağlanıp translasyonel baskılama veya mRNA yıkımı ile transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunun düzenlenmesini gerçekleştirirler. Ancak her zaman inhibe edici veya gen regülasyonunun baskılanması ile ilişkili olmadıkları da bilinmelidir. Nadir durumlarda, hücre döngüsüne ve

kofaktörlere bağılı olarak miRNA, mRNA çevirisini aktive edebilir, böylece protein seviyesini düzenleyebilir (90) İlk miRNA molekülü, 1993 yılında Lee ve arkadaşları tarafından tanımlanmış ve bugüne kadar yaklaşık 2600 insan miRNA'sı keşfedilmiştir. MiRNA'ların gen translasyonu üzerinde büyük etkileri olduğu ve tüm insan gen çevirisinin %50'den fazlası miRNA tarafından düzenlendiği gösterilmiştir. Her miRNA, çok sayıda hedef geni düzenleyebilir ya da tam tersi, aynı hedef gen, karmaşık bir ağ oluşturarak çeşitli miRNA türleri tarafından düzenlenebilir. Böylece miRNA'lar hücre farklılaşması, proliferasyon, stres tepkisi, metabolizma, hücre döngüsü, apoptoz ve anjiyogenez dahil bir çok döngüde yer alıp, kanser dahil çok çeşitli insan hastalıklarında rol oynayabilir (91). İlk kez 2002 yılında Croce ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kanser ile miRNA'nın ilişkisi gösterilmiştir. Yapılan çalışma ile kronik lenfositik lösemide sıklıkla silinen bir bölge olan 13q14.3'de Leu2 geninin ekson 2 ve ekson 5 arasında miR-15a ile miR16'nın disregülasyonu belirlenmiş olup bu iki mikroRNA'nın bir tümör baskılayıcı aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (92). Yapılan bu ilk çalışmadan sonra normal dokuya kıyasla kanserli dokuda ekspresyonu bastırılan ya da tam tersi kanserli dokuda aşırı eksprese olan bir çok miRNA keşfedilmiş ve 2004 yılında Calin ve arkadaşları genomik bölgelerdeki miRNA'ların yarısının kanserde sıklıkla değiştiğini gösteren miRNA haritasını yayınlamışlardır (93). MiRNA'ların sadece ekspresyonlarındaki değişiklikler kansere yol açmadığı gibi biyosentezinde rol oynayan Drosha ve Dicer enzimlerinin ekspresyonlarındaki ya da fonksiyonlarındaki değişikliklerde kansere neden olan başka bir mekanizmadır. Örneğin over kanseri hastalarının % 39'unda Drosha ve Dicer ekspresyonlarında azalma bulunmuştur (94). Ayrıca miRNA'ların, epigenetik kontrolden sorumlu enzimlerin ekspresyonunu değiştirerek hücrel metilasyon durumunun kontrolünde de rol alabilecekleri birkaç yıl önce akciğer kanserinde ex-novo DNA metiltransferazlar DNMT3a ve DNMT3B ekspresyon kontrolünden miR-29 ailesinin sorumlu olduğunun gösterilmesi ile tanımlanmış oldu (95). MiRNA'nın transkripsiyon düzenlenmesi ile olan ilişkisini açıklamak için en sık genetik mutasyona neden olan tümör baskılayıcı gen p53 ile miR-34 ilişkisi örnek verilebilir. P53, miR-34 ailesinin transkripsiyonunu uyararak apoptoz ve yaşlanmayı indükler ayrıca over kanseri hastalarının yüksek çoğunluğunda p53, miR-34 ailesinin aşağı regülasyonunu indüklemektedir (96).

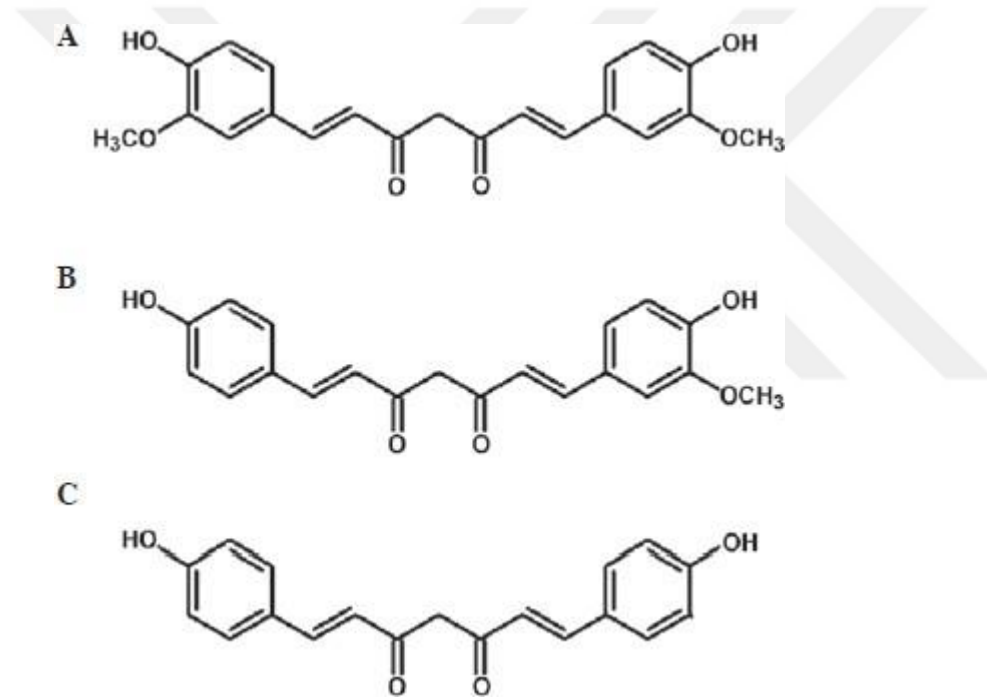
Gen ekspresyonunun düzenlenmesi, hücre döngüsünün ilerlemesi gibi çok önemli hücre fonksiyonları açıklanmış olan miRNA'lar ayrıca kanser tedavilerinin en önemli kısıtlaması olan ilaç dirençliliğinde de dokuya özgü olarak farklı fonksiyonları bildirilmiştir. Over kanserinde ilaç duyarlılığı ile dolaylı olarak ilişkilendirilen miR-27a'nın lösemi de ilaç dirençliliğinde doğrudan rol oynaması gibi miRNA'lar tek bir fonksiyonel rol ile açıklanamamaktadır. Ayrıca küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde olduğu gibi ilaç dirençliliğinde ilacın hedefi olan molekülün ekspresyonunu da etkileyebilir. Anjiyogenez inhibitörü bevacizumab'ın hedefi olan vasküler endotelial büyüme faktörü A, miR-126 tarafından doğrudan hedeflenerek bevacizumaba dirençli hücrelerde miR-126 restorasyonu, ilaç duyarlılığını geri kazandırır. Dolayısıyla miRNA'lar ilaç dirençliliğinde yer alan proteinleri hedefleyerek ya da ilacın hedeflediği molekülleri modüle ederek dokuya spesifik ilaç dirençliliğini arttırabileceği gibi ilaç duyarlılığına da etki edebilir (97).

Son yıllarda yapılan bir kaç çalışma, miRNA'nın redoks sistemler üzerinde de düzenleyici rolü olabileceğini göstermiş ancak ilaç dirençliliği ile ilişkisinin tam olarak anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmuştur. Bu anlamda miR-133b detoksifikasyon enzimi olan GSTP-1 ile ilişkilendirilerek sisplatin direncinde rolü olduğu düşünülmüştür. Chen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada sisplatine dirençli akciğer hücrelerinde miR-133b ve sisplatinin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Dirençli hücre hattında sisplatinin up-regüle olduğu gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada miR-133b'nin apoptozu teşvik ederek sisplatine dirençli insan akciğer hücre hattı; NSCLC hücrelerinin sisplatin kemosenitivitesini arttırdığı gösterilmiştir (98).

2.9. Over Kanseri ve Kemoterapötik İlaç Dirençliliğinde Doğal Ürünlerin Önemi

Son yıllarda sarımsak, zencefil, soya, zerdeçal, soğan, domates, turpgiller, biberler ve yeşil çay gibi doğal diyet bileşenlerine ait etken maddelerin kemopreventif özellikleri keşfedilmiş ve yeni tedavi stratejisi olarak terapötik potansiyelleri araştırılmaya başlanmıştır. Doğal kaynaklardan elde edildikleri için farmakolojik olarak güvenli olan etken maddelerden genistein, resveratrol, likopen, kapsaisin, kurkumin, 6-gingerol, ellagic asit, ürsolik asit, krisin, silymarin, anetol ve katekinler klinik yanıtı arttırmak aynı zamanda kemoterapötiklerin toksisitesini ortadan kaldırmak ya da en azından minimuma indirmek amacıyla klinik çalışmalarda kullanılmaktadır (99).

Bu doğrultuda, tedavi stratejisi için doğal bileşiklerden kurkumin ve analoglarının antikanserojenik ve kemopreventif özellikleri son dönemde ilgi çekici çalışma konuları arasında yer almaktadır. Özellikle son yıllarda çeşitli özellikleri nedeni ile en çok incelenen doğal türevli terapötik ürünler arasında yer alan kurkumin [1,7-Bis (4-hidroksi-3-metoksifenil) -1,6-heptadien 3,5 dion], zencefil ailesine (Zingiberaceae) ait çok yıllık otsu bir bitki olan kurkuma longa'nın birincil biyolojik aktif kurkuminoididir. Genellikle zerdeçal olarak bilinen kurkuma longa, Güney Asya, Hindistan ve Endonezya'ya özgü olmakla birlikte ağırlıklı olarak Güney Hindistan'da yetiştirilmektedir (100). Kurkuma longa'dan elde edilen diğer iki kurkuminoid ise Şekil 2-5'de gösterilen demetoksikurkumin (DMC) ve bisdemetoksikurkumin (BDMC)'dir.



Şekil 2-5: Kurkuma Longa Bitkisinin Etken Maddeleri. A: Kurkumin, B: Demetoksikurkumin, C: Bisdemetoksikurkumin

Kurkuma longa ayrıca bir takım uçucu yağlar (örn. zingiberon, atlanton ve tumerone), şekerler, reçineler ve proteinler içerse de sadece %3-5 oranında kurkuminoidleri içermekte bunun dışında anti-enflamatuar ve anti-proliferatif aktiviteye sahip bilinen hiçbir ajan içermemektedir. Kurkuminoidler, iki alfa ve beta doymamış karbonil grubu yoluyla bağlanan iki metoksillenmiş fenolden oluşmakta ve terpen türevleri bakımından zengin olup ağırlıklı olarak monosiklik seskiterpenler, turmeron ve zingibren gibi oksijenli türevler içerirler (101).

2.10. Kurkumin ve Analoglarının Antikarsinojenik ve Kemoterapötik Özellikleri

Kurkumin, transkripsiyon faktörleri, enzimler, hücre döngüsü proteinleri, reseptörler, hücre yüzeyi adezyon molekülleri, nörotransmitterler gibi çeşitli moleküler hedefleri kullanarak metabolik sendrom, deri hastalıkları, kanser, bağırsak iltihabı, depresyon, artrit, yağlı karaciğer hastalığı ve nörodejeneratif hastalıklara karşı antioksidan, anti-enflamatuvar, antiapoptotik özellik göstermektedir (102). Çok geniş yelpazede moleküler hedefleri kullandığı için özellikle kanser çalışmalarında ilgi çekici bir konu haline gelen kurkumin, kanserin gelişimi ve ilerlemesinde anahtar rol oynayan NF-KB ve STAT3 sinyal yollarını inhibe eder. Eprin Tip-B Reseptör 2 öncüsü, HDAC4, kalmodulin ve ADEM10 dahil olmak üzere yüksek oranda ifade edilen bir transkripsiyon faktörü Sp-1'i inhibe ederek metastazın önlenmesine aracılık etmektedir. Ayrıca birkaç hücre dışı matris bileşeninin ekspresyonunu arttırarak ve fokal yapışma kinaz (FAK) ve CD24 ekspresyonunun fosforilasyonunu inhibe ederek de kanser oluşumunu, göçünü ve istilasını önleyerek antikanser özelliği göstermektedir (103). Her ne kadar zerdeçaldan izole edilen kurkuminoidlerin %77'ini kurkumin oluştursa da %17 demetoksikurkumin (DMC) ve %3 bisdemetoksikurkumin (BDMC) doğal analoglar olarak yerini almaktadırlar (104). Kurkumin ile benzer kimyasal yapı gösteren DMC'nin son yıllarda önemli terapötik özellikleri gösterilmiştir. DMC'nin benzen halkasına bağlı olan metoksi grubu olmayışı kurkuminden daha kararlı kimyasal yapısını ortaya çıkarmış, böylece daha stabil ve aktif formunu oluşturmuştur. Yapılan çalışmalar ile bir çok moleküler hedefi kullanarak tümör oluşumunu, tümör gelişimini ve tümörün ileri evreye ilerlemesini azaltarak maligniteyi inhibe ettiği gösterilmiştir. Hücre bölünmesi ve apoptoz ile ilgili genlerin ifadesinde önemli rol oynayan NFκB'nin inaktivasyonu apoptoz ve hücre ölümünü indüklemektedirken, DMC ile muamele edilen GBM 8401 hücrelerinin NFκB aktivitelerinde inhibisyon izlenmiştir. Ayrıca Bcl-2 ekspresyon seviyelerini azaltarak, kaspaz-9, kaspaz-3 ve sitokrom c ekspresyon seviyelerini arttırarak deri kanserinde apoptozu indüklemektedir. Over kanseri hücrelerinde muamele edildiğinde ise IRS2–PI3K–Akt yolağını inaktive ederek antikanser özelliğini göstermektedir (105,106). İn vitro çalışmaların yanı sıra DMC'nin kanser gelişimi ve büyümesinde kritik öneme sahip olan anjiogenezi inhibe ettiği in vivo olarak gösterilmiştir. Matris metaloproteinaz-9 [MMP-9]'un degradasyonu aracılığı ile herhangi bir toksisite göstermeden fare aortunda kapiler anjiogenezin inhibisyonu gösterilmiştir (107).

Kurkumin III olarak adlandırılan BDMC'nin ise tümör hücrelerinin invazyonunu ve metastazını engellemesi genel olarak üç moleküler mekanizma ile anlaşılabilir. İlk olarak hücresel seviyede hücre döngüsünün baskılanması BDMC ile muamele edilen over kanseri hücrelerinin G1 fazında durması ile açıklanabilir. Moleküler seviyede ise BDMC; matris metaloproteinaz enzimlerinin ve ürokinazın ekspresyonlarını inhibe ederek tümörün invazyonunu engellemektedir. Ek olarak akciğer, mide ve meme kanseri dokularında yüksek eksprese olan ICAM-1 ve VCAM-1'in oksidatif stres aracılığı ile BDMC tarafından doza bağımlı olarak inhibe edilmektedir. Son yıllara ait çalışmaların kapsamında, kurkumin ve analoglarının antikarsinojenik ve kemoterapötik etkinliğini gösteren moleküler mekanizma çalışmaları bulunmasına rağmen, gen ifadesinin düzenlenmesinde kritik rol oynayan miRNA ekspresyonu ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır (108).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

Laminar Flow Class II Kabin (Nuaire), CO₂ İnkübatör (Thermo Electro Corporation), Beckman Coulter vi.Cell™ XR (Cell viability analyser), Floresan faz-kontrast invert mikroskop, Dijital Kamera CCD peltier, Santrifüj, (Hettich, rotina 38), Vortex, Sıvı azot tankı (37lt), Isıtıcı banyo, Buzdolabı (Beko), Multiscan Spectrum (Thermo), FACSCalibur (BD Biosciences), Stratagene MX3005 Real Time PCR

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler

RPMI 1640 (Biochrome), Fetal Bovine Serum (Biochrome), Tripsin /EDTA % 0,25 (Gibco), Penisilin/Streptomisin (Gibco), sisplatin, L-Glutamin, Vi-Cell Reagents (Beckman Coulter), Dimetil sülfoksit (Sigma), FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD), Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche), PBS Dulbecco's (Gibco), 96 well plates (Greiner), 6 well plates (Greiner), Cell Culture Flasks 75 cm² (Greiner).

3.3. Kullanılan Solüsyonlar

3.3.1. RPMI 1640 Besiyeri

500 ml'lik total hacimde %10 FBS içeren besiyeri hazırlamak için ; 50 ml FBS, 5 ml Penisilin/Streptomisin (%1), 5 ml L-Glutamin (%1), 440 ml RPMI 1640 steril filtre kabı içerisinde vakumdan geçirilerek hazırlanmıştır.

500 ml'lik total hacimde %3 FBS içeren besiyeri hazırlamak için ; 15 ml FBS, 5 ml Penisilin/Streptomisin (%1), 5 ml L-Glutamin (%1), 475 ml RPMI 1640 steril filtre kabı içerisinde vakumdan geçirilerek hazırlanmıştır.

Hazırlanan besiyerler +4°C'de saklanmıştır.

3.3.2. Dondurma Besiyeri

%10 FBS içeren besiyerden 900 µl (%90), 100 µl DMSO (%10) 1 ml olarak taze hazırlanmıştır. Dondurma besiyeri ve hücre çözeltisi 1:1 oranında kriyoviale ilave edileceği için gerekli hacimler taze olarak hazırlanıp -20°C'de saklanmıştır.

3.3.3. PBS (Fosfat Tuz Tamponu) Hazırlanması

Tablet şeklinde olan PBS ; 100 ml steril deiyonize su ile çözündürülerek filtre kabı içerisinde vakumdan geçirilerek hazırlanmış ve +4°C’de saklanmıştır.

3.3.4. Kurkumin ve Kurkuminoidlerin Hazırlanması

Etken maddeler kurkumin, DMC ve BDMC 1 ml %5 DMSO içeren besiyerde (200 µl DMSO + 800 µl Besiyeri) çözündürülmüş ve ana stok olarak hazırlanıp +4°C’de saklanmıştır.

3.3.4.1. Kurkumin ve Kurkuminoidlerin Ana Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Kurkumin : Moleküler ağırlığı 368,38 g/mol olan kurkumin 36,838 mg tartılarak 1ml %5 DMSO içeren besiyerde çözündürülüp ana stok konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde hazırlanmıştır.

DMC : Moleküler ağırlığı 338,36 g/mol olan DMC 16,918 mg tartılarak 1 ml %5 DMSO içeren besiyerde çözündürülüp ana stok konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde hazırlanmıştır.

BDMC : Moleküler ağırlığı 30,833 mg olan BDMC 15,416 mg tartılarak 1 ml %5 DMSO içeren besiyerde çözündürülüp ana stok konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde hazırlanmıştır.

Hazırlanan ana stok etken maddeler uygun seyreltme oranları ile 1 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.3.5. Sisplatin Ana Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Molekül ağırlığı 30,001 mg olan sisplatin 1 ml %5 DMSO içeren besiyerde çözündürülüp 100 mM olacak şekilde hazırlanmıştır.

Hazırlanan ana stoktan uygun seyreltme oranları ile 1 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM olacak şekilde dozlar hazırlanmıştır.

3.4. Hücre Kültürü

Zerdeçalın etken maddesi olan kurkumin ve analogları BDMC ile DMC’nin sisplatine dirençli over kanseri hücre proliferasyonuna etkilerinin belirlenmesi ve bu etken maddelerin apoptotik etkinliğinin belirlenmesi amacıyla A2780cp over kanseri hücre hattı ve kontrol olarak A2780 over kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hatları ECACC (European Collection of Cell Cultures) firmasından temin edilmiştir.

Over kanseri hücre soyları RPMI 1640, %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin, %1 L-Glutamin içeren besiyerinde 37°C ve %5 CO₂ ortamında kültüre edilmiştir.

3.4.1. Hücre Çözme

Sıvı azotta (-196 °C) 2 ml kriyovial içerisinde bulunan hücreler çıkarılarak 37°C su banyosunda hızlı bir şekilde çözündürülmüştür.

3.4.2. Hücre Ekme

Dondurma besiyeri içerisinde bulunan DMSO'dan hücreleri uzaklaştırmak için su banyosunda çözödüren hücreler aspire edilerek besiyer içine aktarılmış ve tek hücre süspansiyonu haline getirilmiştir. Hücre süspansiyonu 6 dakika 1500 rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatant hızlıca dökülerek, pellet 1 ml besiyerde sulandırılmıştır. Beckman Coulter Vi-Cell Otomatik Hücre Sayım cihazında hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Hücre sayımı sonrası uygun plate yada kültür flaskına ekim yapılmıştır. Hücreler mikroskopta incelendikten sonra çoğalmaları için 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır. Kültür kabı her gün invert mikroskop ile kontrol edilmiş, 2 günde bir besiyeri değiştirilmiştir. Hücreler konfluent oldukları gün tripsinlenerek pasajlama işlemi uygulanmıştır.

3.4.3. Hücre Alt Kültürleme

Hücreler pasajlanabilmeleri için hücre kültür flasklarının yada platelerinin yüzeyini tamamen kaplamış olmalıdır (Konfluent en az %80 olmalı). Konfluent plate ya da flaskların üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Hücreler serumdan uzaklaştırılmak için +4°C'den çıkarılan soğuk PBS ile yıkanmış ve ardından aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Hücreler tripsinin aktivite gösterdiği 37°C'de 2-5 dakika inkübe edilmiştir. 6 well-plate için 2 ml tripsin, 12 well plate için 1 ml tripsin, 24 well plate için 0,5 ml tripsin, T-25cm flask için 3 ml tripsin, T-75 flask için 5 ml tripsin uygulanmıştır. Hücreler mikroskopta kontrol edilip, adherent özellikteki epitel hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığı izlendiğinde; tripsin, hacminin en az iki katı serumlu besiyeriyle inhibe edilmiştir. Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilmiş ve bir falkon tüpe aktarılmıştır. Tüpe 2-3 ml daha besiyeri ilave edilerek hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücreler 1 ml besiyerinde sulandırılmış ve Beckman Coulter Vi- Cell Otomatik Hücre Sayım cihazında hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

Hücre sayımı sonrası pasajlama oranları belirlenerek hücreler uygun platelere ya da flasklara ekilmiştir. Kültür kabı her gün invert mikroskop ile kontrol edilmiş ve hücreler konfluent oldukları gün tripsinlenerek pasajlama işlemi ya da dondurma işlemi uygulanmıştır.

3.4.4. Hücre Dondurma

Kültür flaskı üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Hücreler serumdan uzaklaştırılmak için soğuk PBS ile yıkanmış ve ardından aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Hücreler tripsinin aktivite gösterdiği 37°C’de 2-5 dakika inkübe edilmiştir. Hücreler mikroskopta kontrol edilip, adherent özellikteki epitel hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığı izlendiğinde; tripsin, hacminin en az iki katı serumlu besiyeriyle inhibe edilmiştir. Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilmiş ve bir falkon tüpe aktarılmıştır. Tüpe 2-3 ml daha besiyeri ilave edilerek hücre süspansiyonu 1500 rpm’de 10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücreler 1 ml besiyerinde sulandırılmış ve hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Taze hazırlanan dondurma medyumunu 1:1 oranında kriyovial hücre çözeltisi ile karanlıkta damla damla eklenmiştir. Dondurma tüpleri, içerisinde izopropanol bulunan dereceli soğutma kabı Mr.Frosty içine yerleştirilerek -80°C’de 24 saat bırakılmış ardından sıvı azot tankına aktarılmıştır.

3.5. Hücre Sayımı

Hücre ekme, alt kültürlenme, dondurma aşamalarında kullandığımız “Beckman Coulter Vi-Cell” Otomatik Hücre Sayım cihazında ölçme kabına 400 µl taze besiyeri, hücre süspansiyonundan 100 µl aktırılarak 1:5 oranında sulandırılmıştır. Tripan Mavisinin ölü hücre membranlarını boyayarak canlı hücre ve yüzde total hücre sayısının hesaplanabildiği bu cihaz ile hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

3.6. WST-1 Yöntemi ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

Tetrazolyum tuzları aktif mitokondri tarafından süksinat tetrazolyum redüktaz enzimi ile elektron alarak indirgenir ve böylece tetrazolyum halkası kırılarak formazana dönüşür. Bu dönüşüm beraberinde renk değişimini de getirir. Ölü hücreler ise tetrazolyum tuzlarını indirgeme yeteneklerini kaybettikleri için herhangi bir renk değişimi gösteremezler. Bu şekilde hücre sayısındaki bir artış, formazan oluşumunu da arttırmakta ve kültürdeki hücre sayısı ile direk bir korelasyona sahip olmaktadır.

WST-1 deneyi için A2780 ve A2780cp hücreleri 100 μ l'de 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 96-kuyu platelere ekilmiştir. Ardından hücrelerin çoğalması ve farklılaşması için 24 saat beklenilmiştir. Mikroskopta çoğalan ve farklılaşmaya başlayan hücreler gözlemlendikten sonra kurkumin, DMC, BDMC ve sisplatin hazırlanan doz aralığında (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M) 3 tekrar şeklinde A2780 ve A2780cp hücre hattına uygulanmıştır (109,110). Hücre proliferasyonu, Cell Proliferation Reagent WST-1 kiti (Roche) kullanılarak analiz edilmiştir. Her kuyucuğa 8 μ l WST-1 (2-(4-İyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfenil)-2H-tetrazolyum sodyum tuz) bileşiği eklenerek 37°C'de 2 saat inkübasyondan sonra, 6'ncı, 12'nci, 24'üncü, 36'ncı, 48'inci saatlerde 440 nm (referans dalgaboyu 630 nm) ölçümleri Multiscan spektrofotometre cihazından alınmıştır (Roche WST-1 protokolü).

Tablo 3-1: Deney Gruplarının Dizayını

Kontrol Grubu	Hücrelere hiçbir madde uygulanmadı.	A2780, A2780cp
Deney Grubu 1	Kurkumin (CUR)	A2780, A2780cp
Deney Grubu 2	Demetoksikurkumin (DMC)	A2780, A2780cp
Deney Grubu 3	Bisdemetoksikurkumin (BDMC)	A2780, A2780cp
Deney Grubu 4	Sisplatin (CİS)	A2780, A2780cp
Deney Grubu 5	CUR+CİS	A2780, A2780cp
Deney Grubu 6	DMC+CİS	A2780, A2780cp
Deney Grubu 7	BDMC+CİS	A2780, A2780cp
Deney Grubu 8	CUR+DMC	A2780, A2780cp
Deney Grubu 9	CUR+DMC+CİS	A2780, A2780cp
Deney Grubu 10	CUR+BDMC	A2780, A2780cp
Deney Grubu 11	CUR+BDMC+CİS	A2780, A2780cp
Deney Grubu 12	CUR+DMC+BDMC	A2780, A2780cp
Deney Grubu 13	CUR+DMC+BDMC+CİS	A2780, A2780cp

3.7. Anneksin V-FITC Yöntemi ile Apoptoz Tayini

Apoptotik hücrelerin tespitinde membran fosfolipitlerinden biri olan fosfolislerinin apoptotik süreçte; plazma membranının sitoplazma kısmına bakan iç yüzeyinden membranın dış yüzeyine çıkması kullanılmaktadır. Anneksin V, hücrenin

dış yüzeyine çıkan fosfatidilserine bağlanarak, apoptoza uğramış hücrelerin tespitine olanak sağlamaktadır. Akan hücre ölçer yöntemi ile FITC-Anneksin kompleksi ve hücre yüzeyindeki fosfatidilserin oranı ölçülebilmektedir. Anneksin-V ile nekrotik hücrelerin bağlanmasının engellenmesi için ikinci boya olarak propidyum iyodür (PI) eklenmektedir.

Anneksin V deneyi için A2780 ve A2780cp hücreleri 3 ml'de 3×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6-kuyu platelere ekilmiştir. A2780 ve A2780cp hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması için 24 saat beklenilmiştir. Mikroskopta hücreler incelendikten sonra 1 μ M kurkumin, DMC, BDMC ve sispaltin şekil 3-1'de belirtildiği gibi kombinasyonlar ile A2780 ve A2780cp hücrelerine uygulanmıştır. 12.saat'de uygulanan dozlar aspire edilerek uzaklaştırılıp 2 ml soğuk PBS ile yıkanmıştır. Hücreler tripsinizasyon işleminden sonra tek hücre süspansiyonu şeklinde 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak hücreler 100 μ l 1x Binding Buffer'da çözündürülerek deney tüplerine aktarılmıştır. Her tüpe 5 μ l FITC anneksin V ve 5 μ l PI (propidyum iyodür) eklenmiştir. Tüpler vortekslelendikten sonra 25°C'de 10 dk karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası her tüpe 400 μ l 1x Binding Buffer eklenerek akan hücre ölçerde (FACSCalibur BD) analiz edilmiştir.

3.8. miR-133b ve GSTP-1 Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

3.8.1. Total RNA İzolasyonu

Kurkumin ve kurkuminoidlerin direnç mekanizmaları ile ilişkili aday genler olan GSTP-1 ve miR-133b'nin gen ekspresyon seviyelerinin gösterilmesi için öncelikle miRNA ve total RNA izolasyonu, The NucleoSpin® miRNA izolasyon kiti kullanılarak, protokolün öngördüğü metot ile yapılmıştır. Böylece nükleaz enzimlerinin inhibe edildiği ortamda miRNA'nın ve total RNA'nın olabildiği en saf haliyle DNA ve proteinlerinden ayrılması sağlanmıştır. Santrifüjleme aşaması dahil olmak üzere tüm aşamalar oda sıcaklığında (18-25°C) gerçekleştirilmiştir. İzolasyon basamaklarına başlamadan önce; yıkama tamponu MW2 ve RNaz içermeyen rDNase hazırlanmıştır. 12 ml yıkama tamponu MW2 üzerine toplam hacim 50 ml olacak şekilde 48 ml %96-100'lük etanol eklenmiştir. Hazırlanan yıkama tamponu oda sıcaklığında bir yıl saklanabilmektedir. RNaz içermeyen rDNaz hazırlamak için; kit içinde bulunan 2 adet rDNaz şişesinin her birine 3 ml reaksiyon tamponu ilave edilerek oda sıcaklığında bir dakika inkübe edilir. rDNaz'ı tamamen çözmek için hafifçe girdap yapılır, mekanik

hasara hassas olan rDNaz için güçlü çalkalamadan uzak durulur. Hazırlanan çözelti aligotlanarak 6 ay boyunca -20 de saklanabilmekle birlikte üç den fazla dondurup çözülmeden kaçınılmalıdır. Total RNA izolasyonu için ilk adım, denatüre edici tuzlar ve beta-merkaptöetanol içeren Lizis tamponu ile hücre materyalinin lizis ve stabilize edilmesidir.

Hücreler kültür ortamından uzaklaştırılıp fosfat tamponu ile yıkanır, tripsinizasyonun ardından santrifüjleme yapılarak her bir örnek materyalin 5×10^6 hücre olacak şekilde hesaplanır (başlangıç örnek materyali, 10^6 'dan daha az hücre içermelidir). Uzun santrifüj ve yıkama aşamaları ekspresyon seviyelerini değiştirebileceği dikkate alınmalıdır. Hücreleri lizis edebilmek için 300 µl Buffer ml eklenir oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir. Hücrelerin lizis edilmesinden sonraki aşama homojenizasyondur. Lizatı içeren örnek materyali mor halkalı NucleoSpin® filtre kolonuna yüklenerek 11.000'de 1 dakika santrifüj edilir. Böylece lizat materyali çözünmemiş kalıntılardan arındırılarak viskosite azaltılmış olur. Bir sonraki aşama da 300 µl'lik lizatın üzerine 150 µl %96-100'lük etanol eklenerek 5 saniye vorteks yapılır, böylece büyük RNA ile DNA'ların bağlanabilecekleri ortam hazırlanmış olur. Vorteksin ardından 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.

Örnek, mavi halkalı NucleoSpin® RNA kolonuna yüklenerek 1 dakika 11.000 g de santrifüj yapılır. Santrifüj sonrası kolonun üst kısmı büyük DNA ve RNA içerirken, kolonun alt kısmında küçük RNA ve protein içermektedir. Kolonun üst kısmı yeni bir NucleoSpin® RNA kolonuna yüklenirken alt kısım saklanır. 350 µl tampon MDB, mavi halkalı büyük RNA ve DNA'ları içeren NucleoSpin® RNA kolonuna eklenerek 11.000 g de 1 dakika santrifüj yapılır ve tuz giderme aşaması tamamlanmış olur. Bir sonraki aşama DNA'nın parçalanması için 100 µl rDNase, NucleoSpin® RNA kolonunun silika membranı üzerine ilave edilir. Küçük RNA ve proteinleri içeren kolonun alt kısmından izolasyona devam edilirken DNA'nın parçalanması için oda sıcaklığında en az 15 dakika inkübe edilir. İlk aşama olarak proteinleri çöktürmek için 300 µl tampon MP eklenir, 5 saniye vortekslenir. 11.000 g de 3 dakika santrifüj sonrası protein pelleti görünür hale gelmiş olur. Protein pelleti elde edilmiş olsa bile kalan kalıntıları giderebilmek için beyaz halkalı NucleoSpin® Protein uzaklaştırma kolonuna süpernatant yüklenerek 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası kolon uzaklaştırılarak alt akış ile devam edilir. Bir sonraki aşama küçük RNA'ların

bağlanmasını sağlamak için 800 µl tampon MX akış üzerine ilave edilerek 5 saniye vortekslenir. Böylece küçük RNA'ları içeren bir örnek kolon ile daha önceki aşama da elde ettiğimiz büyük RNA'lar ayrı ayrı kolonda elde edilmiş olur. Her iki kolon paralel olarak aynı aşamalardan geçerek yıkama adımlarına tabi tutulur. İlk yıkama için 600 µl tampon MW1 ile 11.000 g'de 30 saniye santrifüj yapılırken, ikinci yıkamada 700 µl tampon MW2 ile 11.000 g'de 30 saniye santrifüj yapılır. Son yıkama adımı için 250 µl tampon MW2 ile 11.000 g'de 2 dakika yapılır. Yıkama aşamalarının her birinde santrifüj sonrası alt akış ile devam edilmiştir. Son aşama ise elde edilen RNA'nın uygun konsantrasyon da olması için ayrıştırılmasıdır. Yüksek konsantrasyon için 30 µl, orta konsantrasyon ve ürün için 50 µl, yüksek ürün için 100 µl RNAaz içermeyen su ilave edilerek 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyonun ardından 11.000 g'de 30 saniye santrifüj yapılır.

3.8.2. RNA Miktarının Belirlenmesi

30 µl RNAaz içermeyen su ilave edilerek tamamlanan miRNA ve total RNA örneklerinin saflıklarını kontrol etmek ve konsantrasyonlarını hesaplamak için spektrofotometrik cihaz olan NanoDrop kullanıldı. Her bir örnekten 1 µl yüklenmiş ve 260 nm optik dansitede RNA konsantrasyonu hesaplanmış, 260/280 nm dalga boyundaki optik dansitede ise RNA saflığı kontrol edilmiştir. 260/280 nm dalga boyundaki optik dansite sonuçlarının 1.9 ile 1.8 arasında olmasına dikkat edilerek protein ya da DNA kontaminasyonu varlığı engellenmiştir. 260 nm optik dansitede elde edilen RNA konsantrasyonları ise 1 µl' de 10 ng olacak şekilde eşitlenmiştir.

3.8.3. cDNA Eldesi ve Saklanması

İzole edilen total RNA örnekleri FIREScript™ cDNA synthesis MIX with Oligo (dT) and Random primers kullanılarak cDNA'ya dönüştürülmüştür. -80'de saklanan Total RNA örnekleri ilk olarak Tablo 3-2 'de ifade edildiği gibi 65-70 °C'de 5 dakika inkübe edilerek denatürasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra buz üzerinde bekletilerek Tablo 3-3'de yer alan reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Tablo 3-2: Total RNA-cDNA Denatürasyon Ortamı

İçerik	Miktar (μ l)
RNAz İçermeyen su	8.5 μ l
RNA Template	1 μ l
Random Primer	0.5 μ l

Toplam da 10 μ l hacimde hazırlanan RNA örneği ile random primer karışımı 70 °C’de 5 dakika denatüre edildikten sonra örnekler buz üzerine yerleştirilerek reaksiyon karışımı hazırlanır.

Tablo 3-3: Total RNA-cDNA Reaksiyon Ortamı

İçerik	Miktar (μ l)
RNAz İçermeyen su	3 μ l
SCRIPT RT Tamponu	4 μ l
dNTP Karışımı	1 μ l
DTT Stok Slüsyonu	1 μ l
RNaz İnhibitörü	0.5 μ l
SCRIPT Reverz Transkriptaz	0.5 μ l

Tablo 3-3’de yer alan içerikler nükleaz içermeyen mikrosantrifüj tüpüne ilave edildikten sonra yavaşça pipetaj yapılarak homojen reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. 10 μ l reaksiyon karışımı ile 10 μ l denatürasyonu tamamlanan primer ve RNA karışımı 0,2’ lik mikrosantrifüj aktarılarak karıştırılır. Toplam reaksiyon hacmi 20 μ l olan

karışım Veriti™ Thermal Cycler' a (Thermo Fisher Scientific) yüklenmiş 50°C 60 dakika, 40°C 10 dakika ve 4°C ∞ olacak şekilde işleme tabi tutulmuştur. Böylece tüm genomu ait cDNA'lar elde edilmiş ve reaksiyon sonucunda örnek başına 20 µl cDNA elde edilmiştir.

3.9. miR-133b ve GSTP-1 Gen Ekspresyonunun Kantitatif Real Time PCR (Q- RT-PCR) ile Tespit Edilmesi

Elde edilen örnekler uygun primerler ve 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus kullanılarak Strategene Mx3005P real time PCR cihazı ile kantitatif değerlendirilmiştir. Kantitatif Real Time PCR değerlendirilmesi sırasında normalizasyon amacı ile U6 ve β-Aktin (Housekeeping genler) gen ekspresyonundan faydalanılmıştır. Negatif kontrol reaksiyonu, template hariç tüm bileşenleri içerecek şekilde hazırlanmıştır. Tüm örnekler üç tekrar olacak şekilde test edilmiştir. PCR örnekleri için $2^{-\Delta\Delta CT}$ denklemine göre çalışma grupları arasında hedef genlerin transkript miktarının kaç kat arttığı hesaplanmıştır (111).

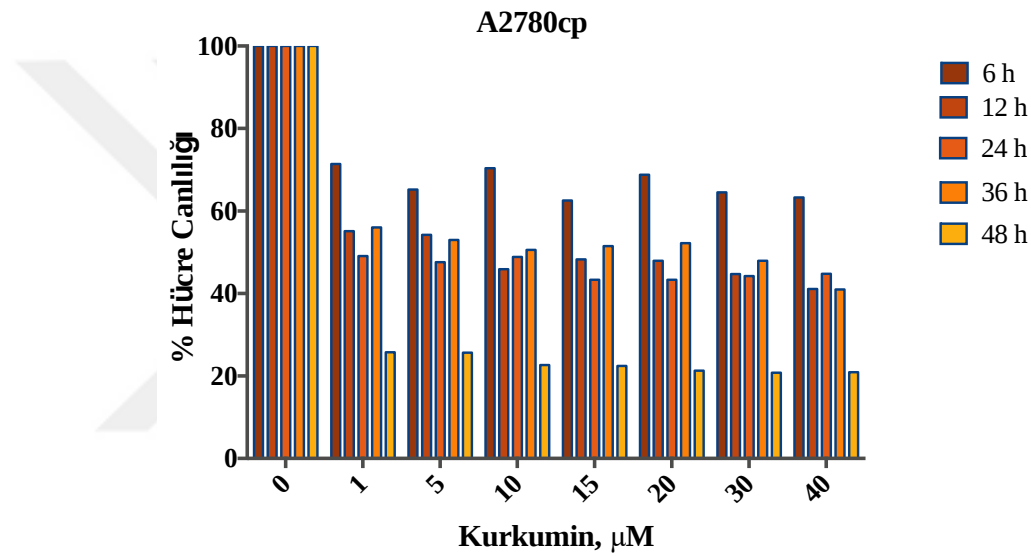
3.10. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

İstatistiksel analiz GraphPad Prism6 kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol grubuna göre farklı gruplar arasındaki anlamlılık düzeyi, grup karşılaştırması için Öğrenci t testi ile belirlendi. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm veriler üç bağımsız deneyin ortalama $\pm$ standart sapması (SD) olarak sunuldu. Hücre tiplerinin IC₅₀ değerleri arasındaki farkı analiz etmek için absorbans değerleri, kurkumin ve analoglarının 0 konsantrasyonunda, hücrelerin % 100'ünün canlı olduğu varsayımıyla yüzdelere çevrildi. Değerler ayarlandıktan sonra İki Yönlü Anova uygulandı ve istatistiksel anlamlılık belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. WST-1 Yöntemi ile Hücre Canlılığı-Sitotoksosite Sonuçları

Kurkumin, DMC, BDMC ve sisplatinin over kanseri hücre hattı A2780 ile sisplatine dirençli over kanseri hücre hattı A2780cp üzerine etkilerini gözlemlemek amacıyla geniş bir doz aralığının da (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M) ve saat diliminde (6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h) 3 tekrar şeklinde uygulanan WST-1 sonuçları aşağıdaki gibidir.

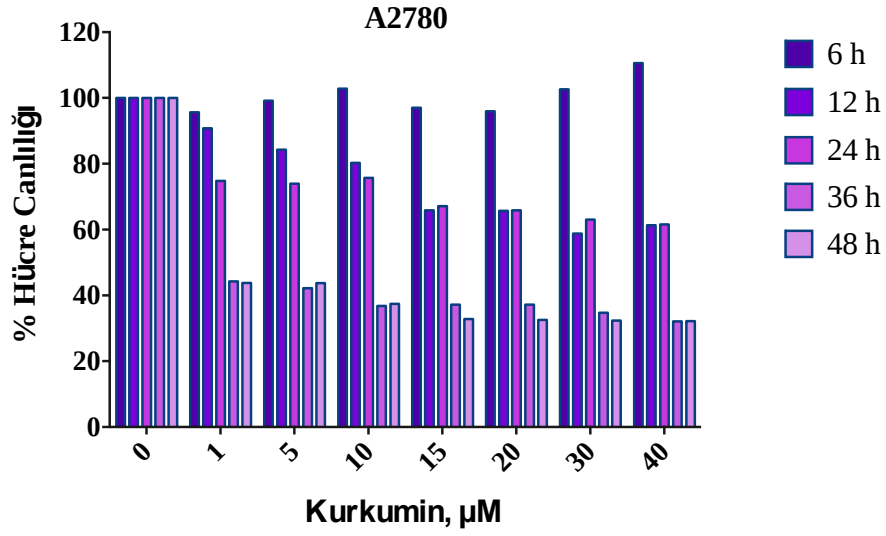


Şekil 4-1: A2780cp Hücre Hattı Üzerinde Kurkumin'in Doz ve Zaman Bağımlı olarak Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Sisplatine dirençli over kanseri hücre hattında A2780cp; kurkumin muamelesi sonrası şekil 4-1'de görüldüğü gibi ilk 6 saat de ilk doz olan 1 μ M'de hücre canlılığı %80'nin altına düşmüş, 6. saat sonrası hücre canlılığındaki azalma çok ciddi hızlanmıştır. 12. saat diliminde yapılan hücre sitotoksosite deney sonuçlarına göre uygulanan en düşük 1 μ M dozda hücre canlılığı %50'ye yaklaşmıştır. Kurkumin'in A2780cp hücre hattında 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h diliminde yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu olan IC50 değeri; elde edilen konsantrasyonun % 50'sinin inhibisyona neden olduğu dozu ifade eder ve sırası ile; 38,30, 12,95, 11,40, 15,02, 0,82 μ M'dır.

Tablo 4-1: A2780cp Hücre Hattında Uygulanan Kurkumin'in İstatistiksel Veri Analiz Sonuçları

	6. Saat		12. Saat		24. Saat		36. Saat		48. Saat	
	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri
1 uM	71,42 $\pm$ 1,007	<0,0001	55,11 $\pm$ 0,576	<0,0001	49,08 $\pm$ 0,481	<0,0001	55,99 $\pm$ 0,905	<0,0001	25,76 $\pm$ 0,115	<0,0001
5 uM	65,22 $\pm$ 0,1192	<0,0001	54,24 $\pm$ 2,45	<0,0001	47,61 $\pm$ 2,446	<0,0001	52,97 $\pm$ 3,379	<0,0001	25,66 $\pm$ 0,603	<0,0001
10 uM	70,38 $\pm$ 0,2385	<0,0001	45,89 $\pm$ 0,503	<0,0001	48,87 $\pm$ 0,091	<0,0001	50,56 $\pm$ 1,066	<0,0001	22,63 $\pm$ 0,709	<0,0001
15 uM	62,53 $\pm$ 0,2385	<0,0001	48,29 $\pm$ 0,454	<0,0001	43,36 $\pm$ 0,091	<0,0001	51,52 $\pm$ 0,480	<0,0001	22,46 $\pm$ 0,115	<0,0001
20 uM	68,80 $\pm$ 0,3578	<0,0001	47,93 $\pm$ 0,377	<0,0001	43,36 $\pm$ 0,182	<0,0001	52,19 $\pm$ 0,061	<0,0001	21,33 $\pm$ 0,115	<0,0001
30 uM	64,51 $\pm$ 0,4519	<0,0001	44,73 $\pm$ 3,270	<0,0001	44,25 $\pm$ 1,102	<0,0001	47,94 $\pm$ 0,061	<0,0001	20,83 $\pm$ 0,252	<0,0001
40 uM	63,27 $\pm$ 0,7083	<0,0001	41,10 $\pm$ 2,893	<0,0001	44,77 $\pm$ 0,445	<0,0001	40,95 $\pm$ 0,532	<0,0001	20,9 $\pm$ 0,300	<0,0001

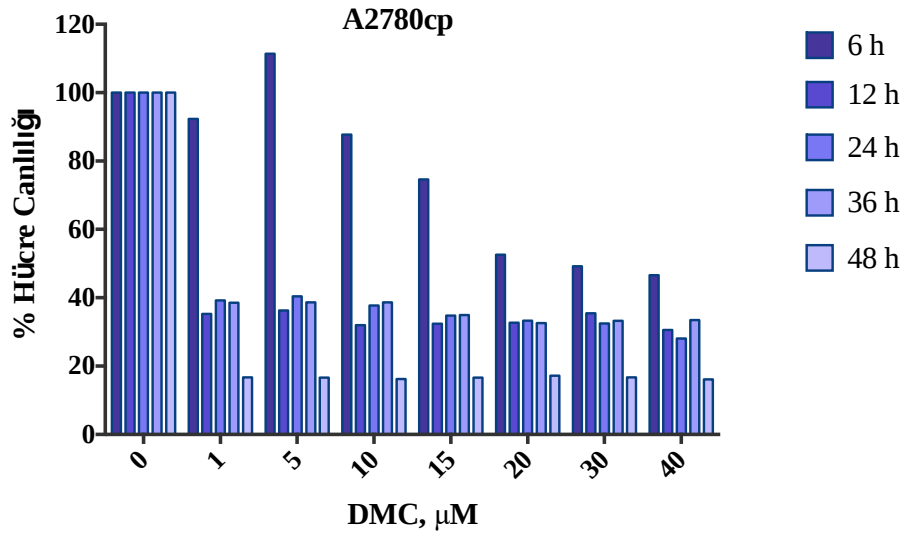


Şekil 4-2: A2780 Over Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Kurkumin'in Doz ve Zaman Bağımlı olarak Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Over kanseri hücre hattında A2780, Şekil 4-2'de izlendiği gibi kurkumin uygulanması sonrası 6. saat de tüm dozlarda hücre canlılığı kontrol ile paralel seyretmiş ve 12. saatler de ise tüm dozlarda canlılık yavaş yavaş azalmaya başlamıştır. 36 h ve 48 h'ler içinde en düşük dozdan itibaren hücre canlılığı % 50'nin altına inmeye başlamıştır. A2780 hücre hattında kurkumin muamelesi sonrası 12 h, 24 h, 36 h, 48 h diliminde elde edilen IC50 değerleri sırası ile; 41,89, 40,65, 6,26, 5,63 µM'dır.

Tablo 4-2: A2780 Hücre Hattında Uygulanan Kurkumin'in İstatistiksel Veri Analiz Sonuçları

	6. Saat		12. Saat		24. Saat		36. Saat		48. Saat	
	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri
1 uM	95,96 $\pm$ 1,159	0,0009	90,78 $\pm$ 0,555	<0,0001	74,79 $\pm$ 0,271	<0,0001	44,22 $\pm$ 0,093	<0,0001	43,78 $\pm$ 0,273	<0,0001
5 uM	99,22 $\pm$ 2,176	0,9336	84,24 $\pm$ 4,746	<0,0001	73,98 $\pm$ 0,000	<0,0001	42,21 $\pm$ 0,153	<0,0001	43,72 $\pm$ 0,182	<0,0001
10 uM	102,80 $\pm$ 0,669	0,0548	80,24 $\pm$ 4,746	<0,0001	75,70 $\pm$ 0,682	<0,0001	36,80 $\pm$ 0,141	<0,0001	37,42 $\pm$ 1,530	<0,0001
15 uM	97,00 $\pm$ 0,167	0,0353	65,81 $\pm$ 1,455	<0,0001	67,11 $\pm$ 1,634	<0,0001	37,21 $\pm$ 0,701	<0,0001	32,80 $\pm$ 2,888	<0,0001
20 uM	95,94 $\pm$ 0,502	0,0021	65,69 $\pm$ 1,277	<0,0001	65,85 $\pm$ 0,271	<0,0001	37,21 $\pm$ 0,772	<0,0001	32,54 $\pm$ 0,328	<0,0001
30 uM	102,60 $\pm$ 3,343	0,0831	58,78 $\pm$ 1,111	<0,0001	63,05 $\pm$ 0,313	<0,0001	34,71 $\pm$ 0,812	<0,0001	32,38 $\pm$ 0,182	<0,0001
40 uM	110,62 $\pm$ 2,214	<0,0001	61,33 $\pm$ 0,757	<0,0001	61,60 $\pm$ 0,156	<0,0001	32,13 $\pm$ 0,484	<0,0001	32,17 $\pm$ 0,636	<0,0001

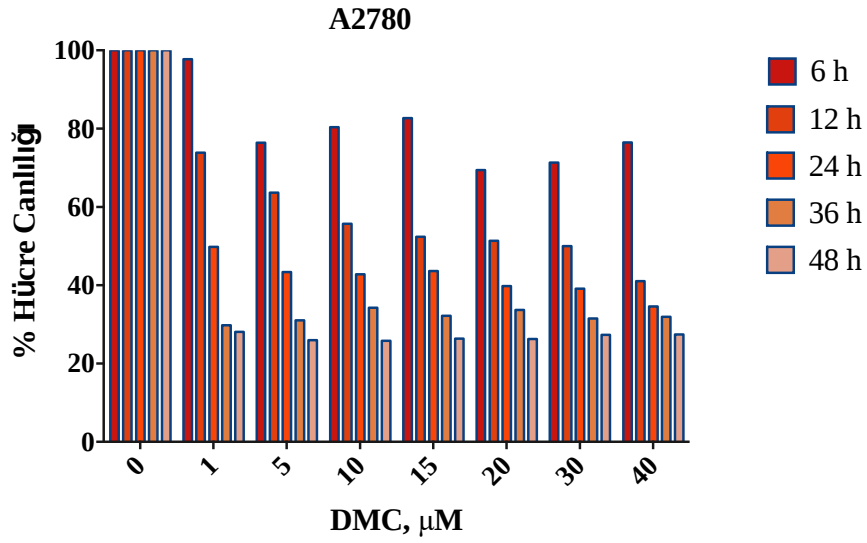


Şekil 4-3. A2780cp Hücre Hattı Üzerinde DMC'nin Doz ve Zaman Bağımlı olarak Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Sisplatine dirençli over kanseri hücre hattında A2780cp; DMC muamelesi sonrası şekil 4-2'de görüldüğü gibi 6. saat de erken dozlarda hücre inhibisyonu çok az izlenmiş olup, hatta 5 µM dozda hücre proliferasyonu devam etmiştir. Ancak, 12. saat itibari ile 1 µM'da hücre canlılığı dramatik şekilde azalarak DMC uygulamasında kurkumine göre çok daha keskin bir hücre canlılığında inhibisyon izlenmiştir. A2780cp hücre hattında 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h diliminde DMC muamelesi sonrası elde edilen IC50 değerleri; 36,81, 3.94, 5,12, 5,23, 0,36 µM'dır.

Tablo 4-3: A2780cp Hücre Hattında Uygulanan DMC'nin İstatistiksel Veri Analiz Sonuçları

	6. Saat		12. Saat		24. Saat		36. Saat		48. Saat	
	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri
1 uM	92,31 $\pm$ 0,893	<0,0001	35,29 $\pm$ 2,562	<0,0001	39,22 $\pm$ 2,161	<0,0001	38,53 $\pm$ 0,831	<0,0001	16,72 $\pm$ 0,094	<0,0001
5 uM	111,38 $\pm$ 0,278	<0,0001	36,26 $\pm$ 2,627	<0,0001	40,37 $\pm$ 0,189	<0,0001	38,68 $\pm$ 0,231	<0,0001	16,63 $\pm$ 0,125	<0,0001
10 uM	87,68 $\pm$ 0,578	<0,0001	32,006 $\pm$ 0,794	<0,0001	37,69 $\pm$ 0,959	<0,0001	38,66 $\pm$ 0,350	<0,0001	16,20 $\pm$ 0,170	<0,0001
15 uM	74,63 $\pm$ 0,893	<0,0001	32,42 $\pm$ 1,331	<0,0001	34,80 $\pm$ 0,341	<0,0001	34,92 $\pm$ 0,723	<0,0001	16,66 $\pm$ 0,295	<0,0001
20 uM	52,59 $\pm$ 2,085	<0,0001	32,70 $\pm$ 1,452	<0,0001	33,27 $\pm$ 0,189	<0,0001	32,60 $\pm$ 0,417	<0,0001	17,18 $\pm$ 0,047	<0,0001
30 uM	49,16 $\pm$ 1,735	<0,0001	35,43 $\pm$ 0,363	<0,0001	32,46 $\pm$ 2,000	<0,0001	33,23 $\pm$ 0,644	<0,0001	16,66 $\pm$ 0,142	<0,0001
40 uM	46,57 $\pm$ 1,628	<0,0001	30,53 $\pm$ 1,695	<0,0001	28,04 $\pm$ 1,556	<0,0001	33,48 $\pm$ 0,791	<0,0001	16,09 $\pm$ 0,283	<0,0001

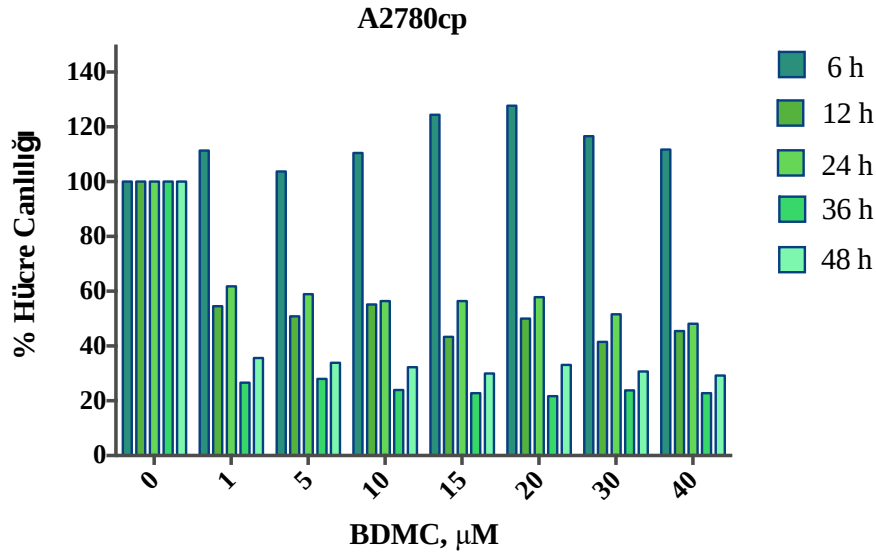


Şekil 4-4: A2780 Over Kanseri Hücre Hattı Üzerinde DMC'nin Doz ve Zaman Bağımlı olarak Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Over kanseri hücre hattında A2780 şekil 4-4'de görüldüğü gibi DMC ile muamele sonrası 1 μM 6. saat de inhibisyon izlenmemiş, tüm dozların ilk 6 saatinde A2780cp dirençli hücre hattına oranla çok daha yavaş bir inhibisyon izlenmiştir. A2780cp de 12.saatde tüm dozlarda izlenen dramatik düşüş bu hatta izlenmemiş, hücre canlılığının %50'nin altına düşmesi 24 h'de neredeyse tüm dozlarda izlenmiştir. A2780 hücre hattında 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h diliminde DMC muamelesi sonrası elde edilen IC50 değerleri; 70,06, 18,03, 8,56, 2,98, 1,16 μM 'dır.

Tablo 4-4. A2780 Hücre Hattında Uygulanan DMC'nin İstatistiksel Veri Analiz Sonuçları

	6. Saat		12. Saat		24. Saat		36. Saat		48. Saat	
	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri
1 uM	97,74 $\pm$ 0,700	0,6939	73,88 $\pm$ 0,987	<0,0001	49,79 $\pm$ 0,385	<0,0001	29,78 $\pm$ 0,484	<0,0001	28,07 $\pm$ 0,190	<0,0001
5 uM	76,39 $\pm$ 0,825	<0,0001	63,68 $\pm$ 1,508	<0,0001	43,40 $\pm$ 0,385	<0,0001	31,05 $\pm$ 0,075	<0,0001	25,98 $\pm$ 0,435	<0,0001
10 uM	80,39 $\pm$ 8,390	<0,0001	55,72 $\pm$ 2,249	<0,0001	42,82 $\pm$ 0,00	<0,0001	34,28 $\pm$ 1,00	<0,0001	25,82 $\pm$ 0,285	<0,0001
15 uM	82,71 $\pm$ 0,126	<0,0001	52,36 $\pm$ 3,365	<0,0001	43,66 $\pm$ 0,810	<0,0001	32,19 $\pm$ 1,732	<0,0001	26,37 $\pm$ 0,190	<0,0001
20 uM	69,42 $\pm$ 3,377	<0,0001	51,36 $\pm$ 10,829	<0,0001	39,79 $\pm$ 1,259	<0,0001	33,72 $\pm$ 0,149	<0,0001	26,26 $\pm$ 1,120	<0,0001
30 uM	71,31 $\pm$ 1,239	<0,0001	50,00 $\pm$ 0,00	<0,0001	39,12 $\pm$ 0,145	<0,0001	31,52 $\pm$ 0,037	<0,0001	27,35 $\pm$ 2,802	<0,0001
40 uM	76,47 $\pm$ 2,211	<0,0001	41,04 $\pm$ 0,646	<0,0001	34,59 $\pm$ 0,145	<0,0001	31,95 $\pm$ 0,074	<0,0001	27,46 $\pm$ 3,607	<0,0001

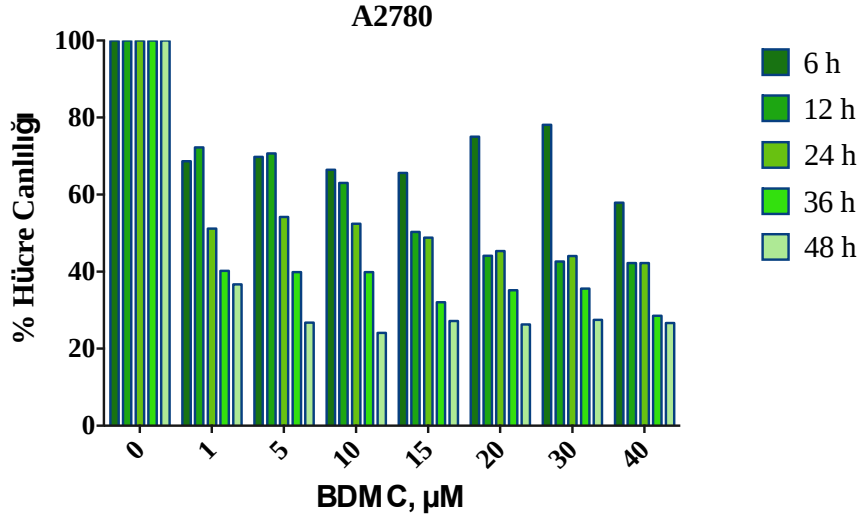


Şekil 4-5: A2780cp Hücre Hattı Üzerinde BDMC'nin Doz ve Zaman Bağımlı Olarak Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Sisplatine dirençli over kanseri hücre hattında şekil 4-5'de izlenen BDMC uygulanması ilk 6 h de tüm dozlarda proliferasyonun artmış olması bakımından A2780 hücre hattından ayrılmaktadır. BDMC uygulama sonrası; 12. saat de ilk dozdan ileri dozlara kadar ani bir düşüş ile %50 canlılığın inhibisyonu belirgin bir şekilde izlenmiştir. A2780cp hücre hattında 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h diliminde BDMC muamelesi sonrası elde edilen IC₅₀ değerleri; 13,51, 20,54, 0,96, 3,34, μM 'dır.

Tablo 4-5: A2780cp Hücre Hattında Uygulanan BDMC'nin İstatistiksel Veri Analiz Sonuçları

	6. Saat		12. Saat		24. Saat		36. Saat		48. Saat	
	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri
1 uM	111,35 $\pm$ 7,748	<0,0001	54,54 $\pm$ 4,040	<0,0001	61,76 $\pm$ 2,859	<0,0001	26,61 $\pm$ 1,019	<0,0001	35,64 $\pm$ 0,797	<0,0001
5 uM	103,72 $\pm$ 0,323	<0,0001	50,84 $\pm$ 1,171	<0,0001	58,93 $\pm$ 0,100	<0,0001	28,04 $\pm$ 0,164	<0,0001	33,85 $\pm$ 1,967	<0,0001
10 uM	110,42 $\pm$ 0,645	<0,0001	55,18 $\pm$ 1,303	<0,0001	56,45 $\pm$ 0,100	<0,0001	23,93 $\pm$ 2,305	<0,0001	32,24 $\pm$ 0,601	<0,0001
15 uM	124,39 $\pm$ 3,635	<0,0001	43,36 $\pm$ 0,709	<0,0001	56,40 $\pm$ 0,346	<0,0001	22,83 $\pm$ 1,418	<0,0001	30,01 $\pm$ 0,797	<0,0001
20 uM	127,74 $\pm$ 4,881	<0,0001	50,06 $\pm$ 0,981	<0,0001	57,78 $\pm$ 1,927	<0,0001	21,72 $\pm$ 1,357	<0,0001	33,07 $\pm$ 1,189	<0,0001
30 uM	116,57 $\pm$ 0,323	<0,0001	41,51 $\pm$ 0,964	<0,0001	51,55 $\pm$ 0,346	<0,0001	23,79 $\pm$ 0,107	<0,0001	30,75 $\pm$ 0,530	<0,0001
40 uM	111,73 $\pm$ 0,00	<0,0001	45,45 $\pm$ 0,364	<0,0001	48,09 $\pm$ 0,00	<0,0001	22,83 $\pm$ 0,107	<0,0001	29,22 $\pm$ 0,859	<0,0001

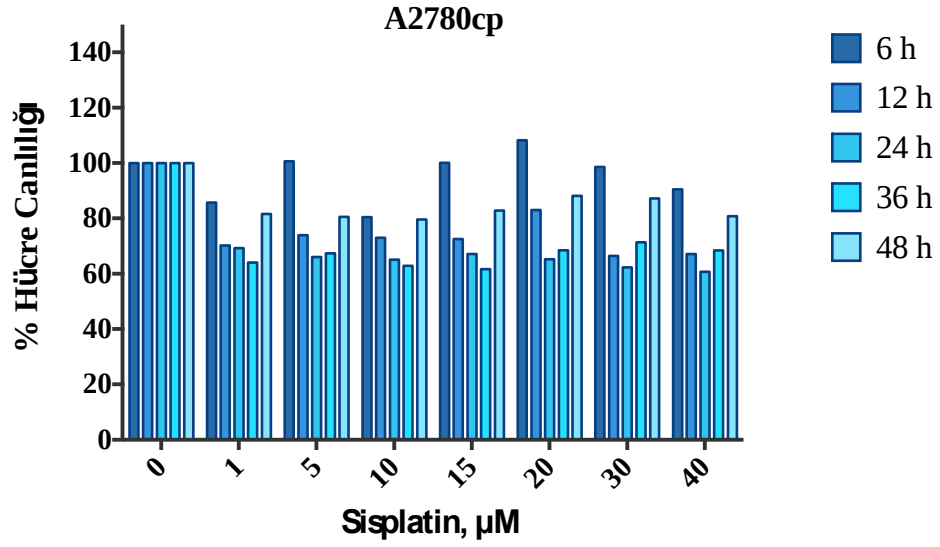


Şekil 4-6: A2780 Over Kanseri Hücre Hattı Üzerinde BDMC'nin Doz ve Zaman Bağımlı Olarak Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

BDMC'nin Şekil 4-6'da gösterildiği gibi A2780 over kanseri hücre hattında uygulanması hücre canlılığı üzerine etkisini ilk 6 saat içinde göstermiştir. 20 µM, 30 µM ve 40 µM dozlarında 6 h ile 12 h arasında sitotoksosite farkları izlenirken ilk dozlarda anlamlı ölçüde farklılık izlenmemiştir. İlk dozlar olan 1 µM, 5 µM ve 10 µM'da canlılığın %50'nin altına düşmesi için daha uzun zaman diliminde (36 h, 48 h) muamele edilmesi gerekmiştir. A2780 hücre hattında 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h diliminde BDMC muamelesi sonrası elde edilen IC50 değerleri; 45,77, 17,39, 13,47, 5,43, 1,76 µM'dır.

Tablo 4-6: A2780 Hücre Hattında Uygulanan BDMC'nin İstatistiksel Veri Analiz Sonuçları

	6. Saat		12. Saat		24. Saat		36. Saat		48. Saat	
	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri
1 uM	68,66 $\pm$ 0,436	<0,0001	72,21 $\pm$ 5,572	<0,0001	51,18 $\pm$ 0,191	<0,0001	40,21 $\pm$ 0,750	<0,0001	36,72 $\pm$ 3,364	<0,0001
5 uM	69,81 $\pm$ 0,330	<0,0001	70,69 $\pm$ 9,107	<0,0001	54,17 $\pm$ 0,096	<0,0001	39,91 $\pm$ 0,117	<0,0001	26,74 $\pm$ 1,998	<0,0001
10 uM	66,47 $\pm$ 0,330	<0,0001	63,04 $\pm$ 8,237	<0,0001	52,46 $\pm$ 0,191	<0,0001	39,91 $\pm$ 0,512	<0,0001	24,12 $\pm$ 1,484	<0,0001
15 uM	65,61 $\pm$ 0,165	<0,0001	50,32 $\pm$ 1,510	<0,0001	48,81 $\pm$ 0,670	<0,0001	32,07 $\pm$ 0,522	<0,0001	27,17 $\pm$ 0,570	<0,0001
20 uM	75,04 $\pm$ 0,165	<0,0001	44,13 $\pm$ 0,00	<0,0001	45,32 $\pm$ 0,507	<0,0001	35,16 $\pm$ 2,399	<0,0001	26,26 $\pm$ 1,853	<0,0001
30 uM	78,09 $\pm$ 1,003	<0,0001	42,61 $\pm$ 3,424	<0,0001	44,05 $\pm$ 0,191	<0,0001	35,60 $\pm$ 0,610	<0,0001	27,48 $\pm$ 1,364	<0,0001
40 uM	57,90 $\pm$ 0,719	<0,0001	42,20 $\pm$ 0,350	<0,0001	42,23 $\pm$ 0,253	<0,0001	28,58 $\pm$ 0,176	<0,0001	26,66 $\pm$ 0,631	<0,0001

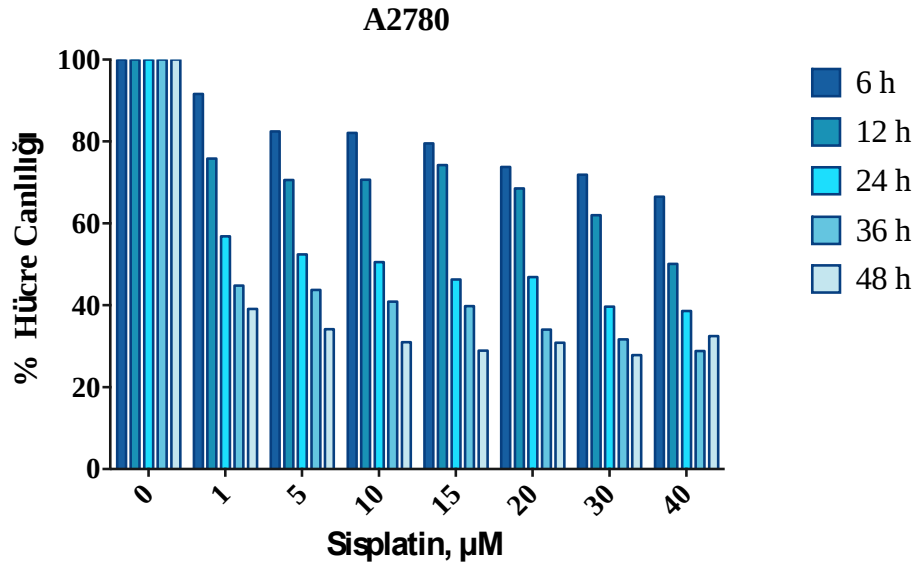


Şekil 4-7: A2780cp Hücre Hattı Üzerinde Sisplatin'in Doz ve Zaman Bağımlı Olarak Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Sisplatine dirençli hücre hattı A2780cp'de, sisplatin uygulanması beklendiği gibi hücre canlılığında tüm dozlarda ve zaman diliminde %50'nin altına düşmesine izin vermeyerek, herhangi bir etken madde ve sisplatin uygulanmamış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında dirençli hücre hattı profiline sahip olduğu istatistiksel olarak da anlamlı gösterilmiştir. A2780cp hücre hattında 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h diliminde sisplatin muamelesi sonrası elde edilen IC50 değerleri; 673,9, 55,49, 35,11, 41,26, 124,4 µM'dır.

Tablo 4-7: A2780cp Hücre Hattında Uygulanan Sisplatin'in İstatistiksel Veri Analiz Sonuçları

	6. Saat		12. Saat		24. Saat		36. Saat		48. Saat	
	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri
1 uM	85,71 $\pm$ 3,383	<0,0001	70,20 $\pm$ 0,225	<0,0001	69,26 $\pm$ 3,726	<0,0001	64,02 $\pm$ 1,037	<0,0001	81,566 $\pm$ 1,152	<0,0001
5 uM	100,62 $\pm$ 5,452	<0,0001	73,92 $\pm$ 0,179	<0,0001	66,05 $\pm$ 1,541	<0,0001	67,39 $\pm$ 0,963	<0,0001	80,54 $\pm$ 0,622	<0,0001
10 uM	80,45 $\pm$ 6,777	<0,0001	72,97 $\pm$ 0,314	<0,0001	65,09 $\pm$ 2,053	<0,0001	62,86 $\pm$ 1,025	<0,0001	79,59 $\pm$ 2,584	<0,0001
15 uM	100,12 $\pm$ 3,913	<0,0001	72,50 $\pm$ 0,179	<0,0001	67,14 $\pm$ 1,027	<0,0001	61,64 $\pm$ 1,639	<0,0001	82,82 $\pm$ 0,549	<0,0001
20 uM	108,27 $\pm$ 1,128	<0,0001	83,03 $\pm$ 1,786	<0,0001	65,22 $\pm$ 1,238	<0,0001	68,48 $\pm$ 0,724	<0,0001	88,18 $\pm$ 0,948	<0,0001
30 uM	98,62 $\pm$ 2,641	<0,0001	66,45 $\pm$ 0,594	<0,0001	62,28 $\pm$ 0,474	<0,0001	71,34 $\pm$ 0,947	<0,0001	87,20 $\pm$ 1,110	<0,0001
40 uM	90,47 $\pm$ 6,623	<0,0001	67,11 $\pm$ 1,537	<0,0001	60,71 $\pm$ 1,852	<0,0001	68,41 $\pm$ 1,754	<0,0001	80,827 $\pm$ 1,658	<0,0001

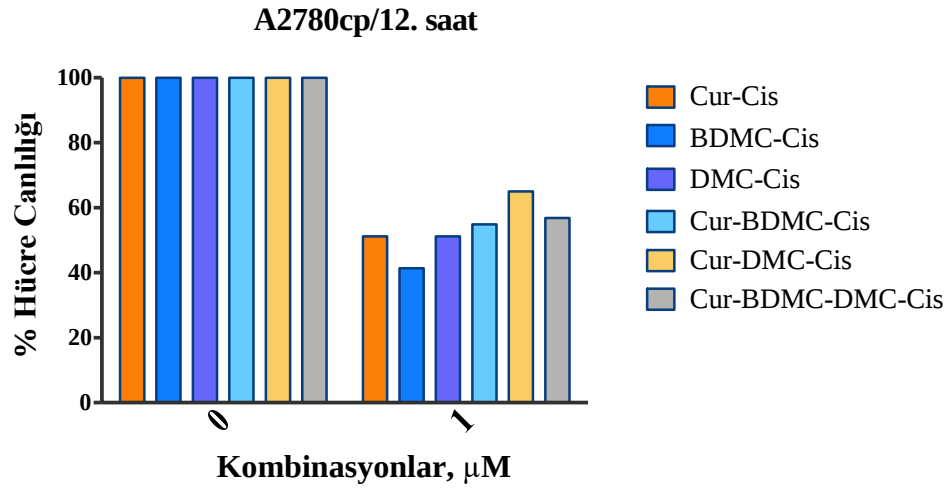


Şekil 4-8: A2780 Over Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Sisplatin'in Doz ve Zaman Bağımlı Olarak Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Sisplatinin, direnç göstermeyen over kanseri hücre hattında uygulanması sonrası tüm dozlarda ilk 6 saat içerisinde başlayarak hücre canlılığını inhibe etmeye başlamıştır. Literatürle uyumlu olarak özellikle 5 µM'dan başlayarak 24 h ve sonrası muamelede ciddi hücre proliferasyonunda inhibisyon izlenmiştir. A2780 hücre hattında 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h diliminde sisplatin muamelesi sonrası elde edilen IC50 değerleri; 64,06, 36,87, 12,2, 6,49, 3,33 µM'dır.

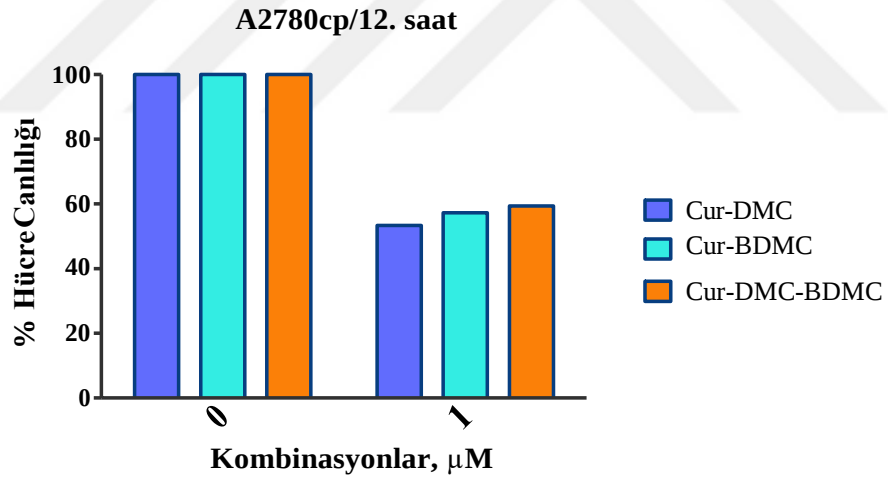
Tablo 4-8: A2780 Hücre Hattında Uygulanan Sisplatin'in İstatistiksel Veri Analiz Sonuçları

	6. Saat		12. Saat		24. Saat		36. Saat		48. Saat	
	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri	Mean $\pm$ SD	p Değeri
1 uM	91,61 $\pm$ 1,199	<0,0001	75,86 $\pm$ 1,221	<0,0001	56,81 $\pm$ 0,558	<0,0001	44,76 $\pm$ 2,361	<0,0001	39,10 $\pm$ 0,197	<0,0001
5 uM	82,44 $\pm$ 1,149	<0,0001	70,60 $\pm$ 4,034	<0,0001	52,44 $\pm$ 1,543	<0,0001	43,75 $\pm$ 0,917	<0,0001	34,18 $\pm$ 0,372	<0,0001
10 uM	82,09 $\pm$ 1,765	<0,0001	70,66 $\pm$ 1,146	<0,0001	50,53 $\pm$ 0,628	<0,0001	40,91 $\pm$ 2,465	<0,0001	31,00 $\pm$ 2,106	<0,0001
15 uM	79,53 $\pm$ 1,645	<0,0001	74,23 $\pm$ 4,496	<0,0001	46,26 $\pm$ 1,726	<0,0001	39,78 $\pm$ 0,537	<0,0001	28,92 $\pm$ 1,490	<0,0001
20 uM	73,74 $\pm$ 1,092	<0,0001	68,54 $\pm$ 4,785	<0,0001	46,85 $\pm$ 2,519	<0,0001	34,05 $\pm$ 0,757	<0,0001	30,83 $\pm$ 0,628	<0,0001
30 uM	71,86 $\pm$ 2,052	<0,0001	62,03 $\pm$ 0,846	<0,0001	39,65 $\pm$ 0,482	<0,0001	31,69 $\pm$ 0,537	<0,0001	27,82 $\pm$ 2,654	<0,0001
40 uM	66,49 $\pm$ 1,595	<0,0001	50,09 $\pm$ 3,101	<0,0001	38,62 $\pm$ 0,554	<0,0001	28,80 $\pm$ 0,661	<0,0001	32,45 $\pm$ 0,177	<0,0001



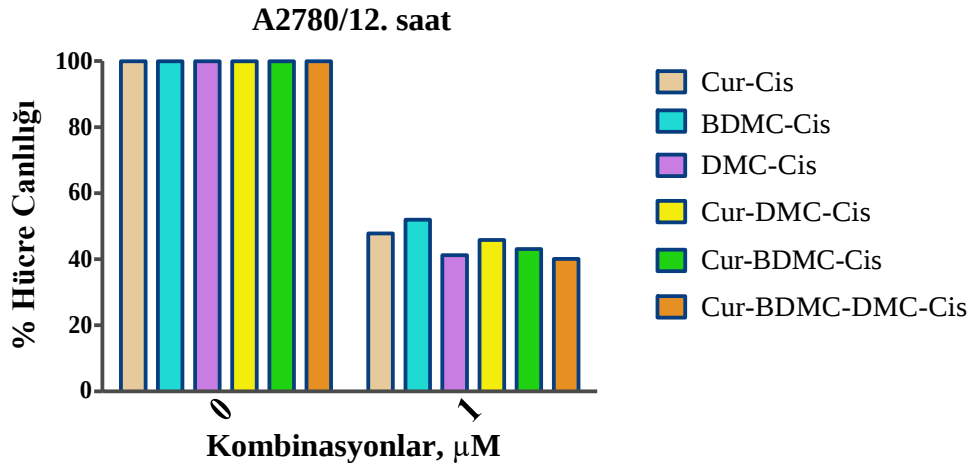
Şekil 4-9: A2780cp Hücre Hattında 1 μM Doz-12. Saatte Sisplatinli Kombinasyon Gruplarının Hücre Canlılığı üzerine Etkisi

A2780cp hücre hattında 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h diliminde Cur+Cis, BDMC+Cis, DMC+Cis, Cur+BDMC+Cis, Cur+DMC+Cis, Cur+BDMC+DMC+Cis muamelesi sonrası IC₅₀ değerleri ; 1,049, 0,70, 1,04, 1,21, 1,85, 1,31 μM 'dır.



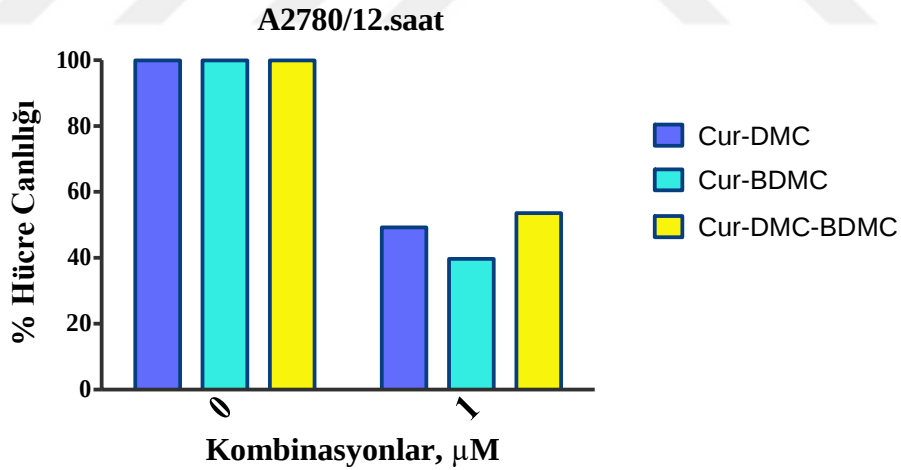
Şekil 4-10: A2780cp Hücre Hattında 1 μM Doz-12. Saatte Kombinasyon Gruplarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

A2780cp hücre hattında 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h diliminde Cur+DMC, Cur+BDMC, Cur+DMC+BDMC muamelesi sonrası IC₅₀ değerleri ; 1,14, 1,34, 1,46 μM 'dır.



Şekil 4-11: A2780 Hücre Hattında 1 μM Doz-12. Saatte Sisplatinli Kombinasyon Gruplarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

A2780 hücre hattında 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h diliminde Cur+Cis, BDMC+Cis, DMC+Cis, Cur+BDMC+Cis, Cur+DMC+Cis, Cur+BDMC+DMC+Cis muamelesi sonrası IC50 değerleri ; 0,91, 1,08, 0,7, 0,84, 0,75, 0,66 μM 'dır.



Şekil 4-12: A2780 Hücre Hattında 1 μM Doz-12. Saatte Kombinasyon Gruplarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

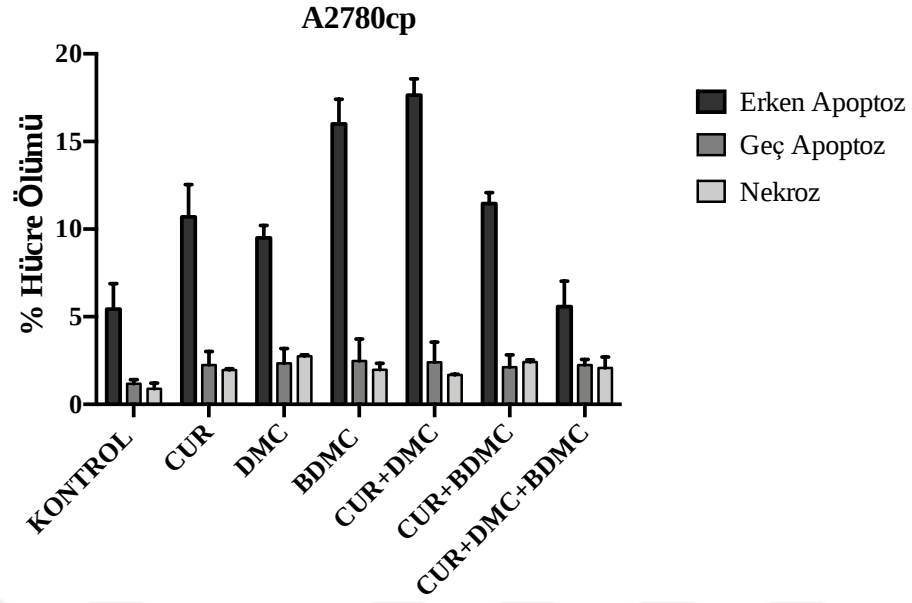
A2780 hücre hattında 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h diliminde Cur+DMC, Cur+BDMC, Cur+DMC+BDMC muamelesi sonrası IC50 değerleri ; 0,97, 0,65, 1,15 μM 'dır.

Yayınlanan daha önceki çalışmalar da tutarlı IC₅₀ sonucu alınmadığını gösterilmiştir (112,113). 1-100 µM'a kadar değişen konsantrasyonlar da A2780 için IC₅₀ değeri, gerek sisplatin dirençli, gerekse duyarlı over kanseri hücre hatlarının ne kadar değişken davranış ve cevaplara sahip olduğunu göstermektedir.

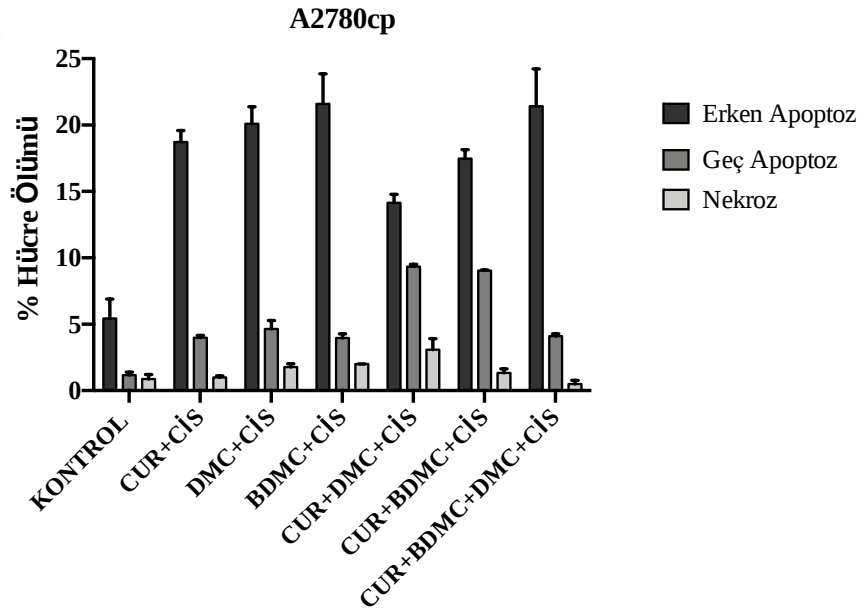
Over kanserine dirençli A2780cp hücre hattında uygulanan tüm kombinasyon gruplarının 12. saat diliminde 1 µM doz'da hücre proliferasyonuna etkisi Şekil 4-9, Şekil 4-10'da gösterilirken over kanseri hücre hattı A2780'de uygulanan tüm kombinasyon gruplarının 12. saat dilimi 1 µM doz'da hücre proliferasyonuna etkisi Şekil 4-11, Şekil 4-12'de gösterilmiştir. Her iki hücre hattında da uygulanan 1 µM dozun canlılık üzerine etkisi 12. saat de kontrol grubuna göre toksik etki oluşturmadan inhibisyon göstermektedir.

4.2 Anneksin V-PI ile Apoptotik Değerlendirmeler

Anneksin V deneyi için A2780 ve A2780cp hücreleri 3 ml'de 3x10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde 6-kuyu platelere ekilmiş, hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması için 24 saat beklenilmiştir. WST-1 sonuçlarına göre 12. saat'de erken doz 1 µM'da tüm kombinasyon gruplarının hücre canlılığına toksik etki oluşturmadan inhibisyon gösterdikleri belirlenmiştir. Akan hücre ölçer yöntemi ile hücre ölümlerinin apoptoz-nekroz analizi tüm kombinasyon grupları için 12. saat ve 1µM olarak belirlenmiştir.

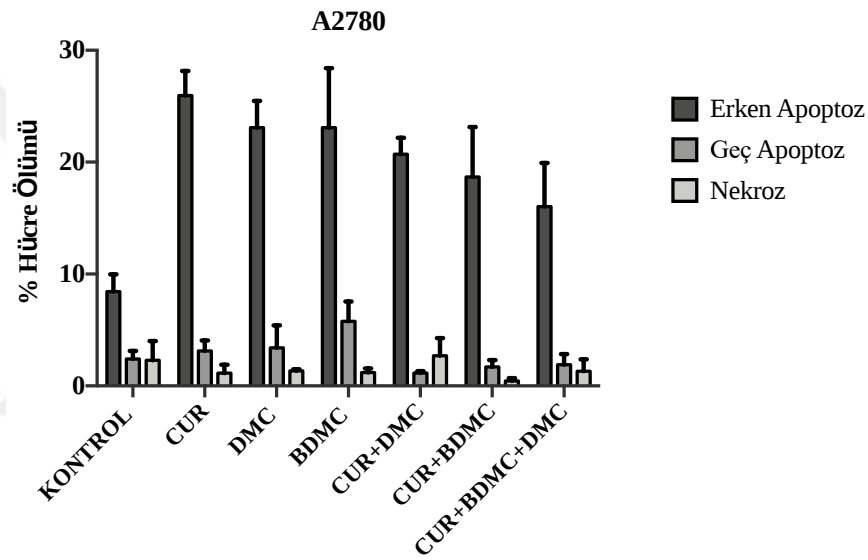


Şekil 4-13: A2780cp Hücre Hattında 12h - 1 μ M Konsantrasyonda Apoptoz-Nekroz Tayini

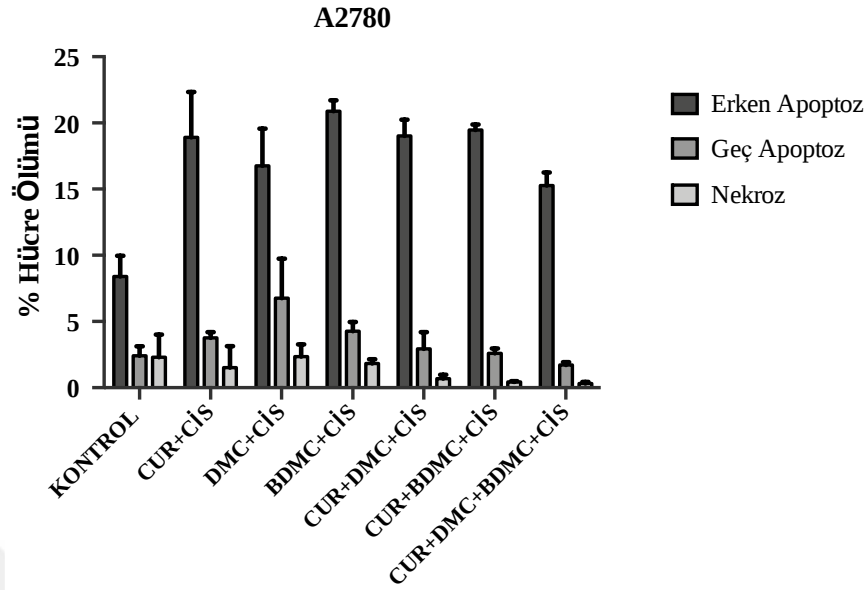


Şekil 4-14: A2780cp Hücre Hattında Sisplatinli Kombinasyon Gruplarının 12h - 1 μ M Konsantrasyonda Apoptoz-Nekroz Tayini

Over kanserine dirençli hücre hattı A2780cp için kurkumin, DMC, BDMC'nin ve kombinasyonlarının uygulanması sonrası 12.saat de Anneksin V-PI deneyi ile hücre ölüm mekanizmasının nekroz olmadığı gösterilmiştir. Şekil 4-13 ile Şekil 4-14'de gösterildiği gibi tüm gruplarda erken apoptotik ölüm izlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kurkumin ile DMC'nin %10 oranında da BDMC'nin ise %15 oranında da erken apoptoza gittiği gösterilmiştir. Sadece kurkumin-DMC-BDMC kombinasyonu yaklaşık %2 oranında düşük erken apoptoz oranı gösterirken diğer tüm kombinasyon gruplarını %20 oranında erken apoptotik özellik göstermektedir.



Şekil 4-15: A2780 Hücre Hattında 12h - 1 μ M Konsantrasyonda Apoptoz-Nekroz Tayini

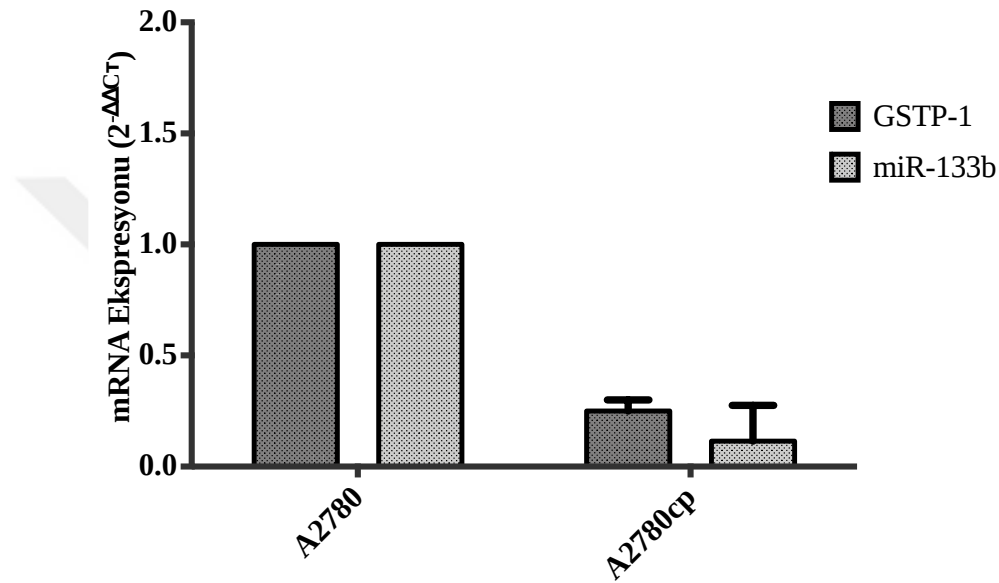


Şekil 4-16: A2780 Hücre Hattında Sisplatinli Kombinasyon Gruplarının 12h-1µM Konsantrasyonda Apoptoz-Nekroz Tayini

Over kanseri hücre hattında tekli ve kombinasyon gruplarının 1 µM doz ile 12. saat muamele sonrası Şekil 4-15 ile Şekil 4-16’da gösterildiği gibi neredeyse tüm gruplarda benzer oranda erken apoptoza gidiş izlenmiştir. A2780cp hücre hattından farklı olarak gruplar arası erken apoptotik oran A2780 hücre hattında ciddi farklılıklar göstermemektedir. Kontrol grubuna göre yaklaşık %20 oranında erken apoptoza gidiş izlenmiştir.

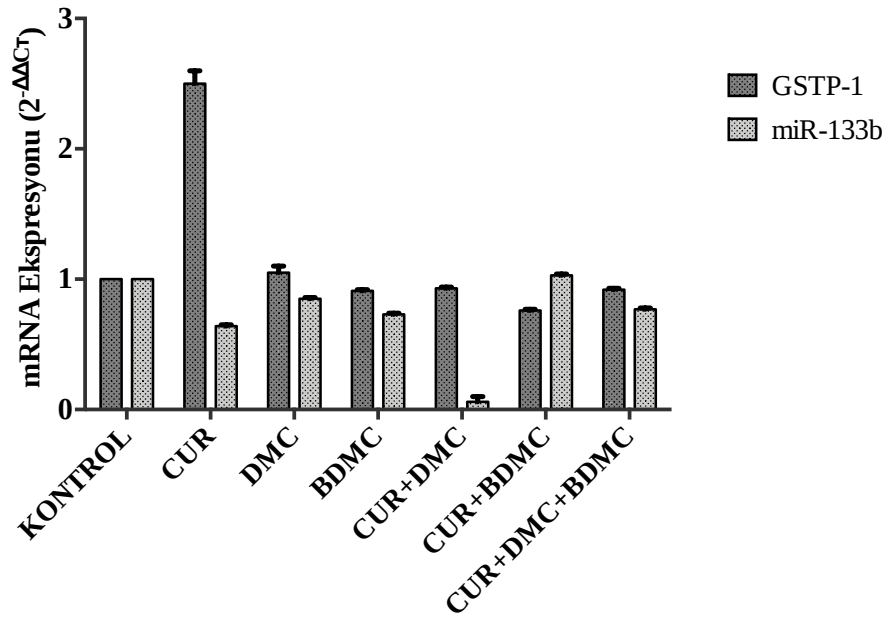
4.3. GSTP-1 ve miR-133b Genine İlişkin Real Time PCR Sonuçları

Direnç mekanizması ile ilişkilendirilen GSTP-1 geni ve miR-133b'nin sisplatine dirençli hücre hattı üzerinde tekli ve kombinasyon gruplarının 12.saatte 1 μ M doz uygulanmasının ardından Şekil 4-18 ile Şekil 4-19'da gen ekspresyonundaki kat değişiklikleri gösterilmiştir.



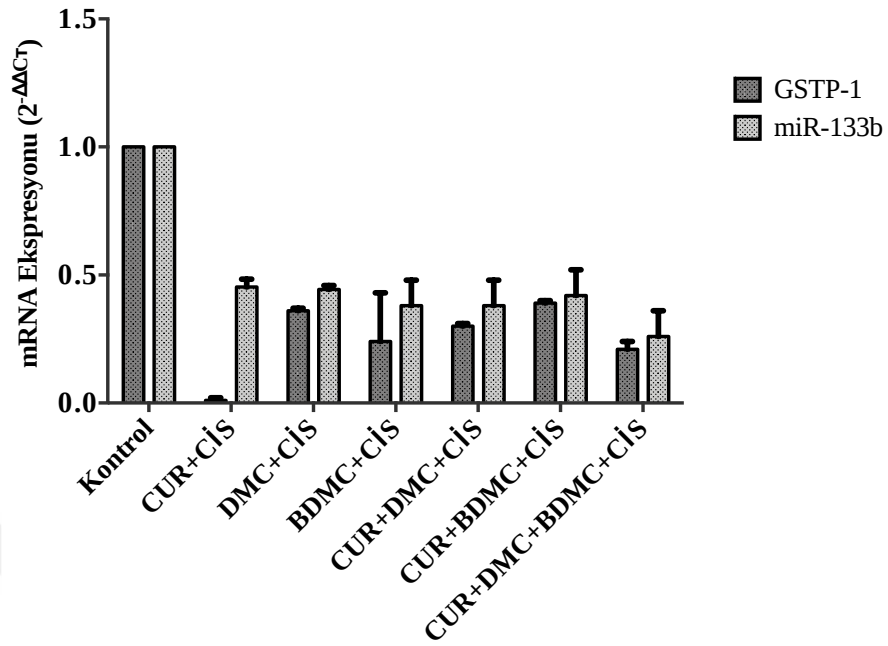
Şekil 4-17: A2780 ve A2780cp Hücre Hattında Herhangi Etken Madde Uygulaması Olmadan GSTP-1 ve miR-133b mRNA Ekspresyonundaki Kat Değişimleri

Over kanseri hücre hattı A2780 ile sisplatine dirençli over kanseri A2780cp hücre hattında kurkuminoidler ve sisplatin muamelesi olmadan Şekil 4-17'de ifade edildiği gibi GSTP-1 ve miR-133b ekspresyonu incelenmiştir. miR-133b'nin A2780cp hücre hattında 0,98 kat azalma izlenirken, GSTP-1 geninde 0,75 kat azalma izlenmiştir.



Şekil 4-18: A2780cp Hücre Hattında 12. Saat ve 1 µM Dozda Uygulama Sonrası GSTP-1 ile miR-133b'nin mRNA Ekspresyonundaki Kat Değişimleri

Sisplatine dirençli A2780cp hücre hattında kurkumin, DMC, BDMC ile sisplatin eklenmemiş ikili ve üçlü kombinasyonların Şekil 4-18'de gösterildiği gibi GSTP-1 ekspresyonlarına bakıldığında; kurkuminin tekli muamelesi sonrası GSTP-1 genindeki ekspresyon değişikliği herhangi bir madde uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1,5 kat arttırırken, DMC'nin tekli uygulanması 0,05 kat artışı ile sonuçlanmıştır. BDMC ise 0,09 katlık GSTP-1 geninin ekspresyonunda azalma göstermiştir. CUR+DMC, CUR+BDMC ve CUR+DMC+BDMC kombinasyonları ise sırası ile 0,07, 0,24, 0,08 kat GSTP-1 ekspresyonunda azalma izlenmiştir. miR-133b ekspresyonundaki değişikliklere baktığımızda ise kurkumin, DMC, BDMC ile muamele sonrası sırası ile kontrol grubuna göre 0,36, 0,15, 0,27 kat oranında ekspresyonda azalma izlenmiştir. Kombinasyon gruplarında ise CUR+DMC 0,94 kat azalma gösterirken CUR+DMC+BDMC 0,23 kat ekspresyonda azalma gösterir. CUR+BDMC muamele sonrası ise 0,03 katlık artış izlenmiştir.



Şekil 4-19: A2780cp Hücre Hattında 12. Saat ve 1 μ M Dozda Uygulama Sonrası GSTP-1 ile miR-133b'nin mRNA Ekspresyonundaki Kat Değişimleri

Sisplatine dirençli hücre hattı A2780cp sisplatin ile kombine edilmiş etken maddeler ise Şekil 4-19'da gösterildiği gibi ekspresyon düzeylerinde her iki gen içinde geçerli olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı kat düşüşleri izlenmiştir. CUR+CİS, DMC+CİS, BDMC+CİS kombinasyonları sırası ile GSTP-1 geninde 0,99, 0,64, 0,76 kat ekspresyonda anlamlı derecede azalma gösterirken ; miR-133b geninde ise sırası ile 0,54, 0,56, 0,62 kat azalma izlenmiştir. GSTP-1 geninde CUR+DMC+CİS, CUR+BDMC+CİS, CUR+DMC+BDMC+CİS kombinasyonlarının ekspresyondaki 0,30, 0,39, 0,21 kat azalma istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir. CUR+DMC+CİS, CUR+BDMC+CİS, CUR+DMC+BDMC+CİS kombinasyonlarının miR-133b geninde sırası ile 0,62, 0,58, 0,74 kat ekspresyonda azalma ile sonuçlanmıştır.

5. TARTIŞMA

Over kanseri erken evre de tanı konulmasını engelleyen spesifik belirtileri olmaması ve hastalığın seyrinin kötü olması sebebi ile en fazla ölüme neden olan jinekolojik kanser türüdür. Over kanserinin en ölümcül jinekolojik malignite kazanmasının önemli nedeni ise ilaç direçliliğinden kaynaklı hastalığın nüks etmesi ve etkili tedavi seçeneklerinin kısıtlanmış olmasıdır (114). Son yıllarda, doğal ürünler aynı anda birçok hedefe ulaşabildiği gibi direnç mekanizmaları ile ilişkili kemoterapötik ajanların düşük dozda etkinliğini arttırdığı için bu ürünlerin kemoterapötikler ile kombine edilerek kullanılmasına yönelik klinik çalışmalara başlanmıştır. Doğal bileşikler içinde curcuma longa bitkisinin rizomundan elde edilen polifenolik bileşikler; antioksidan, antitoksik, anti-enflamatuvar, antikanserojen, potansiyel kemoterapötik ve kemopreventif özelliklere sahip olmalarından dolayı en yaygın incelenen araştırma konularından biridir (115).

Polifenolik bileşiklerden kurkumin, DMC ve BDMC transkripsiyon faktörlerini, büyüme faktörlerini, sitokinleri, enzimleri ve diğer gen ürünlerini moleküler hedef olarak kullanarak çoklu sinyal yolları aracılığı ile aktivitelerini gerçekleştirirler. Kurkuminin Fankoni Anemisi/Meme Kanseri (BRCA) yolağını inhibe ederek CAO V3 ve SKOV3 over kanseri hücrelerini apoptoza indükleyerek sisplatine duyarlı hale getirmesi etki mekanizmasının nasıl geniş olduğuna dair örnek olabilmektedir. BRCA1 proteinin Fankoni yolağında önemli bir bileşen olduğu ve hatta BRCA1 proteinin kendisinin bir Fankoni anemi geni olduğu keşfedilmesi ile kalıtsal meme ve over kanseri hastalarında sıklıkla mutasyona uğrayan bu genin over kanserinde incelenmesi dikkat çekmiştir. Deborah Chirnomas ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada FANCD2 proteininin mono-ubikitinasyonunu inhibe ettiğini ve sonuç olarak apoptotik hücre ölümü yoluyla over kanseri hücre hatlarını sisplatine duyarlı hale getirdiğini göstermiştir. Kurkumin'in FA/BRCA yolağını inhibe ederek sisplatin duyarlılığını indüklemesi düşük dozda (5-10 µmol/L) sitotoksikite deneyleri ile gösterilmiştir (116). Bu çalışmalara ek olarak Nathan ve arkadaşları da kurkuminin sisplatine dirençli over kanseri hücre hatlarında hücre proliferasyonunun inhibisyonunu ve apoptoz yoluyla sisplatine duyarlı over kanseri gelişimini indüklediği gösterilmiştir. Aynı çalışma içerisinde kurkuminin G2/M fazını durdurarak, p53 fosforilasyonunu ve aktive

kaspaz-3 kaskadını ve ardından PAPR bozunmasını arttırdığı gösterilmiştir. Kurkumin'in ayrıca p38 mitojenle aktive olan protein kinazların (p38 MAPK) fosforilasyonunu arttırdığı ve AKT'nin fosforilasyonunu inhibe ettiği aynı çalışmada bulunmuştur (117). Ek olarak, bazı raporlar, kurkuminin, otolog IL-6 üretimini inhibe ederek over kanseri hücreleri CAO3 ve SKOV3'e karşı sisplatin duyarlı hale getirebileceğini göstermiştir (118).

Jiaojiao Zhao ve arkadaşları ise artemisinin türevi ve aktif metaboliti olan dihidroartemisinin (DHA) ile kurkuminin kombinasyonunun, over kanseri SKOV3 hücrelerinde sinerjik olarak hücre canlılığını azalttığını, hücre döngüsünü durdurduğunu ve hücre apoptozunu indüklediğini göstermiştir. DHA ile kurkuminin farklı konsantrasyonlarda SKOV3 over kanseri hücre hattı üzerinde antitümör etkilerini belirlemek için CCK-8 deneyi yapılmıştır. Hücre canlılığı üzerine etkisi incelendiğinde DHA ile kurkumin doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını inhibe ettiği, kombinasyon denemelerinde ise sinerjistik etki göstererek canlılığı önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. DHA ve kurkumin kombinasyonunun antitümör özelliklerini keşfetmek için yapılan hücre apoptozu deneyinde ise DHA veya kurkuminin tek başına tedavisinin SKOV3 hücrelerinde sınırlı apoptozu neden olduğu, DHA ve kurkuminin birlikte uygulanması geç apoptoz ile sonuçlanmıştır. Apoptoz ile ilişkili proteinlerin western-blot analizi yapıldığında ise, pro-apoptotik protein Bax'ın ekspresyon seviyesinin neredeyse değişmediğini, DHA ve kurkumin kombinasyonu ile muameleden sonra Bcl-2 aktivitesinin, etken maddelerin tek tek muamele edilmesi ve muamele edilmemiş kontrollere kıyasla belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. Aynı zamanda, geç apoptozun bir belirteci olan kaspaz-3'ün ekspresyonunda bir değişiklik izlenmemiş, DHA ile kurkuminin tekli yada kombinasyon halinde indüklenen hücre apoptozunun kaspaz-3 yolundan bağımsız olabileceği gösterilmiştir. Bu veriler birlikte ele alındığında, DHA ve kurkumin kombinasyonunun, özellikle ileri evre yaşlı hastalarda over kanserinin tedavisi için güçlü bir antikanser stratejisi olabileceğini göstermiştir (119).

Ayrıca Jing Zhang ve arkadaşlarının sisplatin dirençli over kanseri hücre hattı üzerinde yaptıkları çalışmada; mRNA, protein, uzun kodlanmayan RNA içeren eksozomlar gibi hücre dışı veziküllerin sisplatin dirençli A2780cp over kanseri hücre hattında salınabileceğini göstermişlerdir. Uzun kodlanmayan RNA'lar içinde en fazla

eksprese olan MEG3 proteini over kanseri hücre hatlarında ekspresyonunda düşüş izlenmiştir. Yapılan çalışmada, A2780cp over kanseri hücre hattı ile sisplatine duyarlı over kanseri hücre hattında hücre dışı veziküllerin farklı ekspresyonu gösterilerek direnç mekanizması ile ilişkilendirilmiştir. Ardından her iki hücre hattı 1 μ M 24 h'de kurkumin ile muamele edilmiş ve SKOV3, OVCAR-3 over hücre hatları da A2780cp ile A2780 hücre hatlarına dahil edilerek 1 μ M 36 h'de kurkumin muamelesi gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonuçlarına göre tüm hücre hatlarında MEG3 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. MEG3 proteini DNA metilasyonunda promoter olarak görev aldığı için metilasyonu inhibe edici ajan kullanılarak MEG3 proteinin ekspresyonu artmıştır, kurkumin sonrası sisplatin direncinin indüklenmesinde azalma izlenmiştir (120).

Kurkuma longa'nın kurkumin dışındaki etken maddelerinden biri olan BDMC ile yapılan çalışmada over kanserine karşı antikanser etkinliği gösterilmiştir. Haifeng Pei ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada çeşitli BDMC konsantrasyonları ile muamele sonrası 6 h, 12 h, 24 h'de over kanseri hücre hattı SKOV-3'ün proliferasyonu üzerine etkisi incelenmiştir. BDMC'nin doza ve zamana bağlı olarak anti-proliferatif etkisi belirlenerek 12 h'de 10 μ M doz uygulamasının over kanseri hücrelerinde %50 oranında proliferasyonları engellendiği gösterilmiştir (108).

Kurkumin'e benzer şekilde tümör hücrelerinde invazyon ve metastazın inhibisyon aktivitesine sahip olan DMC ise Yodkeeree S ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada adezyon molekülü olan ICAM-1 ve kemokin reseptör 4 (CXCR4)'ün ekspresyonunun regülasyonu ile MDA-MB-231 hücrelerinde invazyon ve metastaz inhibisyonu yaptığı bulunmuştur. Yapılan çalışmada; 24 saat boyunca 15 μ M DMC ile muamele edilen hücrelerin fibronektin ve laminine bağlanması sırasıyla %21 ve %44 oranında azalırken, 20 μ M DMC ile muamele edilen hücrelerde de ICAM-1 ve CXCR4'in protein seviyeleri anlamlı ölçüde azalmıştır (106). Son çalışmalar ile DMC'nin IRS2/PI3K/Akt yolağını baskılaması ile over kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada DMC ile muamele sonrası SKOV3 hücrelerinde miR-551a'nın ekspresyonunda artış izlenmiş olup, artan miR-551a ekspresyonunda over kanseri hücrelerinde proliferasyonu inhibe ederek, hücre apoptozu indüklenmiştir (110).

Yapılan bu çalışmalara ilave olarak tez projemiz kapsamında sisplatine dirençli over kanseri hücre hattı A2780cp ile sisplatine duyarlı hücre hattı A2780 üzerinde muamele edilen kurkumin, DMC ve BDMC'nin antikanserojenik ve antiproliferatif özellikleri geniş bir doz aralığı olan 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M'da ve 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h diliminde gösterebilmek amacıyla WST-1 testi yapılmıştır. Geniş doz ve zaman aralığının yanı sıra tekli ve kombine uygulanan 14 farklı deney grubu ile aynı anda çalışan başka bir çalışmanın olmaması tez projemiz için özgünlük oluşturmaktadır. Her iki hücre hattında da kurkumin, DMC, BDMC ile ikili ve üçlü kombinasyon gruplarının muamelesi hiç bir etken madde uygulanmayan kontrol grubuna karşı hücre canlılığında inhibisyon göstermiştir. Özellikle erken doz ve erken saat dilimi olan 1 μ M ve 12. saat de tüm gruplarda hücre proliferasyonu üzerine %50'ye yaklaşan inhibisyonlar izlenmiştir. A2780 hücre hattında ilk 6 saat sonrası hücre canlılığı yavaşça inhibe olmaya başlamış 12. saatde %50 inhibisyona yaklaşmışken, sisplatine dirençli over kanseri hücre hattında 6. saat sonrası 12. saate inkübasyonun ulaşması ile dramatik bir şekilde canlılık inhibe olmuştur. Her iki hücre hattında da tüm grupların hücre canlılığını inhibe ederek antikanser özellik göstermesi literatür ile uyumlu iken 1 μ M doz biriminde gösterilmesi ise farklılık kazandırmıştır (121). Ayrıca uygulanan etken maddeler gen düzeyinde neden oldukları değişiklikler ile sisplatin direncinin kırılmasını indükleyerek duyarlılığa neden olmuştur. Özellikle sisplatin ile kombine edilen gruplardaki gen ekspresyonundaki değişiklikler sisplatin direncinde doğal bileşiklerin yeri açısından önemli bir katkı sağlamıştır.

Hücre proliferasyon testinin ardından belirlenen 1 μ M doz ve 12. saat diliminde tüm gruplar ile Anneksin V-PI ile apoptoz deneyi gerçekleştirilmiş ve etken maddeler ile muamele sonrası dirençli ve duyarlı over kanseri hücre hattında erken apoptoz bulguları elde edilmiştir. Literatür ile uyumlu olarak kurkumin, DMC, BDMC'nin hücreler üzerinde erken apoptozu indüklediği gösterilirken, kombinasyon gruplarının da erken apoptoza hücreleri indüklediği tez çalışmamız doğrultusunda gösterilmiştir (122). Özellikle sisplatine dirençli hücre hattında sisplatin ile kombine edilen etken maddelerin A2780cp hücrelerini erken apoptoza iletmesi dirençlilik mekanizması ile apoptotik proteinler ilişkisinde yeni klinik çalışmalar gerektiğinin de öncüsü olmaktadır.

Çalışmamızda kurkumin ve analoglarının direnç mekanizmasına etkisini, glutatyon metabolizmasında yer alan GSTP-1 geni ve bu genin ilişkili olduğu miR-133b

üzerinden açıklamaktayız. Literatüre baktığımızda miR-133b; hücre proliferasyonu, apoptoz, migrasyon ve invazyonu modüle eden özellikle gastrik, mide ve kolon kanserlerinde downregüle olduğu gösterilmiş bir miRNA'dır. Chen ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada miR-133b'nin Bcl-w ve Akt-1 ekspresyonunu azaltarak mide kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonu ve apoptozu azalttığı gösterilmiştir (123). Guo ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada gastrik kanserde miR-133b'nin tümör supresör rolü olduğunu, hücre migrasyonunu ve metastazı arttıran bir protein olan Fascin Actin-Bundling Protein-1 (FSCN1)'in ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (124). Sonuç olarak miR-133b kanser proliferasyonu ve metastazında kritik bir role sahiptir. miR-133b'nin tümör oluşumundaki öneminin yanı sıra ilaç direncinde de potansiyel işlevi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Özellikle miR-133b ile GSTP-1'in sisplatin direnci ile ilişkisini Chen ve arkadaşları akciğer kanseri üzerinde göstermektedir. miR-133b sisplatine dirençli A549 ve H1299 akciğer kanseri hücre hattında dirençlilik göstermeyen akciğer kanseri hücre hattına kıyasla sırası ile 2,3 kat ve 3,5 kat ekspresyonda düşüş göstermektedir. Ayrıca GSTP-1 protein ekspresyonunun her iki sisplatin dirençli hücre hattında da up-regüle olduğu gösterilmiştir (98).

Tez projemiz kapsamında elde ettiğimiz gen ekspresyon sonuçları hem literatür uyumu ile hem de heyecan verici katkılarıyla over kanserinde dirençlilik mekanizmalarına dikkat çekmiştir. Sisplatine dirençli over kanseri A2780cp ile dirençlilik göstermeyen over kanseri hücre hattında A2780 miR-133b'nin gen ekspresyonu incelendiğinde literatür ile uyumlu olarak sisplatine dirençli hücre hattında 0,98 kat azalma izlenmiştir (125). Sisplatin ile kombine etken maddeler ile sisplatin olmadan tekli ve kombine etken maddelerin gen ekspresyonunda neden olduğu değişiklikler ise heyecan vericidir. Kurkumin, DMC ve BDMC'nin sisplatine dirençli hücre hattında tekli ve kombine uygulanması sonrası GSTP-1 geninde 0,07, 0,08, 0,15 ya da 0,27 katlık azalmaya neden olurken; etken maddelerin sisplatin ile kombine edilmesi GSTP-1 geninde 0,99, 0,76, 0,74 kat gibi daha fazla ekspresyonda düşmeye neden olmaktadır. Şekil 2.4'de over kanserinde Glutatyon S- Transferaz enzim ailesinin sisplatine tiyol grupları bağlayarak klor moleküllerinin bağlanmasını engellemesi ve direnç gelişimine neden olduğu gösterilmektedir. Dolayısıyla sisplatine dirençli hücre hattında sisplatin ve etken maddelerin kombinasyonları sonucu GSTP-1 ekspresyonunun azalması direnç gelişimini engellemiş olmakla birlikte validasyon için çok daha ileri klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak; sisplatine dirençli over kanserinde kurkumin ve analoglarının sisplatin ile kombine uygulanmasının ardından direnç mekanizmalarını aydınlatmak amacıyla GSTP-1 geni ile miR-133b ilişkisi açısından çalışmamız örnek teşkil etmekte ve özgünlük göstermektedir. miR-133b geninin, sisplatine dirençli over kanserinde ekspresyonun azalmış olması 2015 yılında Shuo Chen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada gösterilmiş ve elde ettiğimiz gen ekspresyonu çalışmamızda da konfirme edilmiştir (84). Sisplatine dirençli over kanserinde artmış GSTP-1'in ekspresyonunun hem kurkuminoidler ile muamele sonrası azalması hem de sisplatinle kombine edilmiş kurkuminodlerle belirgin azalması dirençliliği kırdığımızı istatistiksel olarak anlamlı sonuçlarımız ile desteklemektedir. Ancak miR-133b'nin etken maddeler ile muamele sonrası ekspresyonundaki düşüşün devam etmesini açıklamak için GSTP-1-miR-133b-sisplatin ilişkini açıklayacak fonksiyon çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Over kanserinde sisplatin direnci ile ilişkili GSTP-1 geninin hedef mikroRNA özelliği gösteren miR-133b'nin biyobelirteç olarak kullanılması için hem fonksiyon hemde protein çalışmalarını içeren geniş klinik araştırmalara ihtiyaç vardır.

Gelişen direnç mekanizmaları nedeni ile yüksek mortalite oranlarına sahip over kanserinin tedavisinde sisplatinle kombine kullanım da direnç gelişimini kırarak doğal bileşiklerin varlığı bu anlamda umut vericidir. Elde ettiğimiz sonuçlar içerisinde kombinasyon gruplarının dirençlilik ile ilişkisi göz önüne alındığında klinik kullanımda özellikle BDMC ve DMC ile zenginleştirilmiş preperatların gerekliliği sisplatin direnci gösteren over kanseri hastalarının tedavisi için alternatif bir yaklaşım sunmaktadır. Ancak böyle bir yaklaşımın in vivo ve klinik çalışmalar doğrultusunda elde edilecek sonuçlar ile desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Samuel P, Pink RC, Brooks SA, Carter DR. MiRNAs and ovarian cancer: A miRiad of mechanisms to induce cisplatin drug resistance. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2016;16(1):57–70.
2. Bookman MA. Can we predict who lives long with ovarian cancer? *Cancer.* 2019;125(S24):4578–81.
3. Arzuman L, Beale P, Yu JQ, Huq F. Synthesis of tris(quinoline)monochloroplatinum(II) chloride and its activity alone and in combination with capsaicin and kurkumin in human ovarian cancer cell lines. *Anticancer Res.* 2016;36(6):2809–18.
4. Evolution C. Ovarian Cancers : Genetic Abnormalities , Tumor. 2018;
5. Karnezis AN, Cho KR, Gilks CB, Pearce CL, Huntsman DG. The disparate origins of ovarian cancers : pathogenesis and prevention strategies. *Nat Publ Gr.*
6. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I. Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. 2018;394–424.
7. Facts C. Cancer Facts & Figures 2020. 2020;
8. Siegel RL, Miller KD. Cancer Statistics , 2020. 2020;70(1):7–30.
9. Mallen AR, Townsend MK, Tworoger SS. Risk Factors for Ovarian Carcinoma. 2020;32(2018):891–902.
10. Ovarian B. HHS Public Access. 2018;27(913):1–5.
11. Health B, Trust SC, Kingdom U. Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis. 2011;43(August):420–32.
12. Manuscript A, Origin T. NIH Public Access. 2011;34(3):433–43.
13. Shih I, Kurman RJ. Ovarian Tumorigenesis. *Am J Pathol* [Internet]. 2004;164(5):1511–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63708-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63708-X)
14. Kurman RJ. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. 2013;24(Supplement 10).
15. Lheureux S, Gourley C, Vergote I, Oza AM. Seminar Epithelial ovarian cancer. 2019;393.

16. Hennessey BT, Coleman RL, Markman M. Ovarian cancer. *Lancet* [Internet]. 2009;374(9698):1371–82. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61338-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61338-6)
17. Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA, Manchester GJ. Ovarian cancer. *Lancet* [Internet]. 2014;384(9951):1376–88. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62146-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62146-7)
18. Ko M, Kalloger SE, Sc B, Huntsman DG, Santos JL, Swenerton KD, et al. Differences in Tumor Type in Low-stage Versus High-stage Ovarian Carcinomas. 2010;203–11.
19. Labidi-galy SI, Papp E, Hallberg D, Niknafs N, Adleff V, Noe M, et al. in the fallopian tube. *Nat Commun* [Internet]. :1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-00962-1>
20. Gershenson DM, Sun CC, Lu KH, Coleman RL. Clinical Behavior of Stage II-IV Low-Grade Serous Carcinoma of the Ovary. 2006;108(2):11–3.
21. Ricciardi E, Ataseven B, Heitz F, Prader S, Bommert M, Schneider S, et al. Low-grade Serous Ovarian Carcinoma Low-grade seröse Ovarialkarzinome A key role for primary cytoreductive surgery in LGSOC. 2018;972–6.
22. Goulding EA, Simcock B, Mclachlan J, Griend R Van Der, Sykes P. Low-grade serous ovarian carcinoma: A comprehensive literature review. 2020;27–33.
23. Schmeler KM, Sun CC, Malpica A, Deavers MT, Bodurka DC, Gershenson DM. Gynecologic Oncology Low-grade serous primary peritoneal carcinoma ☆ , ☆☆. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2011;121(3):482–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.02.017>
24. Pearce CL, Templeman C, Rossing MA, Lee A, Near AM, Webb PM, et al. Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer : a pooled analysis of case – control studies. 2012;385–94.
25. Moro F, Magoga G, Pasciuto T, Mascilini F, Moruzzi MC. Imaging in gynecological disease (13): clinical and ultrasound characteristics of endometrioid ovarian cancer. 2018;(January):535–43.
26. Woodbeck R, Kelemen LE, Köbel M. Ovarian Endometrioid Carcinoma Misdiagnosed as Mucinous Carcinoma : An Underrecognized Problem. 2018;568–75.
27. Cybulska P, Da A, Paula C, Tseng J, Leitao MM, Bashashati A, et al.

- Gynecologic Oncology Molecular profiling and molecular classification of endometrioid ovarian carcinomas. 2019;154:516–23.
28. Mackenzie R, Kommoss S, Winterhoff BJ, Kipp BR, Garcia JJ, Voss J, et al. Targeted deep sequencing of mucinous ovarian tumors reveals multiple overlapping RAS-pathway activating mutations in borderline and cancerous neoplasms. ??? [Internet]. 2015;1–10. Available from: ???
 29. Mills AM, Shanes ED. M u c i n o u s O v a r i a n T u m o r s. Surg Pathol [Internet]. 2020;12(2):565–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.path.2019.01.008>
 30. Kossaï M, Scoazec J. Ovarian Cancer : A Heterogeneous Disease. 2018;41–9.
 31. Ryland GL, Hunter SM, Doyle MA, Rowley SM, Christie M, Allan PE, et al. RNF43 is a tumour suppressor gene mutated in mucinous tumours of the ovary. 2013;16:469–76.
 32. Kuroda T, Kohno T. Precision medicine for ovarian clear cell carcinoma based on gene alterations. Int J Clin Oncol [Internet]. 2020;25(3):419–24. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10147-020-01622-z>
 33. Mabuchi S, Sugiyama T, Kimura T. Clear cell carcinoma of the ovary : molecular insights and future therapeutic perspectives. 2016;27(3):1–14.
 34. Fujiwara K, Shintani D, Nishikawa T. symposium article Clear-cell carcinoma of the ovary. 10th Int Symp Adv Ovarian Cancer Optim Ther Updat 6 March 2015, Val Spain [Internet]. 2016;27(Supplement 1):i50–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdw086>
 35. Kamura T, Ph D, Kigawa J, Ph D, Terakawa N, Ph D, et al. Clinical Characteristics of Clear Cell Carcinoma of the Ovary A Distinct Histologic Type with Poor Prognosis and Resistance to Platinum- Based Chemotherapy. 2000;9–11.
 36. Gounaris I, Brenton JD. Molecular pathogenesis of ovarian clear cell carcinoma. 2015;11:1389–405.
 37. Kolin DL, Dinulescu DM, Crum CP. Origin of clear cell carcinoma: nature or nurture ? †. 2018;(January):131–4.
 38. O Ensuring early diagnosis. :5–9.
 39. Stewart C, Ralyea C, Ocn Ò, Lockwood S, Ocn Ò. Seminars in Oncology Nursing Ovarian Cancer: An Integrated Review. 2019;35:151–6.

40. Rooth C. treatment and management. 2013;22(17):23–30.
41. Hunn J, Rodriguez GC. Ovarian Cancer : Etiology , Risk Factors , and Epidemiology. 2012;55(1):3–23.
42. Women M, Collaborators S. Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. 2005;1543–51.
43. Lacey J V, Mink PJ, Lubin JH, Sherman ME, Troisi R, Hartge P, et al. and Risk of Ovarian Cancer. 2020;288(3).
44. Han KH, Kim M, Kim HS, Chung HH, Song YS. Protective Effect of Progesterone during Pregnancy against Ovarian Cancer. 2013;18(2).
45. Sung HK, Ma SH, Choi J, Hwang Y, Ahn C, Kim B, et al. The Effect of Breastfeeding Duration and Parity on the Risk of Epithelial Ovarian Cancer : A Systematic Review and Meta-analysis. 2016;349–66.
46. Menon U, Karpinskyj C. Ovarian Cancer Prevention and Screening. 2018;131(5):909–27.
47. Friebel TM, Domchek SM, Rebbeck TR. Modifiers of Cancer Risk in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers : Systematic Review and Meta-Analysis. 2014;
48. Manuscript A. NIH Public Access. 2014;20(3):415–29.
49. Ali AT. Fertility Drugs and Ovarian Cancer. 2018;567–76.
50. Ziegler D De, Borghese B, Chapron C. Endometriosis and infertility : pathophysiology and. Lancet [Internet]. 2010;376(9742):730–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60490-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60490-4)
51. Kim HS, Kim TH, Chung HH, Song YS. Risk and prognosis of ovarian cancer in women with endometriosis : a meta-analysis. 2014;(January):1878–90.
52. Veras A, Brilhante M, Augusto KL, Cavalcante M, Carlos L, Sucupira G, et al. Endometriosis and Ovarian Cancer : an Integrative Review (Endometriosis and Ovarian Cancer). 2017;XX:11–6.
53. Králíčková M, Simone A, Fabio L, Vaclav G. Endometriosis and risk of ovarian cancer : what do we know ? Arch Gynecol Obstet [Internet]. 2020;301(1):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00404-019-05358-8>
54. Peres LC, Risch H, Terry KL, Webb PM, Goodman MT, Wu AH, et al. Racial / ethnic differences in the epidemiology of ovarian cancer : a pooled analysis of 12 case-control studies. 2018;(December 2017):460–72.
55. Faber MT, Kjær SK, Dehlendorff C, Carney ME, Goodman MT, Ness RB, et al.

- Cigarette smoking and risk of ovarian cancer : a pooled analysis of 21 case – control studies. 2013;989–1004.
56. Webb PM, Leader G, Jordan SJ, Head T, Causes C. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology Epidemiology of epithelial ovarian cancer. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol [Internet]. 2017;41:3–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2016.08.006>
 57. Merritt MA, Poole EM, Tworoger SS. Dairy food and nutrient intake in different life periods in relation to risk of ovarian cancer. 2014;795–808.
 58. Guo H, Guo J, Xie W, Yuan L, Sheng X. The role of vitamin D in ovarian cancer : epidemiology , molecular mechanism and prevention. 2018;25:1–8.
 59. Zeppernick F, Meinhold-Heerlein I. The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer. Arch Gynecol Obstet. 2014;290(5):839–42.
 60. Javadi S, Ganeshan DM, Qayyum A, Iyer RB, Bhosale P. Ovarian Cancer, the Revised FIGO Staging System, and the Role of Imaging. 2016;(June):1–10.
 61. Ferreira MG, Magdalena P, Salas S De. Changes in the Management and Prognosis of Ovarian Cancer Due to the New FIGO and WHO Classifications A Case Series Observational Descriptive Study . Seven Years of Follow-up. 2018;28(8):1461–70.
 62. Heintz APM, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Benedet JL, Creasman WT, et al. Carcinoma of the Ovary. :161–92.
 63. Ayhan A, Gultekin M, Dursun P, Utku N, Aksan G, Guven S, et al. Metastatic lymph node number in epithelial ovarian carcinoma: Does it have any clinical significance? 2008;108:428–32.
 64. Prat J, Committee F. International Journal of Gynecology and Obstetrics Staging classification for cancer of the ovary , fallopian tube , and peritoneum ☆. Int J Gynecol Obstet [Internet]. 2014;124(1):1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijgo.2013.10.001>
 65. Brown DL. CORE CURRICULUM CME ARTICLE A Practical Approach to the Ultrasound Characterization of Adnexal Masses. 2007;23(2):87–105.
 66. Transvaginal_Sonographic_Characterization_of.14.pdf.
 67. Oram D, Fairbanks J, Turner J, Fros CI. A risk of malignancy index incorporating CA 125 , ultrasound and menopausal status for the accurate

- preoperative diagnosis of ovarian cancer. 1990;922–9.
68. Consultant ST, Consultant BH, Egil F, Lecturer S. Evaluation of a risk of malignancy index based on serum CA125 , ultrasound findings and menopausal status in the pre-operative diagnosis of pelvic masses. 1996;(August):826–31.
 69. Mitchell DG, Javitt MC, Glanc P, Bennett GL, Brown DL, Dubinsky T, et al. ACR Appropriateness Criteria Staging and Follow-up of Ovarian Cancer. JACR [Internet]. 2020;10(11):822–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacr.2013.07.017>
 70. Qayyum A, Coakley F V, Westphalen AC, Hricak H, Okuno WT, Powell B. Role of CT and MR imaging in predicting optimal cytoreduction of newly diagnosed primary epithelial ovarian cancer. 2005;96:301–6.
 71. Low RN, Barone RM, Lucero J. Comparison of MRI and CT for Predicting the Peritoneal Cancer Index (PCI) Preoperatively in Patients Being Considered for Cytoreductive Surgical Procedures. 2015;1708–15.
 72. Mc. 基因的改变 NIH Public Access. Bone. 2008;23(1):1–7.
 73. Hendrix, Abernethy, Sloane, Misuraca & M. 基因的改变 NIH Public Access. Bone. 2013;23(1):1–7.
 74. Nicholas Dias, Yung Peng RK. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. Physiol Behav. 2017;176(3):139–48.
 75. Tapia G, Diaz-Padill I. Molecular Mechanisms of Platinum Resistance in Ovarian Cancer. Ovarian Cancer - A Clin Transl Updat. 2013;
 76. Stewart DJ. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. Crit Rev Oncol Hematol. 2007;63(1):12–31.
 77. Stordal B, Davey M. Understanding cisplatin resistance using cellular models. IUBMB Life. 2007;59(11):696–9.
 78. Sun CY, Zhang QY, Zheng GJ, Feng B. Phytochemicals: Current strategy to sensitize cancer cells to cisplatin. Biomed Pharmacother [Internet]. 2019;110(December 2018):518–27. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.010>
 79. Kelland LR. Preclinical perspectives on platinum resistance. Drugs. 2000;59(SUPPL. 4):1–8.
 80. Itamochi H, Kigawa J, Terakawa N. Mechanisms of chemoresistance and poor prognosis in ovarian clear cell carcinoma. Cancer Sci. 2008;99(4):653–8.

81. Norouzi-Barough L, Sarookhani MR, Sharifi M, Moghbelinejad S, Jangjoo S, Salehi R. Molecular mechanisms of drug resistance in ovarian cancer. *J Cell Physiol.* 2018;233(6):4546–62.
82. Nunes SC, Serpa J. Glutathione in ovarian cancer: A double-edged sword. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7).
83. Sawers L, Ferguson MJ, Ihrig BR, Young HC, Chakravarty P, Wolf CR, et al. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) directly influences platinum drug chemosensitivity in ovarian tumour cell lines. *Br J Cancer* [Internet]. 2014;111(6):1150–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2014.386>
84. Chen S, Jiao JW, Sun KX, Zong ZH, Zhao Y. MicroRNA-133b targets glutathione S-transferase π expression to increase ovarian cancer cell sensitivity to chemotherapy drugs. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:5225–35.
85. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:51–88.
86. Tew KD. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res.* 2016;76(1):7–9.
87. De Luca A, Parker LJ, Ang WH, Rodolfo C, Gabbarini V, Hancock NC, et al. A structure-based mechanism of cisplatin resistance mediated by glutathione transferase P1-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(28):13943–51.
88. Siddik ZH. cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 2003;22(47 REV. ISS. 6):7265–79.
89. Pljesa I, Berisavac M, Simic T, Pekmezovic T, Coric V, Suvakov S, et al. Polymorphic expression of glutathione transferases A1, M1, P1 and T1 in epithelial ovarian cancer: A Serbian case-control study. *J BUON.* 2017;22(1):72–9.
90. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: Biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med.* 2014;20(8):460–9.
91. Acunzo M, Romano G, Wernicke D, Croce CM. MicroRNA and cancer - A brief overview. *Adv Biol Regul.* 2015;57:1–9.
92. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15524–9.

93. Takács E, Wojnárovits L. Kinetic study on the radiation-induced polymerization of HDDA and HDDMA. *Nucl Instruments Methods Phys Res Sect B Beam Interact with Mater Atoms*. 1997;131(1–4):295–9.
94. Spannuth WA, Schmandt R, Ph D, Urbauer D, Pennacchio LA, Ph D, et al. *new england journal*. 2010;
95. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(40):15805–10.
96. Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, Wang W, Nikitin AY. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res*. 2007;67(18):8433–8.
97. Zhu X, Li H, Long L, Hui L, Chen H, Wang X, et al. MiR-126 enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer cells to anticancer agents by targeting vascular endothelial growth factor A. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2012;44(6):519–26.
98. Lin C, Xie L, Lu Y, Hu Z, Chang J. MiR-133b reverses cisplatin resistance by targeting GSTP1 in cisplatin-resistant lung cancer cells. *Int J Mol Med*. 2018;41(4):2050–8.
99. Dorai T, Aggarwal BB. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett*. 2004;215(2):129–40.
100. Perrone D, Ardito F, Giannatempo G, Dioguardi M, Troiano G, Lo Russo L, et al. Biological and therapeutic activities, and anticancer properties of kurkumin (Review). *Exp Ther Med*. 2015;10(5):1615–23.
101. Aggarwal BB, Deb L, Prasad S. kurkumin differs from tetrahydrokurkumin for molecular targets, signaling pathways and cellular responses. *Molecules*. 2015;20(1):185–205.
102. Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of kurkumin, a major constituent of *Curcuma longa*: A review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev*. 2009;14(2):141–53.
103. Patel SS, Acharya A, Ray RS, Agrawal R, Raghuwanshi R, Jain P. Cellular and molecular mechanisms of kurkumin in prevention and treatment of disease. *Crit*

- Rev Food Sci Nutr. 2020;60(6):887–939.
104. Yodkeeree S, Chaiwangyen W, Garbisa S, Limtrakul P. kurkumin, demethoxykurkumin and bisdemethoxykurkumin differentially inhibit cancer cell invasion through the down-regulation of MMPs and uPA. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2009;20(2):87–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.12.003>
 105. Sandur SK, Pandey MK, Sung B, Ahn KS, Murakami A, Sethi G, et al. kurkumin, demethoxykurkumin, bisdemethoxykurkumin, tetrahydrokurkumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis*. 2007;28(8):1765–73.
 106. Yodkeeree S, Ampasavate C, Sung B, Aggarwal BB, Limtrakul P. Demethoxykurkumin suppresses migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cell line. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2010;627(1–3):8–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.09.052>
 107. Hatamipour M, Ramezani M, Tabassi SAS, Johnston TP, Ramezani M, Sahebkar A. Demethoxykurkumin: A naturally occurring kurkumin analogue with antitumor properties. *J Cell Physiol*. 2018;233(12):9247–60.
 108. Pei H, Yang Y, Cui L, Yang J, Li X, Yang Y, et al. Bisdemethoxykurkumin inhibits ovarian cancer via reducing oxidative stress mediated MMPs expressions. *Sci Rep*. 2016;6(February):1–8.
 109. Liu Z, Zhu YY, Li ZY, Ning SQ. Evaluation of the efficacy of paclitaxel with kurkumin combination in ovarian cancer cells. *Oncol Lett*. 2016;12(5):3944–8.
 110. Du Z, Sha X. Demethoxykurkumin inhibited human epithelia ovarian cancer cells' growth via up-regulating miR-551a. *Tumor Biol*. 2017;39(3):1–10.
 111. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
 112. Caruso F, Pettinari R, Rossi M, Monti E, Gariboldi MB, Marchetti F, et al. The in vitro antitumor activity of arene-ruthenium(II) kurkuminoid complexes improves when decreasing kurkumin polarity. *J Inorg Biochem* [Internet]. 2016;162:44–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.06.002>
 113. Seyed Hosseini E, Alizadeh Zarei M, Babashah S, Nakhaei Sistani R, Sadeghizadeh M, Haddad Kashani H, et al. Studies on combination of oxaliplatin

- and dendrosomal nanokurkumin on proliferation, apoptosis induction, and long non-coding RNA expression in ovarian cancer cells. *Cell Biol Toxicol*. 2019;35(3):247–66.
114. Seo J ah, Kim B, Dhanasekaran DN, Tsang BK, Song YS. kurkumin induces apoptosis by inhibiting sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase activity in ovarian cancer cells. *Cancer Lett* [Internet]. 2016;371(1):30–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.11.021>
 115. Johnson JJ, Mukhtar H. kurkumin for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Lett*. 2007;255(2):170–81.
 116. Chirnomas D, Taniguchi T, De La Vega M, Vaidya AP, Vasserman M, Hartman AR, et al. Chemosensitization to cisplatin by inhibitors of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(4):952–61.
 117. Weir NM, Selvendiran K, Kutala VK, Tong L, Rajaram M, Tridandapani S, et al. NIH Public Access. 2007;6(2):178–84.
 118. Chan MM, Fong D, Soprano KJ, Holmes WF, Heverling H. Inhibition of growth and sensitization to cisplatin-mediated killing of ovarian cancer cells by polyphenolic chemopreventive agents. *J Cell Physiol*. 2003;194(1):63–70.
 119. Zhao J, Pan Y, Li X, Zhang X, Xue Y, Wang T, et al. Dihydroartemisinin and kurkumin Synergistically Induce Apoptosis in SKOV3 Cells Via Upregulation of miR-124 Targeting Midkine. *Cell Physiol Biochem*. 2017;43(2):589–601.
 120. Zhang J, Liu J, Xu X, Li L. kurkumin suppresses cisplatin resistance development partly via modulating extracellular vesicle-mediated transfer of MEG3 and miR-214 in ovarian cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2017;79(3):479–87.
 121. Montopoli M, Ragazzi E, Frolidi G, Caparrotta L. Cell-cycle inhibition and apoptosis induced by kurkumin and cisplatin or oxaliplatin in human ovarian carcinoma cells. *Cell Prolif*. 2009;42(2):195–206.
 122. Press D. Codelivery of SH-aspirin and kurkumin by mPEG-PLGA nanoparticles enhanced antitumor activity by inducing mitochondrial apoptosis. 2015;5205–18.
 123. Chen X nan, Wang K feng, Xu Z qun, Li S jie, Liu Q, Fu D hui, et al. MiR-133b regulates bladder cancer cell proliferation and apoptosis by targeting Bcl-w and Akt1. *Cancer Cell Int*. 2014;14(1):1–11.
 124. Guo L, Bai H, Zou D, Hong T, Liu J, Huang J, et al. The role of microRNA-133b

- and its target gene FSCN1 in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2014;33(1):1–12.
125. Li D, Xia L, Chen M, Lin C, Wu H, Zhang Y, et al. miR-133b, a particular member of myomiRs, coming into playing its unique pathological role in human cancer. *Oncotarget*. 2017;8(30):50193–208.



HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

CURCUMİN VE ANALOGLARININ DİRENÇ MEKANİZMALARI
İLE İLİŞKİLİ ADAY GENLER VE MİRNA ÜZERİNE ETKİLERİNİN
OVER KANSERİ HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 7	% 6	% 3	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	% 1
2	www.pluriselect.com İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to Haliç Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
4	istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
6	dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
8	ri.ufs.br İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	ESİN	Soyadı	BAYRALI
Doğ.Yeri	İSTANBUL	Doğ.Tar.	16.06.1993
Email	esinbayrali@hotmail.com	Uyruğu	T.C

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp AD	2020
Lisans	Ege Üniversitesi	2016
Lise	Özel Cihangir Anadolu Lisesi	2011

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok İyi	İyi	İyi		70,01 (YDS)

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
ALES Puanı	67,95		

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):