

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

**PİTAVASTATİN SİTOTOKSİSİTESİNİN SERVİKS KANSER
HÜCRE (HELA) HATTINDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Aysun ÖKÇESİZ

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2018

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

**PİTAVASTATİN SİTOTOKSİSİTESİNİN SERVİKS KANSER
HÜCRE (HELA) HATTINDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Aysun ÖKÇESİZ

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT**

ANKARA

2018

ONAY SAYFASI**Pitavastatin Sitotoksitesinin Serviks Kanser Hücre (HeLa) Hattında****Değerlendirilmesi****Ecz. Aysun ÖKÇESİZ****Danışman: Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT**

Bu tez çalışması 13 Ağustos 2018 tarihinde jürimiz tarafından “Farmasötik Toksikoloji Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:*Prof. Dr. A. Nurşen BAŞARAN**Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi***Tez Danışmanı:***Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT**Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi***Üye:***Doç. Dr. Ü. Pınar ERKEKOĞLU**Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi***Üye:***Doç. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ**Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi***Üye:***Doç. Dr. Ayşe EKEN**Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi*

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

15 Ağustos 2018

*Prof. Dr. Diclehan Orhan***Enstitü Müdürü**

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezimin aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

15/08/2018



Aysun ÖKÇESİZ

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Ecz. Aysun ÖKÇESİZ

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi, sabır ve desteğini benden esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum danışman hocam Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT'a,

Her zaman desteklerini üzerimde hissettiğim Erciyes Üniversitesi F.Toksikoloji Anabilim Dalı'ndaki kıymetli hocalarım Doç. Dr. Ayşe EKEN, Dr. Öğr. Üyesi İ.İpek BOŞGELMEZ ve Dr. Öğr. Üyesi Burcu ÜNLÜ ENDİRLİK'e,

Tez deneylerim sırasında bilgi ve deneyimlerini paylaşarak destek olan değerli hocam Doç. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni yetiştiren, emeklerini esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi F.Toksikoloji Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma,

Çalışmam süresince bana destek olan Prof. Dr. İbrahim NARİN, Doç. Dr. Orhan PÜSKÜLLÜ ve Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem YÜCEL olmak üzere Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlık yönetimine,

Üzerimde emekleri bulunan değerli hocalarım Doç. Dr. Betül AYCAN ve Doç. Dr. Yeşim AKTAŞ olmak üzere Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ndeki tüm hocalarıma,

Çalışmam süresince bana destek olan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım araştırma görevlisi arkadaşlarım Uzm. Ecz. Tuğbagül ÇAL'a ve Ecz. Elçin BAKIR'a,

Dostlukları ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan desteklerini her zaman özveri ile gösteren Dr. Ecz. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN, Ecz. Uğur ARSLAN, Ecz. Ebru ÖZTÜRK, Uzm. Ecz. Dönay YUVALI, Dr. Ecz. Gökhan ÜNAL ile Hacettepe Üniversitesi ve Erciyes Üniversitesi'ndeki tüm araştırma görevlisi dostlarıma,

Ve doğduğum andan bugüne kadar beni özveriyle yetiştiren, maddi manevi bütün destekleri sağlayan, beni bu günlere getiren, her zaman yanımda olan canımdan çok sevdiğim annem, babam ve ağabeyime en içten duygularıyla teşekkür ederim.

ÖZET

Ökçesiz, A., Pitavastatin Sitotoksitesinin Serviks Kanser Hücre (HeLa) Hattında Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2018. Dünyada kadınlarda, en sık görülen kanser türlerinden biri serviks kanseridir. Serviks kanserinin olası tedavi yöntemlerinin araştırılması, bu hastalık süreci hakkındaki bilginin arttırılmasını sağlayarak hastalar için yeni, etkili tedavi seçeneklerinin keşfedilmesine yol açacaktır. Bundan dolayı bu tez çalışması kapsamında pitavastatinin insan serviks kanser hücre (HeLa) hattında antikanser etki potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca günümüzde serviks kanseri tedavisinde kullanılan sisplatinle pitavastatin kombinasyonunun olası sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Pitavastatin ve sisplatinin hücre canlılığına olan etkisi 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il) 2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) ve nötral kırmızı alım (NKA) yöntemleri ile belirlenmiş olup, farklı dozları 24, 48 ve 72 saatlik maruziyet sürelerinde temas ettirilmiş ve hücrelerin %50'sinin öldüğü inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca, HeLa hücresinde, pitavastatinin tek başına ve sisplatinle kombinasyonunun olası sitotoksik etkisi ilk kez bu tez çalışması ile ortaya konmuştur. MTT ve NKA yöntemlerinde pitavastatinin 2-200 μ M konsantrasyon aralığında HeLa hücrelerinde belirgin bir sitotoksik etkisinin olduğu ve sisplatinin ise artan doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı görülmüştür. Farklı dozlarda kombine pitavastatin ve sisplatin ile tedavi, tek başına uygulanmalarına kıyasla, önemli ölçüde proliferasyonun inhibisyonuna neden olmuştur. Elde edilen bulgular ışığında, pitavastatinin gerek tek başına gerekse sisplatin ile birlikte kombinasyonunun serviks kanser tedavisinde umut verici bir strateji olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kombine tedavi, Pitavastatin, Serviks Kanseri, Sisplatin, Sitotoksiste

ABSTRACT

Ökçesiz, A., Cytotoxic Evaluation of Pitavastatin in Cervical Cancer Cell (HeLa) Line, Hacettepe University Health Sciences Institute Master Thesis in Pharmaceutical Toxicology, Ankara, 2018. Cervical cancer which is one of the most common cancer types in women throughout the world. Investigation of possible and alternative treatment methods of cervical cancer will lead to the discovery of new effective treatment options for patients by increasing knowledge about progress of this disease. Therefore, the aim of this thesis is to investigate the potential anticancer effect of pitavastatin in human cervical cancer cell line (HeLa). In addition, the possible cytotoxic effect of the combination of pitavastatin and cisplatin, which is conventional cervical cancer treatment drug, was assessed. In this study the effect of pitavastatin and cisplatin in cell viability were determined via 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) test and neutral red uptake (NRU) assays. The action profiles of different concentrations on cell growth curves have been evaluated and the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values have been calculated. The possible cytotoxic effects of pitavastatin administered separately and in combination with cisplatin in HeLa cell line have been investigated by this thesis for the first time. It has been shown that pitavastatin has a marked cytotoxic effect in HeLa cells at a concentration range of 2 µM - 200 µM and cisplatin decreases cell viability due to increased dose by MTT and NRU assays. Treatment with combined pitavastatin and cisplatin at multiple doses resulted in significantly greater inhibition of proliferation than any other single dose. The findings suggest that, pitavastatin alone or in combination with cisplatin may be a promising strategy for cervical cancer treatment.

Key Words: Cervical Cancer, Cisplatin, Cytotoxicity, Combination therapy, Pitavastatin

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.2. Kanserin Tanımlayıcı Özellikleri	5
2.3. Hücre Döngüsü ve Karsinogenez	7
2.4. Kanser Teşhisi	8
2.5. Kanser Tedavisi	8
2.6. Serviks Kanseri	10
2.6.1. Servik Kanseri Tanısı	12
2.6.2. Kemoterapi ve Sisplatin	13
2.7. Kanser Hücre Hatları ve HeLa Hücre Hattı	17
2.8. Statinler	19
2.8.1. Kanser Tedavisinde Statinlerin Yeri	20
2.8.2. Pitavastatin	23
2.9. Sitotoksosite ve Sitotoksosite Belirleme Yöntemleri	24
2.9.1. Sitotoksosite Yöntemleri	25
2.10. NKA Yöntemi	27
2.11. 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	30
3.3. Hazırlanan Çözeltiler	31
3.3.1. Yapılan Analizlerde Kullanılan Pitavastatin Kalsiyum Çözeltileri	31
3.3.2. Sitotoksosite Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler	31
3.4. Yöntemler	32
3.4.1. HeLa Hücrelerinde NKA Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi	32
3.4.2. HeLa Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi	34
3.5. İstatistiksel Yöntemler	35
4. BULGULAR	36
4.1 Pitavastatinin HeLa Hücrelerinde 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	36
4.1.1. Pitavastatin ve Pitavastatin ile Sisplatinin Kombine Etkisinin 24 Saat Maruziyet Süresinde HeLa Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	37
4.1.2. Pitavastatin ve Pitavastatin ile Sisplatinin Kombine Etkisinin 48 Saat Maruziyet Süresinde HeLa Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	41
4.1.3. Pitavastatin ve Pitavastatin ile Sisplatinin Kombine Etkisinin 72 Saat Maruziyet Süresinde HeLa Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	45
4.2. Pitavastatinin HeLa Hücrelerinde NKA Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	48
4.2.1. Pitavastatin ve Pitavastatin ile Sisplatinin Kombine Etkisinin 24 Saat Maruziyet Süresinde HeLa Hücrelerinde NKA Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	49
4.2.2. Pitavastatin ve Pitavastatin ile Sisplatinin Kombine Etkisinin 48 Saat Maruziyet Süresinde HeLa Hücrelerinde NKA Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	53

4.2.3. Pitavastatin ve Pitavastatin ile Sisplatinin Kombine Etkisinin 72 Saat Maruziyet Süresinde HeLa Hücrelerinde NKA Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	57
4.3. MTT ve NKA Analiz Sonuçlarının Karşılaştırılması	60
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	67
7. KAYNAKLAR	68
8.EKLER	
EK-1. Orjinallik Ekran Çıktısı	
9. ÖZGEÇMİŞ	



SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Santigrat derece
μM	Mikromolar
ABT-737	4-{4-[(4'-kloro-2-bifenil)metil]-1-piperazinil}-N-[(4-{[(2R)-4-(dimetilamino)-1-(fenilsülfanil)-2-bütanil]amino}-3-nitrofenil)sülfonil]benzamid
Akt	Protein kinaz B
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
Asetil-CoA	Asetil-Koenzim A
ATCC	Amerikan tipi kültür koleksiyonu
CAOV3	Over kanser hücresi
Cmax	Maksimum plazma konsantrasyonu
CYP 2C8	Sitokrom P450 2C8
CYP 2C9	Sitokrom P450 2C9
CYP 3A4	Sitokrom P450 3A4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
E2F	Transkripsiyon faktörü
FBS	Yenidoğan Sığır Serum
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
HeLa	İnsan serviks adenokarsinoma hücresi
HepG2	İnsan hepatosellüler karsinoma hücresi
HIV	İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü
HMG CoA R	Hidroksimetil glutaril CoA redüktaz
HPV	İnsan papilloma virüsü
HSC-3	İnsan dili karsinoma hücre dizisi
Huh7	İnsan hepatosellüler karsinoma hücresi
IC ₅₀	Hücrelerin %50'sinin öldüğü inhibitör konsantrasyon
LDH	Laktat dehidrojenaz
LDL	Düşük molekül ağırlıklı lipoprotein

LY294002	Fosfoinozidit 3-kinaz inhibitörü
M.Ö.	Milattan önce
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NK	Nötral kırmızı
NKA	Nötral kırmızı alım
p53	Tümör protein 53
PI3K	Fosfoinozidit 3-kinaz
ROB	Reaktif oksijen bileşikleri
SKOV3	Over kanser hücresi
SRB	Sülforodamin B
t ½	Yarılma ömrü
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri hücresi
UGT1A3	Üridin 5' difosfat glukuroniltransferaz 1A3
UGT2B7	Üridin 5' difosfat glukuroniltransferaz 2B7
WST-1	2- (4-iyodofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-disülfofenil) -2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu
XTT	2,3-bis [2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil] -2H-tetrazolyum-5-karboksanilit

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Kanser hücrelerinin özellikleri.	6
2.2. Kadın üreme sistem.	10
2.3. Sisplatin kimyasal yapısı.	16
2.4. HeLa hücrelerinin mikroskopik görünümü.	18
2.5. Statinlerin mevalonat sentez basamağını inhibe etmesi.	19
2.6. Mevalonat yolağı.	22
2.7. Pitavastatin kalsiyum yapısı.	23
4.1. MTT yöntemine göre farklı konsantrasyonlarda pitavastatin ile 24 saat inkübe edilen HeLa hücrelerinin canlılık yüzdeleri.	38
4.2. MTT yöntemine göre pitavastatin ve pitavastatin + sisplatinin 24 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi.	39
4.3. Pitavastatin ve sisplatinin MTT yöntemine göre 24 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sinerjistik sitotoksik etkisi.	40
4.4. MTT yöntemine göre farklı konsantrasyonlarda pitavastatin ile 48 saat inkübe edilen HeLa hücrelerinin canlılık yüzdeleri.	42
4.5. MTT yöntemine göre pitavastatin ve pitavastatin + sisplatinin 48 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi.	43
4.6. Pitavastatin ve sisplatinin MTT yöntemine göre 48 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sinerjistik sitotoksik etkisi.	44
4.7. MTT yöntemine göre farklı konsantrasyonlarda pitavastatin ile 72 saat inkübe edilen HeLa hücrelerinin canlılık yüzdeleri.	46
4.8. MTT yöntemine göre pitavastatin ve pitavastatin + sisplatinin 72 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi.	47
4.9. Pitavastatin ve sisplatinin MTT yöntemine göre 72 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sinerjistik sitotoksik etkisi.	48
4.10. NKA yöntemine göre farklı konsantrasyonlarda pitavastatin ile 24 saat inkübe edilen HeLa hücrelerinin canlılık yüzdeleri.	50
4.11. NKA yöntemine göre pitavastatin ve pitavastatin + sisplatinin 24 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi.	51

4.12.	Pitavastatin ve sisplatinin NKA yöntemine göre 24 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sinerjistik sitotoksik etkisi.	52
4.13.	NKA yöntemine göre farklı konsantrasyonlarda pitavastatin ile 48 saat inkübe edilen HeLa hücrelerinin canlılık yüzdeleri.	54
4.14.	NKA yöntemine göre pitavastatin ve pitavastatin + sisplatinin 48 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi.	55
4.15.	Pitavastatin ve sisplatinin NKA yöntemine göre 48 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sinerjistik sitotoksik etkisi.	56
4.16.	NKA yöntemine göre farklı konsantrasyonlarda pitavastatin ile 72 saat inkübe edilen HeLa hücrelerinin canlılık yüzdeleri.	58
4.17.	NKA yöntemine göre pitavastatin ve pitavastatin + sisplatinin 72 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi.	59
4.18.	Pitavastatin ve sisplatinin NKA yöntemine göre 72 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sinerjistik sitotoksik etkisi.	60

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Bazı kemoterapötikler ve onay yılları.	14
2.2. Statinlerin özellikleri.	20
4.1. MTT yöntemine göre pitavastatinin ve pitavastatin + sisplatinin 24 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi.	37
4.2. MTT yöntemine göre pitavastatinin ve pitavastatin + sisplatinin 48 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi.	41
4.3. MTT yöntemine göre pitavastatinin ve pitavastatin + sisplatinin 72 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi.	45
4.4. NKA yöntemine göre pitavastatinin ve pitavastatin + sisplatinin 24 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi.	49
4.5. NKA yöntemine göre pitavastatinin ve pitavastatin + sisplatinin 48 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi.	53
4.6. NKA yöntemine göre pitavastatinin ve pitavastatin + sisplatinin 72 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi.	57

1. GİRİŞ

Servikal kanser (rahim ağzı kanseri), dünyada kadınlar arasında görülen en yaygın ikinci kanserdir (1). Dünya genelinde yılda yaklaşık 500.000 kişi serviks kanser tanısı almakta olup 274.000 kişi bu hastalık sebebiyle yaşamını yitirmektedir. Görülme sıklığında belirgin bir artış kaydedilen serviks kanserinin ortalama görülme yaşı 52'dir. Serviks kanseri görülme sıklığı açısından Türk popülasyonunda onuncu sırada yer almaktadır (2). Servikal kanserin tedavisinde günümüzde kullanılan ilaçlar genellikle çok toksiktir ve ciddi yan etkilere neden olmaktadır. Bu durum da kanser tedavisi sırasında hastaya zarar vererek hayatta kalma şansını azaltmaktadır. Bu nedenle güvenli, etkili ve düşük toksisiteye sahip antikanser ilacın belirlenmesi araştırmacıların ilgisini çekmektedir (3).

Hidroksimetil glutaril CoA (HMG-CoA) redüktaz inhibitörlerinin (statinler) kardiyovasküler alandaki yararlı etkileri iyi bilinmesine rağmen, olası antikanser özellikleri son zamanlarda önem kazanmıştır (4). Statinler, kanser hücrelerinde yeni damar oluşumunun inhibisyonu, kemoterapötik ajanlara karşı direncin azaltılması ve apoptozun indüklenmesi ile birlikte antioksidan ve antienflamatuar özellikleri nedeniyle antitümör etkilere sahiptir. Mevcut çabalar, kanser tedavisinde statinlerden terapötik faydalar sağlamaya yönelik olduğundan, statinlerin farklı kanser türlerinde bir adjuvan ajan olarak kullanılması son derece önemlidir (5).

Statin ailesinde yer alan pitavastatinin, karaciğer, cilt, kolon, pankreas, kolon ve over kanser hücrelerinde sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği çalışmalar literatürde yer almaktadır. Ayrıca, yapılan bazı çalışmalarda çoklu ilaç direncine sahip tümör hücrelerinde, pitavastatinin kemoterapötik ilaçlarla kombine halde verilmesinin ilaç direncini aşmada etkili olduğu tespit edilmiştir (6-10). Serviks kanserinde pitavastatinin etkili olup olmadığının araştırılması tedavide yeni terapötik stratejiler belirlenmesine yardımcı olacaktır.

İlerlemiş veya tekrarlayan metastatik hastalıklarda, statinlerin sitotoksik veya yeni moleküler hedefli ajanlarla birlikte özellikle kombinasyon halinde verilmesi halinde klinik öncesi modellerde etkili olma olasılığı daha yüksektir (4). Kombine tedavinin, ilaç toksisitesi ve ilaç kaynaklı direnci yenmek için kanserde en etkili tedavi stratejisi olduğu düşünülmektedir (11).

Yukarıda bahsedilen bilgiler doğrultusunda, bu tez çalışması kapsamında, pitavastatinin tek başına ve servikal kanser tedavisinde kullanılan bir antikanser ilaç olan sisplatin ile kombine halde serviks kanser hücre (HeLa) hattındaki olası sitotoksik etkisinin 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve nötral kırmızı alım (NKA) yöntemleriyle değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, genetik ve çevresel koşulların etkisi altında hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Bilinen yüzden fazla kanser türü vardır (12). Dünyada her yıl yaklaşık on bir milyon kişi kansere yakalanmaktadır. Halen 25 milyon kanser hastasının var olduğu düşünülmektedir. Dünya genelinde ölüm nedenlerinin % 12,5'inin kanser kaynaklı olduğu bilinmektedir. Türkiye'de tıpkı dünyada olduğu gibi kanserin kalp hastalıklarından sonra ikinci ölümcül nedeni olduğu bilinmektedir (13). Kanser belli türleri için olabildiğince standart yaklaşımlar geliştirilmesine rağmen; kanser kişisel bir hastalıktır (12). Ayrıca kanser, sık görülmesi ve başlıca ölüm nedenlerinden biri olması sebebiyle beraberinde getirdiği sosyal ve ekonomik yük ile de toplumun bir sorunu olarak düşünülmektedir (14). Kanser temelinin kanser hücreleri oluşturur (15). Kanser hücrelerinin oluşumu trilyonlarca hücreden oluşan insan vücudunda herhangi bir bölgeden başlayabilir. Sağlıklı hücreler, vücudun ihtiyaç duyduğu gibi yeni hücreler oluşturmak için büyür ve bölünür. Hücreler yaşlandıkça veya hasar gördüklerinde ölür ve yerini yeni hücreler alır. Ancak kanser geliştiğinde, düzenli süreç bozulur ve ihtiyaç duyulmadığı halde yeni hücreler oluşur. Oluşan yeni hücreler sürekli ve kontrolsüz bölünür, tümör oluşumu başlar ve ilerler (15, 16). Kanser hücreleri, sağlıklı hücrelerden farklı olarak gerekli büyüme faktörlerine gereksinim duymadığından hücrenin normal büyüme sınırına uymazlar. Kanser hücreleri, normal hücrelere göre birbirlerine daha az tutundukları için dokular arasında dolaşma eğilimleri gösterdiklerinden kan dolaşımına girerek bütün vücuda dağılırlar (17). Bu büyüme, komşu dokularda değişikliğe neden olan ya da komşu dokuları yok eden çeşitli enzim ve sitokinler tarafından kolaylaştırılır. Hücre büyümesi arttığı için yüzey alanının yetersizliğinden dolayı, hücrenin daha fazla büyümesini sağlayan bağımsız bir vasküler destek oluşumu olan tümör anjiyogenez faktörleri üretilir (18). Üretilen bu anjiyogenik faktörlerle sınırsız ve yüksek oranda çoğalmayı sürdürmek isteyen kanser hücresinin yeterli besin ve oksijen ihtiyacı karşılanmış olur (19). Böylece, kanser hücreleri diğer hücrelerden histopatolojik

anlamda farklılaşma, proliferasyon, vaskülarite, enflamasyon ve/veya invazivlik gibi çeşitli farklılıklar içerir (15).

Kanser gelişimine çok çeşitli kaynaklar sebep olmaktadır. Bakteriler, virüsler, kimyasallara maruziyet, iyonize radyasyon, aşırı reaktif oksijen bileşiklerinin (ROB) üretimi ve kalıtım gibi birçok faktörler kanser gelişimine neden olmaktadır. Kanser gelişimine neden olan bakteri ve virüsler arasında genellikle midede bulunan bir bakteri olan *Helicobacter pylori*, T hücreli lösemi virüsü, servikal kanserin başlıca etiyolojik faktörü olan human papilloma virüsü (HPV) sayılabilir. Çevremizde maruz kaldığımız birçok kimyasal kansere sebep olmaktadır (20-22).

Kanser oluşumuna sebep olan kaynaklardan biri olduğu düşünülen ROB'un aşırı üretiminin, epidemiyolojik ve deneysel çalışmalarda hücre içi homeostazda değişikliklere yol açabileceği bildirilmiştir. Hücre içindeki oksidanların fazlalığının, antioksidan savunma ve/veya DNA onarımı mekanizmaları ile dengelenmediğinde hücrelerin önemli bileşenlerine zarar verebileceği gösterilmiştir (23). ROB'un kanser oluşumuna yol açtığına dair ciddi bulgular bulunmaktadır (22). Çevresel, hormonal ve viral ilişkili kansere sebep olan faktörler, ROB üretilmesi yoluyla oksidatif stresle kuvvetle ilişkilidir. ROB'lar, vücutta serbest radikalleri artıran ve çevresel uyarıcılar gibi doku hasarına yol açan doğal süreçler sonucu oluşmaktadırlar. İyonize radyasyon, hipoksi, sigara içimi, alkol tüketimi gibi ROB üretimini artıran çevresel faktörlere örnek verilebilir. ROB, karsinogen aktivasyonuna aracılık eden, DNA hasarına neden olan ve DNA hasarına müdahale eden karsinogenezin başlangıç aşamasında birçok etkiye sahiptir. Kanser hücreleri normal hücrelere kıyasla daha yüksek ROB seviyeleri sergilerler. Artan antioksidan savunma ile, kanser hücreleri içindeki oksidatif durum dengelendiğinden, yüksek ROB düzeylerinin çeşitli mekanizmalar yoluyla karsinogenezi önleyebileceği öne sürülmektedir (23).

Bununla birlikte, DNA dizisinde küçük bir değişiklik oluşabilecek bir mutasyon sonucunda kanser gelişimi de başlayabilir. Mutasyonun hücrenin büyümesi ve çoğalmasını kontrol eden genlerin hasarlanması ya da anormal bir şekilde aktive olması sonucunda ortaya çıktığı belirtilmiştir (24, 25). Sağlıklı hücreler, bu tür hasarı onaracak şekilde evrimleşmiş olsa da, çeşitli nedenlerden ötürü hatalar meydana gelir ve genomdaki sürekli değişiklikler sonucu mutasyonlar ortaya çıkar (19). Yaşamı

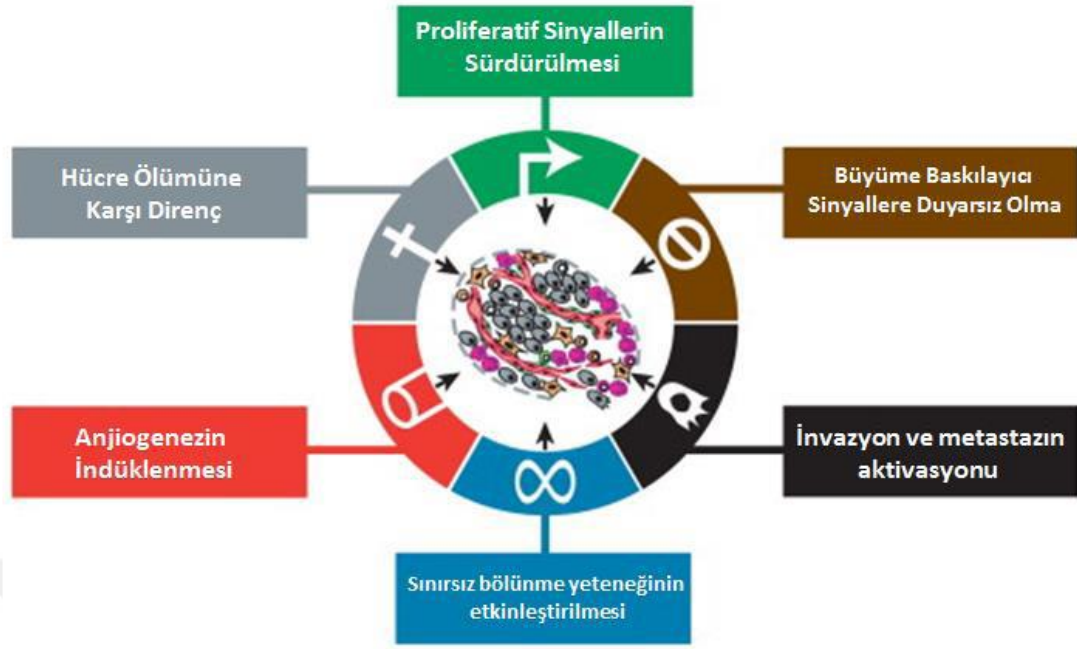
boyunca mutajenlere maruz kalmakta olan insanın DNA'sında meydana gelen bu hafif değişiklikler replikasyon hatalarına neden olur. Bazen, bu somatik mutasyonlardan biri, meydana geldiği hücrede büyümeyi sağlayan kritik bir genin işlevini değiştirir. İlgili hedef genlerdeki ek mutasyonlar, çevre dokuları istila eden ve metastaz yapan hücreler üretir (26). Kansere neden olan bu mutasyonların büyük çoğunluğu kalıtsal değildir, ancak DNA'ya kimyasal zarar verir ve bunun bir sonucu olarak ortaya çıkar. Bu mutasyonlar hayati anlamda önemli olan genlerin fonksiyonlarının değiştirilmesine yol açmaktadır (19).

2.2. Kanserın Tanımlayıcı Özellikleri

Hanahan ve Weinberg (27) kanserin tanımlayıcı özellikleri arasında;

- Proliferatif sinyallerin sürdürülmesi,
- Büyüme baskılayıcı sinyallere duyarsız olma,
- Hücre ölümüne karşı direnç,
- Sınırsız bölünme yeteneğinin etkinleştirilmesi,
- Anjiyogenezin indüklenmesi,
- İnvazyon ve metastaza yer vermiştir.

Bu tanımlayıcı özelliklerin şematize şekli aşağıda verilmiştir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin özellikleri (27).

Colotta ve ark. (28) 2009 yılında enflamasyonun kanser riskini artırdığını belirtmişlerdir. Buna göre enflamasyonun, epidemiyolojik olarak enflamasyon ile ilgili olmayan tümörlerin mikroortamında da mevcut olacağı belirtilmiş olup son çalışmalarda, enflamasyonu ve kanseri birbirine bağlayan moleküler yolların var olduğu gösterilmiştir. Tümör mikroçevresinde, enflamasyon malign hücrelerin proliferasyonuna ve hayatta kalmasına, anjiyogenez ve metastaza, adaptif immünitinin yıkılmasına, hormonlara ve kemoterapötik ajanlara verilen yanıtın azalmasına neden olmaktadır. Son veriler, kanserle ilişkili enflamasyonda yer alan ek bir mekanizmanın, kanser hücrelerinde rastgele genetik değişikliklere neden olarak inflamatuvar mediyatörlerin genetik değişikliği indüklediğini düşündürmektedir. Kanser tanımlayıcı altı özelliğini belirleyen Hanahan ve Weinberg'e katkı olarak enflamasyonun kanserle ilişkili yedinci özelliği temsil ettiği gösterilmiştir.

2011 yılında ise Hanahan ve Weinberg tarafından belirlenen kanserin bu altı özelliği revize edilerek enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve bağışıklık sistemine direnç olmak üzere iki yeni ayırt edici gösterge eklenmiştir: Kanser hücrelerinde enerji metabolizmasının yeniden programlanması ilk olarak Nobel Ödülü'nü kazanan Otto Warburg tarafından 1920'lerde tanımlanmıştır. Bu olay, normal aerobik koşullar altında bile tümör hücrelerinde gelişmiş glikoliz

anlamına gelir. Bu bulgunun yaygınlığı, Warburg'un hipotezinin formülasyonundan hemen hemen bir asır sonra, klinik onkologların, metastazları saptamak için kanser hücrelerinin artan glikoz alımından faydalanmalarıyla kanıtlanmıştır. Yeniden programlanmış kanser hücresi metabolizmasının özellikleri arasında enerji gereksinimlerini aerobik glikoliz ile tedarik etmek için, tümör hücrelerinde glikozun hızlı bir şekilde mitokondriye girdiği ve Krebs döngüsüne dahil olduğu ve asetil-Koenzim A (asetil-CoA)'ya okside edilen piruvat içine dönüştürüldüğüne yer verilmiştir. Ayrıca, kanser hücrelerinde hücre büyümesi ve çoğalması için bir yapı taşı olarak işlev gören asetil-CoA'nın sitoplazmaya salımı artmıştır. Bu şekilde, asetil-CoA mevalonat metabolizması için giderek daha fazla kullanılabilir hale gelmektedir (29).

2.3. Hücre Döngüsü ve Karsinogenez

Hücre homeostazı hücre çoğalması, büyümenin sona erdirilmesi ve apoptoz ile sağlanır. Hücrenin çoğalması ve hücre siklusunun ilerlemesi büyüme ile yakından ilişkilidir (30). Bir hücrenin bölünmeye başlamasıyla, takip eden diğer hücre bölünmesine dek geçen sürede, hücrede meydana gelen geçici morfolojik değişikliklerin ve biyokimyasal aktivitelerin görüldüğü sürece hücre döngüsü denir (31). Hücre döngüsünün oldukça kısa bir evresinde bölünme gerçekleşir. Döngünün geri kalan kısmı yani iki bölünme arasında kalan aralık interfaz olarak adlandırılır. Hücrenin aktif olduğu bu evre DNA'nın replike edildiği (S), sentez fazından önceki (G_1) ve sonrasındaki faz (G_2) olmak üzere 3 fazı meydana getirir. G_1 fazında aktif olarak büyüme gerçekleştikten sonra S evresinde gerekli enzimler sentezlenir ve DNA replikasyonundan sonra G_2 fazında bölünme için gerekli hazırlıklar yapılarak bölünme evresinin sonunda (M) hücre siklusu tamamlanmış olur (32). Bu siklusta hücrenin uyarılması ve büyüme gerçekleşir ve mitozdan sonra hücre döngüden çıkarak dinlenme fazı olan G fazında bekler. Hücre döngüsünde çeşitli kontrol noktalarında siklusun devam edip etmeyeceğine karar verilir. Bu kontrol geçişleri G_1 -S geçişinde, G_2 -M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde bulunur. Döngü içindeki olayları kontrol altında tutan çok sayıda ve kompleks etkileşimler mevcuttur. Hücre bölünmesinin kontrolünün bozulmasını, bu siklusun düzenlenmesindeki

hatalar oluşturur. Belirtilen kontrol noktalarında meydana gelen değişimler kanserin oluşumu ile sonuçlanabilir (30).

Bir vücut hücresinin genetik ve epigenetik değişimler sonrası kanser hücresine dönüşüm aşamalarının bütünü ise karsinogenez olarak tanımlanmaktadır. Etiyopatogenezinde birçok faktörün olduğu genetik hasarın bir şekilde başlaması, tümör baskılayıcı genler ve protoonkogenlerin rol oynayarak, bir dizi genetik ve moleküler değişiklik sonrası, geri dönüşsüz aşamaya geçiş ve sonunda organizmanın kanser hücreleri ile karşı karşıya geliş halen tam olarak aydınlatılamamış aktif bir süreçtir. Karsinogenezi çevresel toksik maddeler, beslenme bozuklukları, iyonize radyasyon, immün sistem anomalileri gibi faktörler başlatabilmektedir. Son yıllarda mikrobiyotanın da multifaktöriyel karsinogenez aşamalarında aktif bir şekilde rol aldığı gösterilmiştir (33).

2.4. Kanser Teşhisi

Kanser teşhisinin daha erken aşamada ortaya konması ile hayatta kalma ve hasta memnuniyeti olumlu yönde sonuçlanır. Kanser tanılarının çoğu detaylı anamnez ve fizik muayenenin ardından yapılır. Kanser erken teşhisini sağlayabilmek için muhtemel kanser belirtilerini gösteren semptomları takip ve hastaların tıbbi yardım alması halk sağlığı açısından oldukça önemlidir (34).

2.5. Kanser Tedavisi

Günümüzde, kanser dünya çapında önemli bir sağlık sorunu olup sistemik tedavi, kanserin ortadan kaldırılması için en önemli faktörlerdendir (35). Kanser oluşumunda çoklu mekanizmalar etkili olduğundan kanserin tedavisinde, kanserin cinsi, tümörün bulunduğu yer ve gelişimi, tedavinin seyri gibi faktörlere göre tedavi yöntemleri uygulanmaktadır (36). Uygulanan bu tedavi yöntemleri arasında bulunan cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi tek başlarına ya da kombinasyonları şeklinde uygulanmaktadır. Cerrahide amaç tümörlü doku veya organın uzaklaştırılması iken kemoterapi ve radyoterapide ise amaç kanser hücrelerinin öldürülmesidir (37). Genellikle tümörü tamamen yok etmeyi amaçlayan cerrahi yöntemler, özellikle erken evrede olan iyi huylu tümörlerde ilk seçenektir (36).

Kanser tedavisinde kullanılan antikanser ilaçların çoğu sitotoksik etkileri sonucunda malign hücrelerin büyüme ve çoğalmalarını önleyerek onların ölümüne

yol açarlar (37). Hücre ölümünün meydana gelebileceği farklı yolların tanımlanması, kanser hücrelerinin ölümüne ve tedavi için hedeflerin tespit edildiği mekanizmalara ışık tutmaktadır (38). Hücre ölümüne yol açan temelde apoptoz, otofaji, nekroz ve mitotik katastrof olmak üzere dört çeşit dinamik hücreysel aktivite tanımlanmıştır. Yaşlanma bir tür fizyolojik hücre ölümü olarak kabul edilir. Bu süreçlerden apoptoz ve otofajinin, “programlanmış” olduğu düşünülmektedir. Nekroz ve mitotik katastrof genellikle büyük hücreysel olaylara pasif yanıt olarak kabul edilir. Ancak, yeni bulgular bu ölüm türlerinin de genetik olarak kontrol edilebileceğini göstermektedir (39).

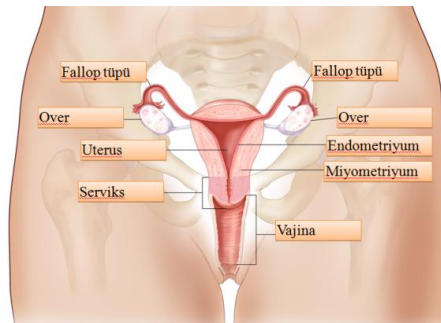
Hücre ölümüne yol açan dinamiklerden ilki olan apoptoz, plazma membranı vezikülasyonu, nükleer kondansasyon ve DNA fragmentasyonu ile programlanmış veya kontrollü hücre ölümü ile karakterizedir. Bu morfolojik değişiklikler, fosfatidilserin ve kalretikulin gibi moleküllerin, ölmekte olan hücrelerin yüzeyine temas etmesi ile ilişkilidir ve çoğu zaman hücrenin bir enflamatuar yanıt ortaya çıkarmadan komşu fagositik hücreler tarafından tanınmasına ve yutulmasına izin vermektedir. Apoptotik ölüm, aktif sisteinil aspartil-yönlendirici proteazlar veya kaspazlar olarak bilinen yapısal olarak ilişkili hücre içi proteazların bir ailesi tarafından gerçekleştirilmektedir (38). Apoptoz moleküler düzeyde giderek daha iyi tanımlanmasının rağmen, nekroz kontrol edilemeyen ve patolojik olan bir hücre ölümü olarak gösterilmektedir. Bununla birlikte, son çalışmalar nekrozun çoklu gelişimsel, fizyolojik ve patolojik durumlarda yer alabilecek düzenlenmiş bir olay olduğunu da göstermektedir (39). Bu nedenle, apoptoza benzer şekilde nekrozun, programlanmış hücre ölümü olduğu ileri sürülmektedir. Ancak, tüm vücut için apoptoz ve nekrozun fizyolojik sonuçları oldukça farklıdır. Apoptozu gerçekleştiren hücrenin ortadan kaldırılması, vücut tarafından neredeyse hiç fark edilmeden gerçekleşir. Nekrozda ise hücre içi boşluğa salınan sitoplazmik içerik, inflammatuar bir yanıt, yani yerleşik fagositlerin aktivasyonuna ve nekroz bölgesine lökositlerin çekilmesine neden olur. Nekrotik hücre yıkımı patofizyolojik koşullar altında gerçekleşir (40). Otofaji hücrelerin sitoplazmayı geri dönüştürme ve fazla veya kusurlu organelleri yok etme süreci olarak tanımlanabilir. Otofaji, çoğu dokuda bazal seviyelerde görülür ve sitoplazmik bileşenlerin rutin döngüsüne katkıda bulunur. Ancak, otofaji besin tükenmesi gibi çevresel koşulların değişmesiyle tetiklenebilir.

Kanser gibi bazı hastalıklarda rol oynayan otofaji; paradoksal olarak, hücrelerin korunmasına hizmet edebilirken aynı zamanda hücre hasarına da neden olabilir. Otofaji kanseri baskılayabilirken; daha sonra tümör büyüdükçe, kanser hücrelerinin besin sınırlayıcı ve düşük oksijen koşullarında hayatta kalması için destek de olabilir (41). Mitotik katastrof ise kardeş kromatit ayrılması sırasında uygunsuz kromozom ayrılmasından kaynaklanan anormal mitozu içeren bir süreçtir. Genel olarak, bir ölüm şekli değil, ölüm için geri döndürülemez bir tetikleyici olarak kabul edilir. Mitotik katastrof bazen ölümün doğrudan mitoz yoluyla gerçekleştiğini ifade etmek için kullanılır (39). Mitoz ile kesintili geçiş genellikle kromozomların yanlış kümelenmesine ve anöploidi oluşumuna yol açar. Anöploidi uzun yıllardır kanser hücrelerinin sık görülen bir özelliği ve tümör oluşumunun olası bir nedenini oluşturmuştur (42).

Son yirmi yıldır kanser konusunda moleküler boyuttaki bilgi düzeyi inanılmaz bir şekilde gelişmiştir. Bu durum, bir kısmı klinik uygulamaya girmiş olan etkili tedavilerin geliştirilmesi için çok sayıda heyecan verici yeni hedefi beraberinde getirmiştir. Bu yeni hedefler, kanserin oluşum sürecinde hem erken hem de geç dönemi tanımlayarak; hastalığın tedavisindeki en önemli hedefi ortaya koymuş ve hastalığın önüne geçilmesinde adım atılmasına neden olmuştur. Mevcut tedavilere ek olarak teknolojinin ilerlemesiyle, geliştirilmeye devam eden yeni tedavi yöntemleri, hekimin hastaya zarar vermeden kanseri tedavi etmesine izin vermelidir (12, 19).

2.6. Serviks Kanser

Serviks, uterusun alt dar ucuna verilen addır. Serviks kanseri, serviks dokularında malign hücrelerin oluşturduğu bir hastalıktır (43). Kadın üreme sistem Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Kadın üreme sistem (44).

Serviks kanseri, önlenabilir olsa da, dünya çapında kadınlar arasında en yaygın ikinci kanserdir (45). Dünyada yılda 493.000 kişi serviks kanser tanısı almakta olup ve 274.000 kişi yaşamını yitirmektedir. Ortalama görülme yaşı 52 olmasına karşın 35-39 ve 60-64 yaş aralığında görülme sıklığında belirgin bir artış, kaydedilmiştir. Serviks kanseri Türk popülasyonunda görülme sıklığı (%5,31) bakımından onuncu sırada bulunmaktadır (2). Serviks kanseri, ölümcül jinekolojik neoplazi olup kadınları üreme çağında etkilemektedir (21, 46). En önemli risk faktörleri human papillomavirus (HPV), insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ve klamidy enfeksiyonları, uzun süreli oral kontraseptif kullanımı, kötü beslenme, çok sayıda gebelik, düşük sosyoekonomik durum, sigara ve ailesel öyküdür (47). Serviks kanserinin başlıca etiyolojik faktörü HPV olup bu virüsün 200'den fazla tanınmış serotipi arasında en yaygın olanları, vakaların yaklaşık % 70'inden sorumlu olan HPV 16 ve HPV 18'dir. Kadınların büyük kısmının cinsel yolla bulaşan bu enfeksiyona hayatlarının bir noktasında sahip olacağı tahmin edilmektedir, ancak bunların sadece % 3-4'ünde serviks kanseri gelişir (21). HPV ile ilişkili maligniteler olan servikal kanserler, dünya genelinde kanserle ilişkili ölümlerin en sık ikinci nedenidir (48). HPV, dünya genelinde en yaygın cinsel yolla bulaşan enfeksiyondur ve neredeyse tüm servikal kanser vakalarının sebebidir (49). HPV onkoprotein E6, fonksiyonel olarak bir ubiquitin ligaz olan ve bu tümör baskılayıcı proteinin degradasyonuna yol açan p53'ün poli-ubikitlenmesini katalize eden E6 bağlantılı protein olarak adlandırılan bir hücresel protein ile etkileşir. Benzer şekilde HPV E7, transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini bloke ederek hücre bölünmesini önleyebilen bir protein olan retinoblastom proteinini inhibe eder. E6 ve E7'nin kombine etkileri, hücrelerin kansere yol açabilecek kontrolsüz bölünme geçirme riski taşır. HPV enfeksiyonları ayrıca vulvar, vajinal, anal, penil ve bazı kafa ve boyun kanserleri gibi diğer bazı genital kanserlere de neden olur. Erken teşhis edilirse servikal karsinoma tedavi edilebilir ancak metastatik ve tekrarlayan kanserin kötü prognozu vardır (50). Amerika Birleşik Devletleri'nde 15-24 yaş arasında olan her 4 erkek veya kadından biri HPV ile enfekte olduğu kaydedilmiştir. Ülkemizde ise, 15 yaş ve üzerinde HPV enfeksiyonu riski altında olan 25.830.000 kadın olduğu düşünülmektedir. En önemli risk faktörünün HPV enfeksiyonları olması ve HPV DNA sekanslarının, servikal tümörlerin % 99'undan fazlasında tespit edilebiliyor olması HPV enfeksiyonunun

servikal kanserin oluşmasında gerekli bir unsur olduğunu düşündürmektedir (47, 51). Bu nedenle, HPV enfeksiyonlarından ve serviks kanserinden korunma amacıyla HPV aşısı üretilmiş olup, tüm dünyada uygulanmaya başlanmıştır. İlaç Türkiye’ de Nisan 2007 tarihinden itibaren kullanılmaktadır (47). HPV aşılarının uygulanması büyük bir ilerlemedir, ancak mevcut aşılar vakaların sadece % 70’ini önleyebilmektedir. Bunun nedeni, HPV enfeksiyonlarının genellikle asemptomatik ve geçici olması, HPV’nin kendi başına servikal kansere neden olmak için yeterli olmamasıdır. Serviks kanseri olan kadınların hayatta kalmasını iyileştirmek için bir başka önemli engel, mevcut tedavilere karşı direncin gelişmesidir (51).

2.6.1. Servik Kanseri Tanısı

Erken tanı ve teşhis oldukça önemlidir. Servikal kanseri erken dönemde teşhis etmek ve etkin tedaviye erişimini sağlamak özellikle tarama programlarının bulunmadığı ülkelerde sağ kalım olasılığını önemli düzeyde artırmaktadır. Günümüzde, hastalığın ilerlemesiyle birlikte tedaviye erişinceye dek serviks kanseri genellikle tespit edilememektedir, bu durum da ölüm oranının artmasına yol açmaktadır. Bu yüzden, serviks kanseri semptomlarını anlamak ve saptamak erken tanıya yardımcı olmaktadır. Tarama, kanser öncesi değişiklikleri saptamayı amaçlamakta olup tedavi edilmediği takdirde kansere yol açmaktadır. Taramada anormallikler olduğu saptanan kadınların, kanserin gelişmesini önlemek ya da kanseri erken dönemde tedavi etmek için takip, tanı ve tedaviye ihtiyaçları bulunmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), serviks kanseri taraması ile ilgili olası yöntemler hakkında şu sonuca varmıştır:

- Tarama 30-49 yaş aralığında bulunan her kadın için en az bir kez yapılmalıdır;
- HPV testi, sitoloji ve asetik asitle yapılan görsel muayenelerin hepsi önerilen tarama testleridir;
- Kriyoterapi veya Loop elektro-eksizyonu, kanser öncesi pozitif tanı alan kadınların çoğunluğu için etkili ve uygun tedavi sağlayabilmektedir;
- “Tarama ve tedavi” ve “tarama, teşhis ve tedavi” her ikisi de değerli yaklaşımlardır.

Kullanılan yaklaşıma bakılmaksızın, etkili bir yöntemin anahtarı, kaliteli tarama ve tedavi ile risk altındaki kadınların büyük bir çoğunluğuna ulaşmaktır. Risk altındaki çoğu kadına ulaşmak için tasarlanmış tarama programları tercih edilmektedir (52). Serviks kanserinden korunma, genital kanserlerden korunmaya en iyi örnektir ve neredeyse %100'e yakın korunma sağlanabilmektedir. Bu nedenle, alınacak önlemler açısından kansere neden olduğu düşünülen faktörleri iyi bilinmelidir. Serviks kanseri riskini, kadınların yaşam tarzında korunma ilkelerine uyarak azaltması mümkündür (53).

Son yıllarda genç bireylerin serviks kanseri insidansı artmaktadır. Serviks kanseri için mevcut tedaviler (cerrahi, kemoterapi veya bunların kombinasyonu) sağkalım süresini uzatır (54). Kemoterapi, kesin lokal tedavilere ek olarak başlıca sistemik tedavi olmaya devam etmekte ve palyasyon için kullanılmaktadır. Hem kesin hem de postoperatif radyoterapi ile eşzamanlı olarak uygulanan platin bazlı rejimlerin, ileri evre hastalıkta eşzamanlı kemoradyoterapinin yararlı etkisi daha küçük iken, belirgin sağkalım yararları sağladıkları gösterilmiştir (55). Bugüne kadar, servikal malignitelerde tedavi protokolleri, tek başına sisplatin uygulamasına veya başka bir sitostatik ilaç, 5- fluorourasil ile kombine tedaviye dayanmaktadır. Bununla birlikte, konvansiyonel tedavilerin uygulanması, tüm organizma için önemli toksisite ile ilişkilidir ve ilaçlara karşı direncin gelişmesine neden olmaktadır (56). Bu nedenle, serviks kanseri için yeni tedavilerin geliştirilmesine acil bir ihtiyaç vardır (54).

2.6.2. Kemoterapi ve Sisplatin

Kanser ve tedavisine ilişkin Mısır'da bulunan ve tahminen milattan önce (M.Ö.) 1600 yıllarında yazılmış olan Edwin Smith papirüsü bilinen en eski kaynaklardan biridir. Papirüste kanser sözcüğü kullanılmamıştır, bir hastalık ismi olan Latince kökenli “kanser” kavramı yüzyıllar sonra kullanıma girmiştir. Bu kullanımı Hipokrat hayata geçirmiş görünmektedir. Hipokrat'tan günümüze kadar kanser ve oluşum mekanizmaları ile ilgili çeşitli varsayımlar ortaya atılmış, tedavisinde ilerleme kaydedilmiştir. Bunların içinde yirminci yüzyıl başlarında kimyasal ajanların farmakoterapötik kullanımı ile ilgili sistemli çalışmaların başlangıcı ve “kemoterapi” kavramının tanımlanması bulunmaktadır (57).

Kemoterapi, kanser hücrelerini öldürerek ya da bu hücrelerin büyümesini kontrol etmek için antikanser ilaçlar kullanılarak yapılan tedaviye verilen addır (36). Antikanser kemoterapinin gelişmesi ve destek tedavisi, kanser hastalarının mortalite ve morbidite oranlarını önemli ölçüde azaltmıştır (58). Bazı kemoterapötikler ve onay yılları Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Bazı kemoterapötikler ve onay yılları (57).

Onay yılı	Etkin madde
1957	Klorambusil
1959	Siklofosfamid, tiotepa
1961	Vinblastin
1962	Fluorourasil
1963	Vinkristin
1964	Melfalan, daktinomisin
1966	Tioguanin
1969	Sitarabin, prokarbazin
1970	Floksuridin, mitramisin, mitotan
1973	Bleomisin
1974	Doksorubisin, mitomisin C
1975	Dakarbazin
1976	Lomustin
1977	Karmustin
1978	Sisplatin
1979	Daunorubisin
1982	Streptozotosin
1983	Etoposid
1987	Mitoksantron
1988	İfosfamid
1989	Karboplatin
1990	Altretamin
1991	Fludarabin, pentostatin
1992	Kladribin, paklitaksel, teniposid
1996	Topotekan

Antikanser kemoterapi aşağıdaki durumlarda uygulanmaktadır:

1. Lokal veya sistemik kemosenstif tümörlerin primer tedavisi
2. Primer tümörün çıkarılmasından sonra metastaza yönelik genellikle palyatif amaçla adjuvan tedavi
3. Cerrahi gibi başka yollarla eradikasyon olasılığını arttırmak için primer tümörün boyutunu azaltmak amacıyla neo-adjuvan tedavi (59).

Kanser için ilaç tedavisinin evrimi, alkileyici ajanlardan ve antimetabolitlerden doğal ürünlere ve son zamanlarda moleküler hedefli ilaçlara hızla ilerlemiştir. Buna yönelik sitotoksik ilaçlar aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir:

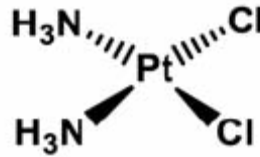
1. Alkileyici ajanlar - mekloretoamin, klorambusil, melfalan, siklofosfamid busulfan, prokarbazin
2. Tubulin bağlayıcı maddeler - vinkristin, vinblastin, etoposide, paklitaksel
3. Antrasiklin antibiyotikler - doksorubisin, mitoksantron, idarubisin, epirubisin
4. Diğer antitümör antibiyotikler - plikamisin, aktinomisin D, bleomisin
5. Platin analogları - sisplatin, karboplatin
6. Antimetabolitler - metotreksat, sitozin, arabinosid, 5-fluorourasil
7. L-asparaginaz, hidroksiüre

Kemoterapi ilaçlarının çoğu, hücre döngüsüne bağımlıdır ve yüksek bir büyüme fraksiyonu olan tümörlere karşı daha etkili olmaktadır. Bazı ilaçlar, tek bir ilaç maruziyetiyle sınırlı sayıda hücre öldürerek faza özgüdür, bazıları ise hücre döngüsünden bağımsızdır (59).

Kanser tedavisi gören hastaların yaklaşık yarısı bir platin analogu ile tedavi edilmektedir. Bu ilaç grubunun yaygın kullanımı 1960'larda Barnett Rosenberg tarafından sisplatinin antikanser aktivitesinin keşfiyle başlamıştır. Kanser tedavi rejimlerinde yaygınlığına rağmen bu grubun bir takım dezavantajlar vardır. Örneğin, tek bir ajan tüm kanser türlerine karşı eşit derecede etkili değildir ve bazı kanser türleri için mevcut onaylanmış platin ajanların herhangi biriyle tedaviye doğal olarak dirençli olduğu görülmektedir. Bu direnişe ek olarak, kanser hücreleri, somatik evrim süreciyle zaman içinde direnç kazanabilir. Ayrıca, toksisitede minörden doz sınırlandırmasına kadar değişen bir takım yan etkiler platin ajanlarla tedaviye eşlik etmektedir. Bu problemleri yenmek için çok sayıda platin kompleksi hazırlanmış ve

antikanser aktivitesi için test edilmiştir (60). Platin analogları arasında sisplatin, karboplatin ve oksaliplatin, kanser kemoterapisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardır (61).

Sisplatin, birçok kanser türünün tedavisinde kullanılan bir ilaç olup serviks kanser tedavisinde kullanılan standart bir kemoterapötik ilaçtır (62). Sisplatinin kimyasal yapısı şekil 2.3.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Sisplatin kimyasal yapısı (60).

Etkili bir platin türevi olan bu ilacın keşfi kırk yılı aşmıştır ve hücre siklusuna özgü olmayıp etkisini DNA hasarı oluşturarak göstermektedir (59, 63).

Sisplatinin neden olduğu toksik etkilerin altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamış olsa da devam eden deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre; sisplatinin etki mekanizması dört ana adımda incelenebilir:

- i. Hücreye giriş,
- ii. Sisplatinin aktivasyonu ile toksik metabolitlerine dönüşümü
- iii. DNA hasarı
- iv. Apoptoz indüksiyonu (60).

İlacın hücre çekirdeğine alınmasını takiben oluşan platin-DNA katımı, bu ilaçların sitotoksitesine aracılık eden çeşitli hücresel süreçleri aktive etmektedir (61).

Sisplatinin atılımı başlıca böbrekler tarafından gerçekleştirilir. İlk 24 saat içinde vücuda verilen sisplatinin yarısı idrardan serbest şekilde elimine edilir. Sonrasında sisplatin plazma proteinlerine bağlanarak hızlı bir şekilde dokularda birikir. Diğer organlarla kıyasladığımızda böbrek daha büyük oranda sisplatini tutar (64). Bu nedenle, bu grup ilaçları incelerken önemli durumlardan biri de ilaç toksisitesidir. Antikanserlerin optimal kullanımında etki mekanizmaları, farmakokinetiği ve ilaç etkileşiminin bilinmesiyle birlikte toksisiteyi dikkatli bir şekilde takip edilmelidir. Sisplatinin renal toksisiteye yol açtığı ve eritropoetini

azaltarak anemiye neden olduğu bilinmektedir. Sisplatin alan hastalar sık olmayarak miyokard iskemisi geçirdiği ve öncesinde kalp rahatsızlığı olanlarda akut miyokard infarktüsünün sıkça geliştiği kaydedilmiştir. Ayrıca, sisplatinin doza bağımlı dorsal gangliyon köklerinde birikimi sonucunda sekonder özel bir tip nörotoksisite gelişir ve hastaların büyük bir kısmında sisplatinin indüklediği nöropati yavaş bir şekilde düzelir. Çocuk hastalarda sisplatin kullanımında şiddetli bir şekilde ototoksisite olduğu görülür (65). Yukarıda anlatılan sitotoksik kemoterapi ilaçları esas olarak mitozu müdahale ederek çoğalan hücreleri tahrip eder ve klinik kullanımdaki ilaçların çoğunun moleküler mekanizması aydınlatılmış olsa da sitotoksik ajanların özgüllüğünün olmaması normal ve malignan hücrelere zarar verme yetenekleri, büyük bir dezavantajdır. Antitümör etkisini arttırmak için çeşitli stratejiler benimsenmektedir. Bunlar, ilaçları farklı etki mekanizmaları ile birleştirmeyi, ilacı doğrudan tümöre iletmeyi ve hücresel direnç mekanizmalarını aşmayı içerir. Kanser tedavisi bu nedenle karmaşık bir şekilde gelişmektedir. Yapılacak olan çalışmalarla rasyonel ilaç tasarımında geleneksel sitotoksik kemoterapinin yanında mekanizma güdümlü, hedeflenmiş antikanser ajanları kullanılmalıdır. Bu nedenle klinisyenler ve bilim adamları tedaviden en iyi şekilde yarar sağlamak ve hastalara verilen bireysel zararı en aza indirmek için çeşitli tedavi seçeneklerini çeşitli şekillerde denemektedir (66).

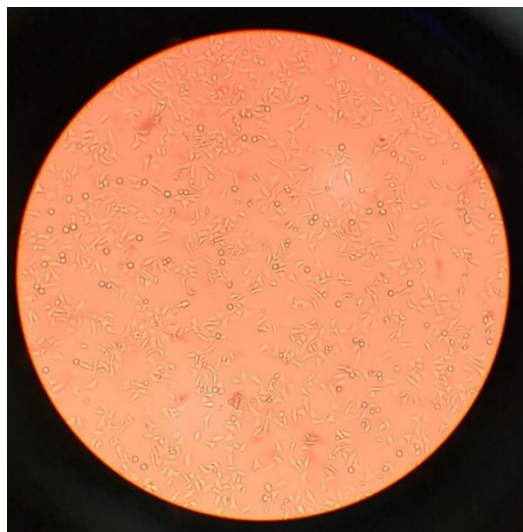
2.7. Kanser Hücre Hatları ve HeLa Hücre Hattı

Bilimsel çalışmalarda canlıların kullanılmasının mümkün olduğunca kısıtlanması gerekliliği, farklı pek çok alanda hücre kültürlerinin geliştirilmesi ve kullanılmasına neden olmuştur. Hücre kültürleri mikrobiyoloji alanında özellikle virüslerin üretilmesi, tanımlanması ve virüs aşılarının üretimi için kullanılmaktadır. Kanser araştırmalarının hızlanması özellikle 21. yüzyılda kanser ilaçlarının geliştirilmesinde, hücre kültürleri büyük önem arz etmektedir. Ayrıca, kanser hücrelerinin ölümsüz oluşu ve kolayca üretilebilmeleri hücre kültürü gerektiren araştırmaları hızlandırmıştır (67).

HeLa hücre hattı ise ilk olarak 1951 yılında genç bir Afro-Amerikan olan Henrietta Lacks'ten alınan servikal kanser hücrelerinden hücre kültürü ortamında çoğaltılmıştır (68). Hastaya ait olan bu hücrelerin ölümsüz olduğu hasta öldükten

sonra anlaşılmıştır. 1966 yılında Stanley Gartler Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection=ATCC) kurumunda bulunan 20 insan hücresinin 18 tanesinin kromozomal ve biyokimyasal anlamda HeLa hücreleri ile birebir aynı olduğunu belirtmiştir. Bu hücreler beyaz ırktaki bireylerden sağlanmış gözükmelerine rağmen, ATCC kayıtlarınca sıklıkla Afro-Amerikalılarda bulunan A tipi glikoz 6 fosfat dehidrogenaz enzimi aktivitesi göstermeleri, saklama işlemleri esnasında bu hücrelerin HeLa hücreleri ile kontaminasyona uğradığını göstermiştir. Bu durumu Gartler, Nature dergisinde 1968 yılında yayınlamıştır (67).

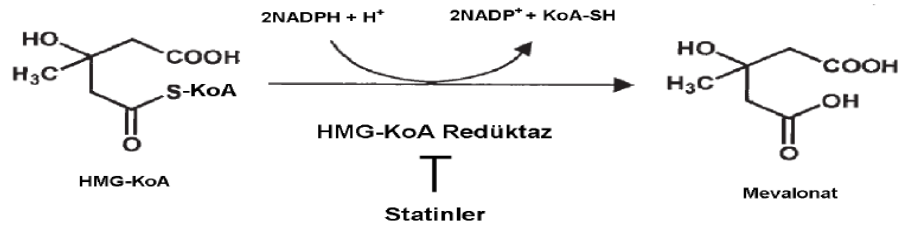
Bu hücre hatları, hücreleri alınan Henrietta Lacks unutulmayarak HeLa hücre serisi olarak atfedilmiştir. HeLa hücre hattı, bu özelliğinin keşfinden sonra standart hücre soyu olarak kullanılmıştır. 2013 yılında ise aile ile National Institutes of Health (NIH) arasında bir anlaşma sağlanarak HeLa hücrelerinin kullanımına devam edilmiştir (68). Aileyle sağlanan anlaşmadan sonra Rebecca Skloot “The Immortal Life of Henrietta Lacks” adlı kitabında 1951 yılındaki ölümünden sonra siyahi bir kadın hastaya ait kanser hücrelerini izinsiz bir şekilde alan araştırmacıların bu hücreleri bilimsel ve ticari anlamda HeLa hücre hattına nasıl dönüştürdüğünü anlatmıştır (69). Bu hücre modeli ile birçok önemli bilimsel gelişmeler kaydedilmiş olup kanser araştırmalarında sıkça tercih edilmektedir (68). Adheran özelliğe sahip HeLa hücreleri epitel karakterli morfoloji gösterirler (Şekil 2.4.). Sıvı nitrojen içinde saklanmalıdırlar. (70).



Şekil 2.4. HeLa hücrelerinin mikroskopik görünümü.

2.8. Statinler

Statinler, kolesterol sentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan hidroksimetil glutaril CoA redüktaz (HMG CoA R) enziminin inhibisyonu ile hipolipidemik etki gösteren ilaçlardır (71). Statinlerin mevalonat sentez basamağını inhibe etmesi Şekil 2.5.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Statinlerin mevalonat sentez basamağını inhibe etmesi (71).

Bu ilaçlar hidrofilik ve lipofilik olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Statinlerin lipofilik olması, farklı dokulara ilaç erişimini kolaylaştırır. Daha lipofilik statinler, hepatik olmayan dokularda daha yüksek maruz kalma seviyelerine ulaşırken, hidrofil statinler daha hepatoselektiftir. Böylece hepatik ve nonhepatik dokularda statinlerin farklı bir etkisi öngörülebilir (72). Statinlerin farmakokinetiği, hidrofilik veya hidrofobik özelliklerine ve uygun membran taşıyıcılarının varlığına veya yokluğuna bağlı olarak değişir. Pravastatin ve rosuvastatin gibi hidrofilik statinlerin, başlangıçta karaciğerde özellikle membran taşıyıcılardan olan organik anyon taşıyan polipeptit OATP1B1 tarafından alındıkları bir yerde biriktikleri gösterilmiştir. OATP1B1, aynı zamanda, lipofilik karakterdeki pitavastatin alımında en önemli taşıyıcıdır. Hidrofilik pravastatin ve rosuvastatin yanı sıra pitavastatin, sitokromlar yoluyla çok az metabolizmaya uğrar ve büyük ölçüde değişmeden atılır (73). Bu ilaçlar birkaç yan etki göstermiş omlarıyla birlikte iyi tolere edilirler. Son 20 yılda artan klinik veriler ve epidemiyolojik çalışmalar statinlerin kanserin önlenmesinde rol oynayabileceğini desteklemektedir. Bu antikanser etkisi, statinlerin lipit düşürme işleviyle ilişkili olmayabilir, ancak detaylar hala bilinmemektedir. Genel olarak, epidemiyolojik veriler statinlerin antikanser aktivitesini desteklemektedir, ancak olası yararları büyük ölçüde tümörün türüne, kullanılan statine ve çalışma koşullarına bağlıdır (74). Statinlerin özellikleri aşağıda gösterilmiştir (Tablo 2.2.).

Tablo 2.2. Statinlerin özellikleri (75).

Statin	Karakteri				
	Lipofilik	Yapı	Kaynak	Sitokrom sisteminden metabolizasyon	Kolesterol Tedavisi için Günlük Dozu (mg/gün)
Lovastatin	+	Lakton	Mantar	CYP3A4	20-80
Simvastatin	+	Lakton	Mantar	CYP3A4	10-80
Pravastatin	-	Asit	Mantar	Minimal	10-40
Fluvastatin	+	Asit	Sentetik	CYP2C9, CYP2D6	20-80
Atorvastatin	+	Asit	Sentetik	CYP3A4	10-80
Rosuvastatin	-	Asit	Sentetik	CYP2C9, CYP2C19	5-80
Pitavastatin	+	Asit	Sentetik	CYP2C9, CYP2C18	4

Mantar kökenli ve sentetik statinlerin aktiviteleri arasında anlamlı fark yoktur. Bununla birlikte, hidrofilik statinlerin lipofilik statinlerden anlamlı derecede daha az etkili oldukları belirtilmelidir (73).

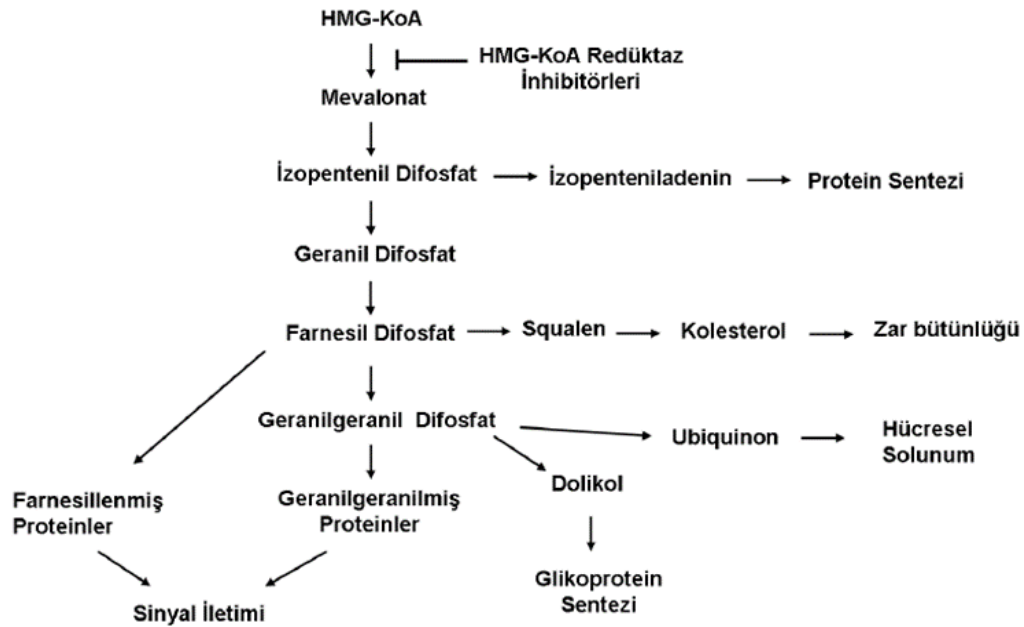
Statinler antilipidemik etkilerinden bağımsız olarak aterom plağı stabilizasyonu, endotel disfonksiyonunda düzelme, trombosit agregasyonunda azalma ve antienflamatuvar etkiler gibi etkilere sahip olup buna bağlı olarak kardiyovasküler hastalıklarda primer ve sekonder korunma amacıyla kullanılmaktadırlar (76).

2.8.1. Kanser Tedavisinde Statinlerin Yeri

Statinlerin son 15 yılda kullanımındaki artışla uzun vadeli kullanımındaki güvenliği daha önemli hale gelmiştir (4). Statinlerin son yıllarda lipit düşürücü etkileri dışındaki etkinliklerine vurgu yapılmakta olup bu etkilere pleotropik etkiler adı verilmektedir. Bu etkiler arasında aterosklerotik plakların stabilizasyonu, antienflamatuvar özellikleri, insan serum paraoksonaz-1 geninin transkripsiyonunun aktivasyonu ve reaktif oksijen bileşiklerinin üretimini inhibe etmelerine bağlı antioksidan aktiviteleri gösterilmektedir (77, 78). Ayrıca, statinlerin pleotropik

etkileri arasında *in vitro* ve *in vivo* farklı tümör modellerine karşı potansiyel antikanser etkinliklerine dikkat çekilmiştir (79). Lipit düşürücü tedavi ile kanser riski arasındaki bağlantı ilk olarak 1990'ların başlarında hayvan çalışmaları ile gözlenmiştir (80). Statinler, hem kolesterol hem de izoprenoid düzeylerini azaltma yetenekleri nedeniyle kanser tedavisinde umut vadeden bir ilaç grubudur. Gerçekleştirilen araştırmalarla statinlerin antikanser aktivitesini açıklayan birden fazla mekanizma bulunduğu gösterilmiştir. Hücre döngüsünün durdurulmasına, apoptozun indüklenmesine veya moleküler yollardaki değişikliklere yol açan mekanizmalar, kullanılan statin tipine, kanser hücrelerinin tipine, kullanılan statin dozuna ve hücrelerin statinlere maruz kalma süresine bağlıdır (73). HMG-CoA redüktaz inhibitörlerinin, antiproliferatif etkisini hücre döngüsünde G₁-S'nin geçişini bloke ederek tümör hücrelerini öldürerek gösterdiği bildirilmiştir. Bu etkinin iki siklin bağımlı kinaz inhibitörlerindeki artışa bağlı olabileceği düşünülmektedir (4). Ayrıca, statinlerin antikanser ilaçlar olarak veya klasik kemoterapötik ilaçlarla kombine adjuvan olarak kullanılmasının gerekçesi iki şekilde kanıtlanmıştır. Bunlardan ilki, bu hipolipidemik ilaçların, membran bütünlüğü için gerekli kolesterol olan sterollerin üretimini inhibe etmesi diğeri ise proliferasyon, migrasyon, invazyon, hücre döngüsü, hücre çoğalması ve hücre kaderini düzenleyen temel onkoproteinlerin izoprenilasyonunun blokajını gerçekleştirmesidir. Statinlerin HMG-CoA redüktazı inhibe etme kabiliyeti, antikanser etkilerinde en sık çalışılan mekanizma olmakla birlikte, mevalonat yolunun inhibisyonu, statinlerin uyguladığı antitümör etkilerinin çoğunun altında yatan temel moleküler mekanizmadır (79). Mevalonat yolağının ilk aşamasında, statinler, HMG-CoA'yı mevalonata dönüştürür. Mevalonat izopentenil difosfat ve izopenteniladenin'e metabolize edilir. Farnesil difosfat, geranilgeranil difosfat sentaz ile geranilgeranil difosfat oluşturur. Farnesil difosfat, N-bağılı oligosakkaritlerin oluşumu sırasında membran ankrajları olan kolikol ve steroid biyosentezinde öncüdür. Hem farnesil difosfat hem de geranilgeranil difosfat, protein prenilasyonu olarak adlandırılan çeşitli önemli hücre proteinlerinin C terminalinde bir transasyon sonrası modifikasyonunda rol oynar (Şekil 2.6.) (81). İzoprenoidler olarak bilinen bu yapılar Ras ve Rho proteinleri dahil olmak üzere birçok önemli proteine bağlanır. Protein prenilasyonu ile protein-protein ve protein-membran etkileşimlerini ve protein fonksiyonunu düzenleyen,

sitozolden membrana protein translokasyonunu kolaylaştırır. Aktive olmuş Ras ve Rho guanozin trifosfatazları (GTPaz), hücre bütünlüğü, hücre yapışması, hücre hareketliliği, hücre iskeletinin yeniden biçimlenmesi, hücre sinyali, hücre döngüsü ilerlemesi gibi kanser oluşumu ve ilerlemesi için kritik olan hücresel yollarda önemli rol oynayan anjiyogenez, fagositoz, endositoz, oksidatif stres ve genotoksik strese hücresel yanıt gibi çok sayıda efektör molekülü ile etkileşim halindedir. Statinler, izopren öncülerinin hücresel havuzlarını tüketir ve Ras ve Rho proteinlerinin izoprenilleşmesini azaltarak işlevlerini bozarlar. Statinlerin antitümör etkileri arasında büyüme inhibisyonu ve apoptozun indüksiyonu, metastatik potansiyelin azalması, anjiyogenezin inhibisyonu ve tümörlerin farklılaşması yer alır (80).



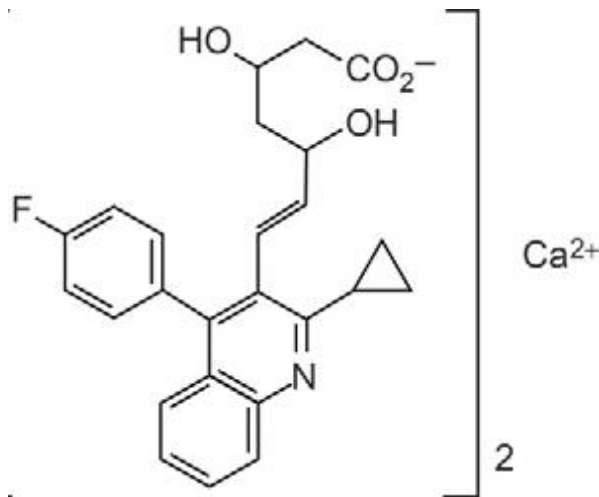
Şekil 2.6. Mevalonat yolağı (4).

Tüm statinlerde belirgin antikanser etkileri gözlenmesine rağmen mevcut veriler, her bir statin türevinin antitümör etkilerinde bazı farklılıklar olduğunu ileri sürmektedir. Ayrıca statinler, farmakokinetik, potens ve terapötik etkinlikte belirgin farklılıklara sahiptir. Otofaji veya apoptoz şeklinde statin ve hücre ölümü arasındaki bağlantıyı anlamak, kanser tedavisine yeni yaklaşımlar geliştirmeye yardımcı olabilir. Bu veriler, tümörde statinlerin birikiminin, plazmada ve tümörde yüksek statin konsantrasyonlarının daha uzun süre muhafaza edilmesinin, statinlerin antikanser etkisine önemli derecede katkıda bulunabileceğini göstermektedir (74).

Bunun dışında, statinlerin antitümör etkisi, antioksidan, antienflamatuar ve kolesterol düşürücü özelliklerine bağlanmıştır. Statinlerin antioksidan durumunu iyileştirdiği ve antitümör etkisine katkıda bulunabilecek antienflamatuar etkileri olduğu belirtilmiştir. Statinlerin, katalaz ve glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırdığı ve tümör hücrelerinde tümör nekroz faktörü alfa ekspresyonunu azalttığı kanıtlanmıştır. İnflamasyon ve oksidatif stresin azalmasının statinlerin lipid düşürücü etkisine bağlanmadığı, statinlerin lipid profili üzerindeki etkilerinden bağımsız olarak pleiotropik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (5).

2.8.2. Pitavastatin

Pitavastatin, statin ailesinin en yeni üyesidir. İlk olarak 2003 yılında Japonya'da primer hiperlipidemi veya karışık tip dislipideminin tedavisi için tanıtılmış olup, 2009 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (US Food and Drug Administration) tarafından onaylanmıştır (82, 83). Pitavastatin kalsiyum, sentetik bir siklopropil yan grubu ile yeni bir statin olarak tasarlanmıştır. Bu yapının, diğer statinlere kıyasla farmakolojik anlamda birçok yarar sağladığı düşünülmektedir. Pitavastatin kalsiyum yapısı Şekil 2.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Pitavastatin kalsiyum yapısı (82).

Günde 1-4 mg dozunda pitavastatin, spesifik dozlarda atorvastatin, simvastatin ve pravastatin gibi diğer statinlere kıyasla, bazı çalışmalara göre lipid parametrelerini değiştirmede benzer etkinlik göstermiştir (84). Pitavastatinin serum düşük yoğunluklu protein (low density protein, LDL) seviyeleri üzerindeki düşürücü

etkisinin pravastatin, simvastatin ve atorvastatininkinden daha etkili olduğu kaydedilmiştir (8). Pitavastatin, farmakokinetik özellikleri yönünden istenilen bir profile sahiptir (85). Çok az metabolize olduğu için yüksek bir oral biyoyararlanıma sahiptir bu da uzun bir etki süresi sağlamaktadır ve böylece ilaç etkileşimlerini minimuma indirmektedir (8). Çoğu statin CYP3A4 ile metabolize olmasına rağmen, pitavastatin bir CYP3A4 substratı değildir ve esas olarak CYP2C9 ile ve az miktarda CYP2C8 ile metabolize edilir. Ana metaboliti, üridin 5' difosfat glukuroniltransferazlar (UGT1A3 ve UGT2B7) ile geniş glukuronid konjugasyonunun bir sonucu olarak inaktif laktondur (84). Ayrıca, oral uygulama sonrası enterohepatik siklusa uğraması ile pitavastatinin eliminasyon yarı ömrü ($t_{1/2}$); 11-12 saate kadar uzamaktadır (85, 86). Diğer taraftan, oral tek doz pitavastatinin atılımı idrar ve feçes yoluyla olmaktadır. Yapısında bulunan sentetik bir siklopropil yan grubu nedeni ile pitavastatinin diğer ilaçlarla etkileşiminin en az düzeyde olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, pitavastatinin eritromisin, lopinavir/ritonavir, rifampisin (rifampin), fibrik asit türevleri, niasin ve varfarin ile birlikte dikkatli kullanımı ve/veya doz azaltılması önerilmektedir (85). Siklosporin ile birlikte pitavastatin kullanılmaması önerilmektedir. Makrolid antibiyotiklerle pitavastatinin birlikte kullanımında kan düzeylerini arttığı bildirilmekte ve bu kullanım sürecinde pitavastatin kullanımının bırakılması uygun görülmektedir (87). Pitavastatini yan etki profili yönüyle incelediğimizde ise; yapılan bir meta analizde yan etkileri nedeniyle tedavisi en az sonlandırılan statin olmasından dolayı pitavastatine dikkat çekildiği görülmektedir (88). Ayrıca, farmakokinetik profili üzerinde gıda ile ilgili klinik olarak etkileşimi yoktur. İnsanlarda, pitavastatin, oral uygulamadan yaklaşık 1 saat sonra maksimum plazma konsantrasyonuna (C_{max}) ulaşmaktadır (85).

2.9. Sitotoksisite ve Sitotoksisite Belirleme Yöntemleri

Toksisiteyi belirlerken, ilk aşama sitotoksisite tayinidir. Bu nedenle kullandığımız sitotoksisite testleri sayesinde bir ksenobiyotiğin olası toksisitesi hakkında bilgi edinilir ve elde edilen verilerle sonrasında yapılmak istenen hayvan deneyleri ve klinik araştırmalar planlanır. Sitotoksisite testlerinden elde edilecek verilerin güvenilirliği büyük önem taşımaktadır (89).

2.9.1. Sitotoksisite Yöntemleri

- a) Metabolik Aktivitenin Ölçülmesine Dayalı Yöntemler
- b) Membran Geçirgenlik Testleri
 - Tripan Mavisi Yöntemi
 - Nötral Kırmızı Alım Yöntemi
- c) Alamar Mavisi Yöntemi
- d) Sülforodamin B (SRB) Yöntemi
- e) Laktat Dehidrojenaz (LDH) Yöntemi
- f) Kristal Viyole Yöntemi şeklinde sınıflandırılabilir.

a) Metabolik Aktivitenin Ölçülmesine Dayalı Yöntemler

Metabolik aktivitenin ölçülmesine dayalı yöntemlerden MTT testi, genellikle hücre canlılığını ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Öncelikli olarak mitokondrilerde bulunan dehidrojenazların aktivitesini hızlı bir şekilde ölçer. Prolifere olan hücrelerin tetrazolyum ile formazan ürünleri oluşturması esasına dayanır ve meydana gelen renk değişimi absorban ölçümü ile değerlendirilir. Hücre canlılığı kaybolduğunda mitokondriyal fonksiyon azalır ve sonuç olarak tetrazolyum tuzunu formazana çevirebilme yeteneği azalır. Birçok hücrede hücre sayısı ile orantılı bir şekilde formazan miktarı değişir ve bu miktar değişimiyle hücre canlılığı tespit edilir (90, 91). Tetrazolyum türlerini karşılaştırmak istersek en iyi alternatif 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu (WST-1) gibi görünmektedir, diğer tuzlara göre daha verimli tüketilmekte ve daha hızlı renk değişimi göstermektedir. 2,3-bis [2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid (XTT) kullanımında ise XTT'nin hücreler tarafından yavaş indirgendiği ve ekstra faktörlerin ilave edilmesi gerekebileceği göz ardı edilmemelidir. MTT kültür ortamında çözünemediğinden ek olarak indirgenme ürünlerini çözmek için dimetil sülfoksit (DMSO) gibi çözücülerin kullanılması gereklidir (91).

b) Membran Geçirgenlik Testleri

Zarı aşabilen bir boya sayesinde hücre zarı geçirgenliği, kolay bir şekilde belirlenebilmektedir. Bu yöntemin dayandığı temellerden biri canlılığı sonlanmaya yakın olan hücrenin, hücre zarı geçirgenliğinin artmış olmasıdır. Canlı ve ölü hücreler boyanın hücre zarını geçip geçememesine göre belirlenmektedir. Bu yöntemde kullanılan iki tip boyadan biri olan vital boyalar, canlı hücreye aktif transportla taşınırlar. En sık kullanılan vital boyaya nötral kırmızısı örnek verilebilir. Non-vital boyalardan olan tripan mavisi ise hücre canlılığı sona erdiğinde hücrenin içine girmektedir (92). Tripan mavisi negatif yüklüdür. Eğer hücre membranı zarar görmemiş ve canlı bir hücre ise, boya hücre içine girmez. Ancak canlı olmayan hücreler boyayı absorbe eder ve mikroskop altında mavi görünürler. Tripan mavisi ile çalışırken dikkat edilmesi gereken nokta, hücreler tripan mavisi boyasında belirtilen süreden daha uzun kalırsa canlı hücrelerin de maviye boyandığıdır (93).

c) Alamar Mavisi Yöntemi

Alamar mavisi yönteminin aktif bileşeni olan resazurin, hücre zarından geçebilen, toksik olmayan, mavi renkli olan floresan özelliği bulunmayan bir bileşiktir. Hücre içine girdikten sonra, kuvvetli kırmızı floresan veren resofurine indirgenir. Floresan özelliği nedeni ile önemli bir duyarlılığa sahiptir. Alamar mavisi yönteminin, MTT testine göre daha hassas ve performansının yüksek olduğu bildirilmiştir (94-96).

d) Sülförodamin B (SRB) Yöntemi

Sülförodamin B (SRB), hücre çoğalmasının değerlendirilmesi amacıyla kullanılan bir sitotoksisite yöntemidir. SRB, renkli bir boya olup aminoksanten yapısındadır. Yöntemin esası, SRB'nin sitokiyometrik olarak temel aminoasitlere bağlanmasına dayanır. Böylece boyanmış hücrelerden elde edilen boya miktarı ile doğrudan total protein miktarı ve bu şekilde hücre sayısı hakkında bilgi veren kolorimetrik bir yöntemdir (97).

e) Laktat Dehidrojenaz Yöntemi

Hücre ölümüyle ilgili diğer bir parametre ise, hücre zarı bütünlüğünün, ölü veya hasar görmüş hücrelerden salınan sitoplazmik enzim aktivitesinin ölçülmesiyle değerlendirilmesidir. Tüm hücrelerde bulunan sabit sitoplazmik bir enzim olan laktat dehidrojenaz (LDH), hücre plazma membranı hasar gördüğünde hücre kültürü süpernatantına kolaylıkla salınabilmektedir. Sonuç, kolorimetrik ölçüm yöntemleriyle değerlendirilmektedir (92).

f) Kristal Viyole Yöntemi

Kristal viyole deneyi çoklu küme plakalarına yapışan hücrelerin relatif yoğunluğu hakkında kantitatif bilgi edinmek için yararlıdır. Kristal viyole solüsyonu, canlı hücrelerin DNA'sını lekelediğinden hücrenin canlılığı hakkında değerlendirme yapmamızı sağlar (98). Bu yöntemler arasında uygun sitotoksosite yöntemini belirlemek için testin dayandığı ve hücre ölümüne neden olan mekanizmaların bilinmesi oldukça önemlidir.

Bu tezde, pitavastatin'in etki mekanizmasını inceleyerek mitokondriyal aktivite ya da membran geçirgenliği üzerinden antikanser aktivite gösterebileceği düşünüldükçe MTT ve NKA yöntemleri tercih edilmiştir. MTT yöntemi mitokondride enzimatik reaksiyona dayanırken NKA yöntemi ise boyanın lizozomlara alınma derecesinin ölçülmesine dayanmaktadır. Ayrıca, NKA yönteminin pahalı olmaması diğer yöntemlere göre üstünlüğüdür. Erken dönemde sitotoksik etkiyi belirlemede kullanılan NKA ve MTT yöntemleri, canlı hücre sayısını belirlemek, mitokondriyal ve lizozomal aktivitenin değerlendirilmesi için uygun ve hassas yöntemlerdir (99).

2.10. NKA Yöntemi

Nötral kırmızı alım yöntemi, biyomedikal ve çevresel araştırmalarda en çok kullanılan sitotoksosite testlerinden biridir (100). Hücre canlılığı ve hasarını değerlendiren bir sitotoksosite testi olan ve Borenfreund ve Puerner (101)'in geliştirdiği nötral kırmızı alım yönteminin prensibi, nötral kırmızısı boyasının canlı ve sağlıklı hücrelerin lizozomlarında birikmesine dayanır. Bu yöntem hızlı ve kolorimetriktir. Hücrenin bütünlüğünün bozulduğu durumlarda, hücre zarı veya daha hassas olan lizozom zarının hasar görmesi durumunda, nötral kırmızı boyası hücreye

girip bağlanamaz ve böylece kolorimetrik bir azalma yaşanır. Bu şekilde, canlı sağlam hücreler ile hasarlı ölü hücreleri ayırt edebilmek mümkün olmaktadır (92, 100).

2.11. 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)

Yöntemi

Metabolik aktivitenin ölçülmesi esasına dayanan bir sitotoksisite yöntemi olan MTT yöntemi hücre canlılığının, canlı hücrelerin çoğalmasının ve kimyasal maddelerin sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Öncelikli olarak mitokondrilerde bulunan dehidrogenazların aktivitesini hızlı bir şekilde ölçer. MTT yöntemi canlı/çoğalan hücre oranını değerlendirerek makrofaj aracılı sitotoksisiteyi belirler. MTT ve diğer tetrazolyum tuzları canlı hücrelerin solunum ve elektron transport sistemleri tarafından indirgenerek suda çözünmeyen mavi formazan kristalleri oluştururlar. Oluşan kristallerin miktarı kolorimetrik olarak tayin edilerek mitokondri canlılığı ve buna bağlı hücre canlılığı değerlendirilir (102, 103).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Sigma-Aldrich
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	BIOWEST
Etil Alkol	Sigma-Aldrich
Fetal Sığır Serum (FBS)	Sigma-Aldrich
Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (PBS) tablet	Sigma-Aldrich
Glasiyel asetik asit	Merck
HeLa Hücre Hattı	Americal Type Culture Collection (ATCC® CCL-2™)
Hidroklorik Asit (%37)	Sigma
Nötral Kırmızı	Sigma
Penisilin-Streptomisin	Biological Industries
Pitavastatin Kalsiyum	Santa Cruz Biotechnology
Sisplatin	Koçak Farma®
Tripan Mavisi	Sigma-Aldrich
Tripsin-EDTA	Sigma-Aldrich

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Buzdolabı	Hotpoint
Cam pastör pipeti	Interlab
Deiyonize Su Cihazı	Barnstead
Derin Dondurucu (-20°C)	Ariston
Derin Dondurucu (-80°C)	Revco
Distile Su Cihazı	MES ultrapure
Floresan Mikroskop	Leica
Hücre kültürü uyumlu flask (25 cm ² /75 cm ²), pipet (1- 25 ml), santrifüj tüpü (15, 50 ml)	Corning
Hücre Kültür Plağı (96 kuyucuklu)	Corning
Inverted Mikroskop	Leica
İnkübatör (CO ₂ 'li)	Heraeus Instruments
Krio tüp	Corning
Lam (26x76mm)	Marienfeld
Lamel (24x60mm)	Marienfeld
Laminar Akımlı Kabin	Heraeus
Manyetik Karıştırıcı	Stuart Scientific
Membran Filtre (0,2 µm por çaplı)	Brand
Mikrofiltre	Millipore® Merck
Mikropipet (8 kanallı)	Eppendorf, Capp
Mikropipetler (0.5-1 µl, 1-5 µl, 5-10 µl, 10-200 µl, 200-1000 µl, 1-5ml)	Finnpipette, Gilson, Discovery Confort
Neubauer Camı (Hücre sayım camı)	Marienfeld
Otoklav	Rodwell Monarch MP 24
Pipet ucu, (0.5-10, 10-200, 100-1000 µl'lik)	Eppendorf
Santrifüj	Heraeus, Hettich
Spektrofotometre	SpektraMax M2
Steril enjektör (2 ml)	Beybi
Su Banyosu	Termal® Laboratory Tools
Terazi	Schimadzu Libror
Ultrasonik Banyo	Transsonic 460/H
Vorteks	Heidolph Reax 2000
Yatay çalkalayıcı	Edmund Bühler

3.3. Hazırlanan Çözeltiler

3.3.1. Yapılan Analizlerde Kullanılan Pitavastatin Kalsiyum Çözeltileri

1,1 mg pitavastatin kalsiyum (M_A : 880,98 g/mol) tartıldı, 25 μ L etanol'de (son etanol konsantrasyonu %1 olacak şekilde) çözüldükten sonra çözelti hacmi besiyeri ile 250 μ L'ye tamamlandı. Deney günü taze hazırlandı. Elde edilen ana stok çözeltisinden (5 mM) MTT ve NKA yöntemlerinde kullanılmak üzere besiyeri ile 100 μ M ara stok çözeltisi ile 2, 5, 10, 20, 50, 100 ve 200 μ M konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlandı.

3.3.2. Sitotoksosite Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

NKA Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

Besi Ortamı

HeLa hücrelerinin çoğalmasında kullanılacak besi ortamı için; 500 ml MEM üzerine 50 ml (%10) FBS ve 5 ml (%1) penisilin/streptomisin eklendi. +4°C'de saklandı.

Fiksasyon (Sabitleme) Çözeltisi

25 mL absölü etanol üzerine 0,5 mL glasiyel asetik asit eklendi. Distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Nötral Kırmızı (NK) Stok Çözeltisi

20 mg NK boyası 5 mL PBS içerisinde çözüldü. Su banyosunda çalkalanarak çözünmesi sağlandı. Hazırlanan çözelti alüminyum folyoya sarılarak +4°C'de saklandı.

NK Standart Çözeltisi

Deney gününden bir gün önce 625 μ L NK stok çözeltisi 50 ml FBS içermeyen besi yeri ile karıştırılarak hazırlandı. Membran filtreden süzüldü. 37°C'de 18 saat süreyle inkübe edildi.

MTT Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

Besi Ortamı

HeLa hücrelerinin çoğalmasında kullanılacak besi ortamı için; 500 ml MEM üzerine 50 mL (%10) FBS ve 5 mL (%1) penisilin/streptomisin eklendi. +4°C’de saklandı.

Çözme Çözeltisi

Dimetil Sülfoksit

MTT Çözeltisi

50 mg MTT 10 mL Dulbecco’s Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik içerisinde çözüldü. Hazırlanan çözelti membran filtreden steril, ışık geçirmeyen bir tüpe süzülde. Hazırlanan MTT çözeltisi ışıktan korunarak, +4°C’de saklandı.

Sisplatin Çözeltisi

10 mg / 20 mL konsantrasyonundaki enjeksiyonluk sisplatin preparatından 600.6 µL alındı, son hacim kültür vasatı ile 1 mL’ye tamamlandı. Elde edilen 1 mM’lık çözeltiden 10 µM ve 20 µM sisplatin çözeltileri hazırlandı.

3.4. Yöntemler

3.4.1. HeLa Hücrelerinde NKA Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

- Steril çalışma kabini altında HeLa hücreleri, besi ortamı içeren yatay hücre kültürü şişesine alındı.
- Hücreler, % 5 CO₂ ve % 95 nem içeren CO₂ inkübatöründe 37°C’de 1 gün süre ile inkübe edildi.
- İnkübatörden alınan flask mikroskop altında incelenerek hücrelerin canlılığı, kültür ortamının kontaminasyon durumu ve doygunluğu kontrol edildi.
- Steril çalışma kabininde hücre kültür süspansiyonu yatay hücre kültürü şişesinden cam pipet ve vakum yardımıyla şişe tabanına değmeden dikkatlice uzaklaştırıldı.

- Hücreler 2 kez 10 mL PBS ile yıkandı ve ardından flaska 5 ml tripsin-EDTA çözeltisi ilave edildi.
- İnkübatörde 3-5 dakika süreyle bekletilerek hücrelerin flask tabanından ayrılması sağlandı. 10 mL besi yeri şişeye ilave edildi.
- Yatay hücre kültürü şişesindeki hücre süspansiyonu bir santrifüj tüpüne aktarılarak hücre süspansiyonu 25°C'de 1200 devir/dakika hızda, beş dakika süreyle santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlandı.
- Üstte toplanan sıvı, steril çalışma kabini altında cam pipet ve vakum yardımıyla uzaklaştırıldı ve dipte toplanan hücre pelleti 5 mL besi yeri ile dikkatlice karıştırıldı.
- Elde edilen hücre süspansiyonundan 10 µL bir ependorf tüpe aktararak üzerine 90 µL tripan mavisi çözeltisi (% 0,4 a/h) eklenerek iyice karıştırıldı (Dilüsyon faktörü:10).
- Yaklaşık 10 µL hücre süspansiyonu-tripan mavisi karışımı bekleme yapılmadan Neubauer sayım lamına uygulandı.
- Işık mikroskobu altında, Neubauer sayım lamını oluşturan dört karenin kenar çizgileri hariç üzerlerindeki parlak ve renksiz olan yaşayan hücreler soldan sağa ve yukarıdan aşağıya gidilerek sayıldı. Hücre sayımının doğru ve kesin bir şekilde yapılabilmesi için ideal olarak her işlemde 200 ve üzeri hücre sayıldı. Canlı hücrelerin konsantrasyonunu hesaplamak için aşağıdaki Formül 3.1. kullanıldı:

$$ml'deki canlı hücre sayısı = \frac{\text{Toplam hücre sayısı}}{4} \times 10,000 \times 10 \quad (3.1.)$$

- Yaşayan hücre konsantrasyonu hesaplandıktan sonra hücre süspansiyonu, besi yeri ile seyreltildi.
- Her bir kuyucuğa 200 µL (10000 hücre/kuyucuk) olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plağa ekim yapıldı.
- Hücreler, % 5 CO₂ ve % 95 nem içeren CO₂ inkübatöründe 37°C'de 1 gün süre ile inkübe edildi.
- 24 saatlik inkübasyon sonunda kuyucuklardaki besi yeri atıldı.

- Steril şartlarda besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler 2-200 μM konsantrasyon aralığında pitavastatin, sisplatin ve ikisini birarada içeren son hacim 200 μL olacak şekilde besiyeri içerisinde 24 saat inkübe edildi.
- Negatif kontrol olarak, hücreler %1 etanol içeren besiyeri ve pozitif kontrol olarak 10 μM ve 20 μM sisplatin içeren besiyeri inkübe edildi.
- Hücreler 37°C'de, % 5 CO_2 ve % 95 nem içeren inkübatörde 24, 48 ve 72 saat sürelerinde inkübasyona bırakıldı.
- 96 kuyucuklu plağın kuyucukları içerisindeki besi yeri atıldı. NK standart çözeltisinden her bir kuyucuğa 200 μL eklenerek hücreler 37°C, %5 CO_2 ve %95 nem içeren inkübatörde 3 saat daha inkübasyona bırakıldı.
- 3 saat sonunda kuyucuklardaki NK çözeltileri atıldı, kuyucuklar üç kez 200 μL PBS ile yıkandı. Her bir yıkamadan sonra kuyucuklardaki PBS atıldı ve plak kurutuldu.
- Fiksasyon çözeltisinden plaktaki her bir kuyucuğa 200 μL eklendi, plaklar 20 dakika süre ile yatay çalkalayıcı üzerinde çalkalandı.
- Çalkalama işlemi sonrasında kuyucuklarda oluşan renk şiddeti spektrofotometre cihazında 540 nm'de ölçüldü.
- Her bir maddenin konsantrasyonu için elde edilen absorbans değerinin kontrol absorbans değerine oranı 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı ve %50 inhibitör konsantrasyonları (IC_{50}) hesaplandı.
- Çalışmalar üçer kez tekrarlandı.

3.4.2. HeLa Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

- NKA yöntemi başlığı altında anlatıldığı şekilde HeLa hücrelerinin kültürü yapıldı, madde çözeltileri kuyucuklara eklendi.
- Hücreler 37°C'de, 24 saat süreyle % 5 CO_2 ve % 95 nem içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda madde çözeltileri atıldı. Her bir kuyucuğa 90 μL besi ortamı ve hazırlanan 5 mg/ml MTT çözeltisinden 10 μL eklendi 37°C, % 5 CO_2 ve % 95 nem içeren etüvde 3 saat daha inkübasyona bırakıldı.

- 3 saatlik inkübasyon süresinin sonunda MTT çözeltisi atıldı. Kuyucuklarda oluşan formazan kristallerini çözmek amacıyla her kuyucuğa 100 μ L çözüme çözeltisi eklendi.
- Çözünmeyi sonlandırmak için plak yatay çalkalayıcıda 15 dakika süreyle çalkalandı.
- Çalkalama işlemi sonrasında kuyucuklarda oluşan renk şiddeti spektrofotometre cihazında 570 nm’de ölçüldü.
- Boya ışıktaki bozulduğu için, deneyin her aşaması mümkün olduğunca karanlıkta yapıldı.
- Her bir maddenin konsantrasyonu için elde edilen absorbans değerinin kontrol absorbans değerine oranı 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı ve IC₅₀ değerleri hesaplandı.
- Çalışmalar üçer kez tekrarlandı.

3.5. İstatistiksel Yöntemler

İstatistikler analizler, ortalama $\pm$ standart sapma kullanılarak yapıldı. SPSS 10.5 for Windows programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmorog-Smirnov testiyle değerlendirildi. Grup farklılıkları tek yönlü varyans analizi (ANOVA), Least Significant Differences (LSD) test ile belirlendi. $p < 0,05$, $p < 0,01$ ve $p < 0,001$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Pitavastatinin HeLa Hücrelerinde 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

0,125-500 μ M konsantrasyon aralığında pitavastatinin HeLa hücrelerinde MTT yöntemine göre yapılan geniş doz taraması sonucunda negatif kontrol (%0,5 EtOH içeren besiyeri) ile kıyaslandığında 0,125-2 μ M konsantrasyon aralığında HeLa hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı gözlenmiştir. Ancak 2-200 μ M konsantrasyon aralığında daha fazla sitotoksik etki oluşturduğu gözlenmiştir ve tekrarlı çalışmalara 24, 48 ve 72 saat maruziyet sürelerinde bu doz aralığında devam edilmiştir. Çalışılan doz aralığında 24 ve 48 saat maruziyet süresinde IC_{50} değeri hesaplanamamıştır. Pitavastatinin 72 saat maruziyet süresinde HeLa hücreleri için IC_{50} değeri 115,65 μ M olarak belirlenmiştir.

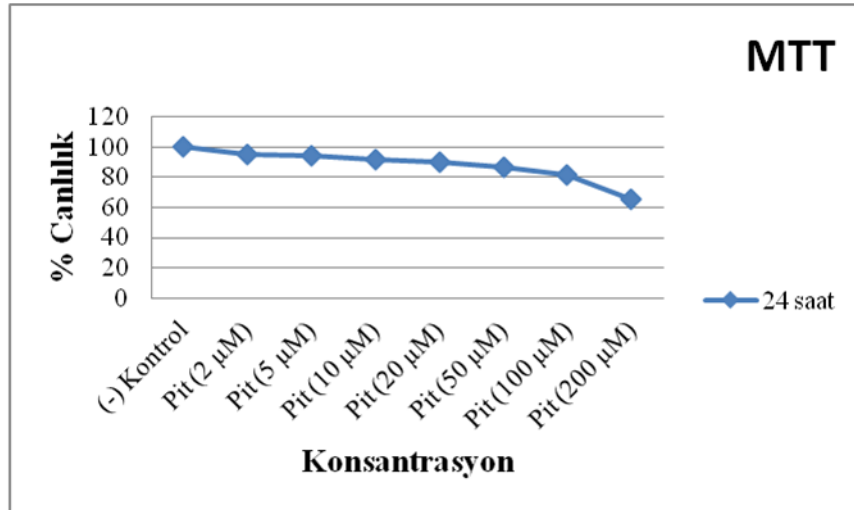
4.1.1. Pitavastatin ve Pitavastatin ile Sisplatinin Kombine Etkisinin 24 Saat Maruziyet Süresinde HeLa Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

Tablo 4.1. MTT yöntemine göre pitavastatinin ve pitavastatin + sisplatinin 24 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi. *

	Gruplar	Ortalama Canlı Hücre Yüzdeleri (% ± standart sapma)
1	(-) Kontrol (% 0,5 EtOH içeren besiyeri)	100,00 ± 0,00
2	(+) Kontrol (10 µM Sisplatin)	91,13 ± 5,42 ^b
3	(+) Kontrol (20 µM Sisplatin)	81,25 ± 6,09 ^{++, a}
4	2 µM Pitavastatin	94,76 ± 3,17 ^b
5	5 µM Pitavastatin	93,68 ± 3,96 ^b
6	10 µM Pitavastatin	91,69 ± 4,53 ^b
7	20 µM Pitavastatin	89,57 ± 5,76 ⁺
8	50 µM Pitavastatin	85,61 ± 5,85 ⁺
9	100 µM Pitavastatin	80,79 ± 3,74 ^{++, a}
10	200 µM Pitavastatin	65,25 ± 8,16 ^{++, a, b}
	Kombine gruplar	
11	5 µM Pitavastatin + 10 µM Sisplatin	88,93 ± 4,33 ⁺
12	5 µM Pitavastatin + 20 µM Sisplatin	85,21 ± 6,98 ⁺
13	10 µM Pitavastatin + 10 µM Sisplatin	91,85 ± 6,85 ^b
14	10 µM Pitavastatin + 20 µM Sisplatin	83,33 ± 5,49 ⁺
15	20 µM Pitavastatin + 10 µM Sisplatin	87,71 ± 5,36 ⁺
16	20 µM Pitavastatin + 20 µM Sisplatin	74,95 ± 7,25 ^{++, a}
17	50 µM Pitavastatin + 10 µM Sisplatin	88,54 ± 7,06 ⁺⁺
18	50 µM Pitavastatin + 20 µM Sisplatin	74,32 ± 9,20 ^{++, a}
19	100 µM Pitavastatin + 10 µM Sisplatin	80,33 ± 1,98 ⁺⁺
20	100 µM Pitavastatin + 20 µM Sisplatin	71,30 ± 5,12 ^{++, a, b}
21	200 µM Pitavastatin + 10 µM Sisplatin	66,22 ± 5,76 ^{++, a, b}
22	200 µM Pitavastatin + 20 µM Sisplatin	55,51 ± 5,03 ^{++, a, c}

(*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama ± standart sapması olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir (Pitavastatin ve sisplatin uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır). Negatif kontrol olarak % 0,5 EtOH içeren besiyeri ve pozitif kontrol olarak 10 µM ve 20 µM sisplatin uygulanmıştır. (^ap<0,05, ⁺⁺p<0,001, negatif kontrol [EtOH içeren besiyeri (% 0,5)] ile kıyaslanmıştır).

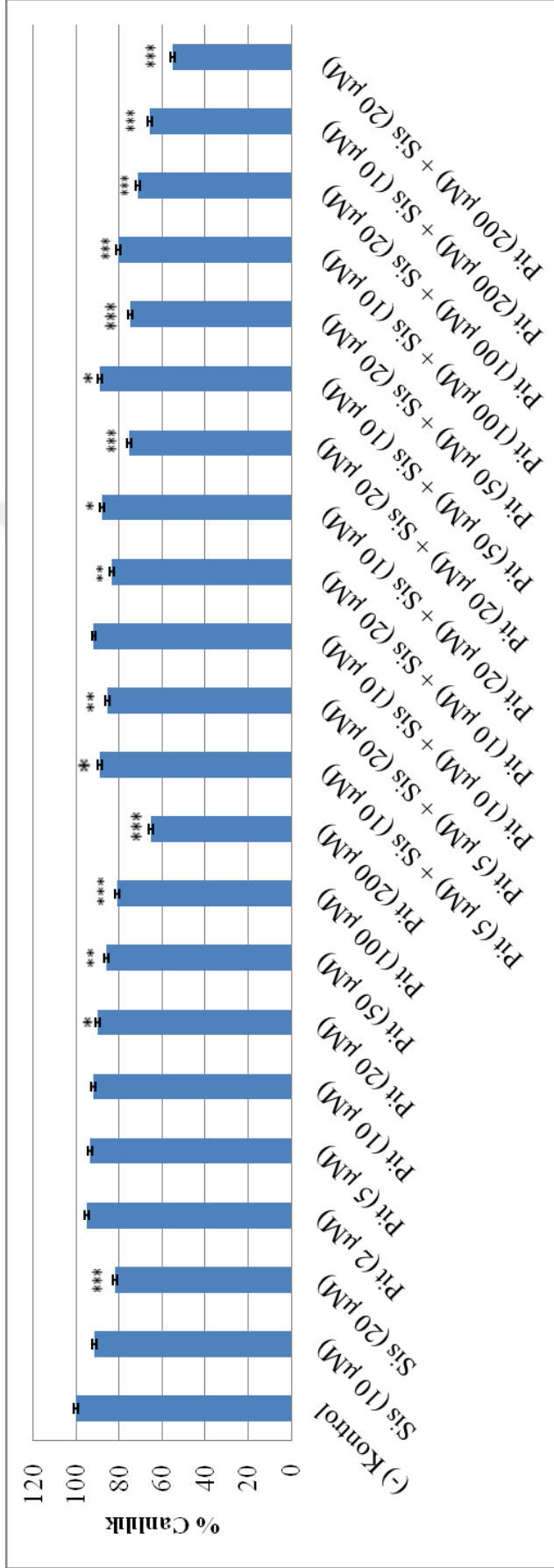
^a p<0,05 pozitif kontrol (10 µM Sisplatin) ile kıyaslanmıştır. ^b p<0,05, ^c p<0,001, pozitif kontrol (20 µM Sisplatin) ile kıyaslanmıştır).



*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri olarak verilmiştir.

Şekil 4.1. MTT yöntemine göre farklı konsantrasyonlarda pitavastatin ile 24 saat inkübe edilen HeLa hücrelerinin canlılık yüzdeleri* (Pit: Pitavastatin).

Pitavastatin, 2, 5, 10, 20, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarda 24 saat süre ile uygulanmıştır. HeLa hücrelerinde pitavastatinin canlılığa olan etkisine şekle bakıldığı zaman, (Şekil 4.1.) 2 µM konsantrasyonunda kontrole göre anlamlı bir azalma görülmedi. Pitavastatinin 10 µM ($p<0,05$) artan konsantrasyonlarda oluşturduğu sitotoksitenin doza bağlı olarak arttığı tespit edildi. Pitavastatinin 200 µM ($p<0,001$) konsantrasyonda kontrole göre canlılığı %70'in altına düşürdüğü görüldü.

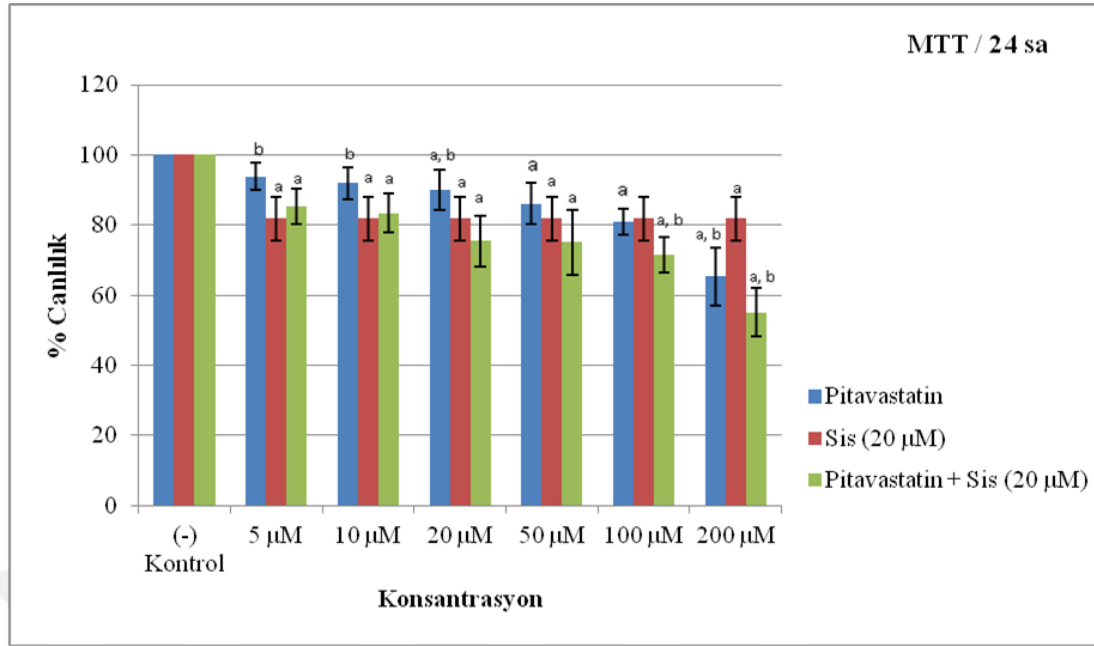


*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama $\pm$ standart sapması olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir (Pitavastatin ve sispaltin uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır).

Negatif kontrol olarak % 0,5 EtOH içeren besiyeri uygulanmıştır.

(Pit: Pitavastatin ve Sis: Sispaltin) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$) ile kıyaslanmıştır.)

Şekil 4.2. MTT yöntemine göre pitavastatin ve sispaltinin 24 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi.*



*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama $\pm$ standart sapması olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir (Pitavastatin ve sisplatin uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır). Negatif kontrol olarak % 0,5 EtOH içeren besiyeri uygulanmıştır.

^a $p < 0,05$ Negatif kontrol (% 0,5 EtOH içeren besiyeri); ^b $p < 0,05$ Pozitif kontrol (20 µM Sisplatin) ile kıyaslanmıştır.

(Grafik üzerinde gösterilen konsantrasyon pitavastatine ait olup kombine dozlarda da belirtilen konsantrasyonlarda çalışılmıştır.)

Şekil 4.3. Pitavastatin ve sisplatinin MTT yöntemine göre 24 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sinerjistik sitotoksik etkisi. *

Pitavastatin, 5, 10, 20, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonları tek başına ve 10 ve 20 µM sisplatinle kombine edilerek 24 saat süre ile uygulanmıştır. HeLa hücrelerinde pitavastatin ve sisplatinin canlılığa olan etkisine bakıldığı zaman (Şekil 4.3.), 20 µM konsantrasyonundan itibaren kontrole göre anlamlı bir sinerjistik sitotoksiste görüldü. Kombine etkinin artan konsantrasyonlarda oluşturduğu sitotoksitenin doza bağlı olarak arttığı tespit edildi. Pitavastatinin 200 µM ve sisplatinin 10 µM dozunda ($p < 0,001$) kontrole göre canlılığı %70'in altına düşürdüğü görüldü.

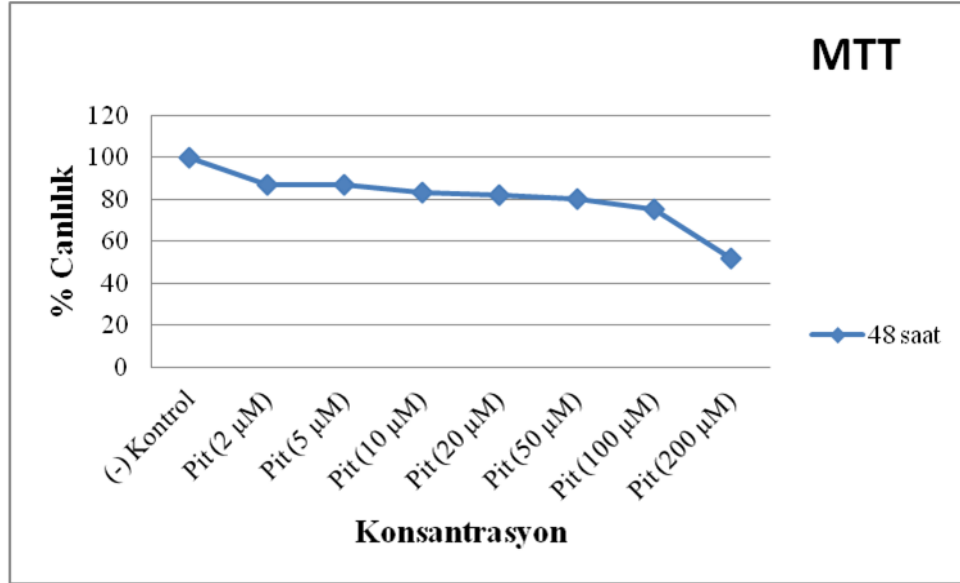
4.1.2. Pitavastatin ve Pitavastatin ile Sisplatinin Kombine Etkisinin 48 Saat Maruziyet Süresinde HeLa Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

Tablo 4.2. MTT yöntemine göre pitavastatinin ve pitavastatin + sisplatinin 48 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi. *

	Gruplar	Ortalama Canlı Hücre Yüzdeleri (% $\pm$ standart sapma)
1	(-) Kontrol (% 0,5 EtOH içeren besiyeri)	100,00 $\pm$ 0,00
2	(+) Kontrol (10 μ M Sisplatin)	87,77 $\pm$ 10,94 ^b
3	(+) Kontrol (20 μ M Sisplatin)	63,47 $\pm$ 17,65 ^{++, a}
4	2 μ M Pitavastatin	87,28 $\pm$ 5,93 ^b
5	5 μ M Pitavastatin	87,61 $\pm$ 4,20 ^b
6	10 μ M Pitavastatin	84,08 $\pm$ 8,77 ^b
7	20 μ M Pitavastatin	82,68 $\pm$ 5,24 ^{+, b}
8	50 μ M Pitavastatin	80,70 $\pm$ 8,95 ^{+, b}
9	100 μ M Pitavastatin	75,99 $\pm$ 9,12 ⁺
10	200 μ M Pitavastatin	52,90 $\pm$ 7,77 ^{++, a}
Kombine gruplar		
11	5 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	72,51 $\pm$ 9,83 ⁺
12	5 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	59,48 $\pm$ 12,32 ^{++, a}
13	10 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	72,01 $\pm$ 13,86 ⁺
14	10 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	54,60 $\pm$ 9,54 ^{++, a}
15	20 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	68,75 $\pm$ 12,40 ^{+, a}
16	20 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	48,51 $\pm$ 9,15 ^{++, a, b}
17	50 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	66,29 $\pm$ 13,75 ^{++, a}
18	50 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	59,07 $\pm$ 20,66 ^{++, a}
19	100 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	71,44 $\pm$ 0,69 ⁺
20	100 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	56,66 $\pm$ 6,56 ^{++, a}
21	200 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	52,36 $\pm$ 4,26 ^{++, a}
22	200 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	33,47 $\pm$ 4,05 ^{++, a, c}

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama $\pm$ standart sapması olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir (Pitavastatin ve sisplatin uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır). Negatif kontrol olarak % 0,5 EtOH içeren besiyeri ve pozitif kontrol olarak 10 μ M ve 20 μ M sisplatin uygulanmıştır. (⁺p<0,05, ⁺⁺p<0,001, negatif kontrol [EtOH içeren besiyeri (% 0,5)] ile kıyaslanmıştır).

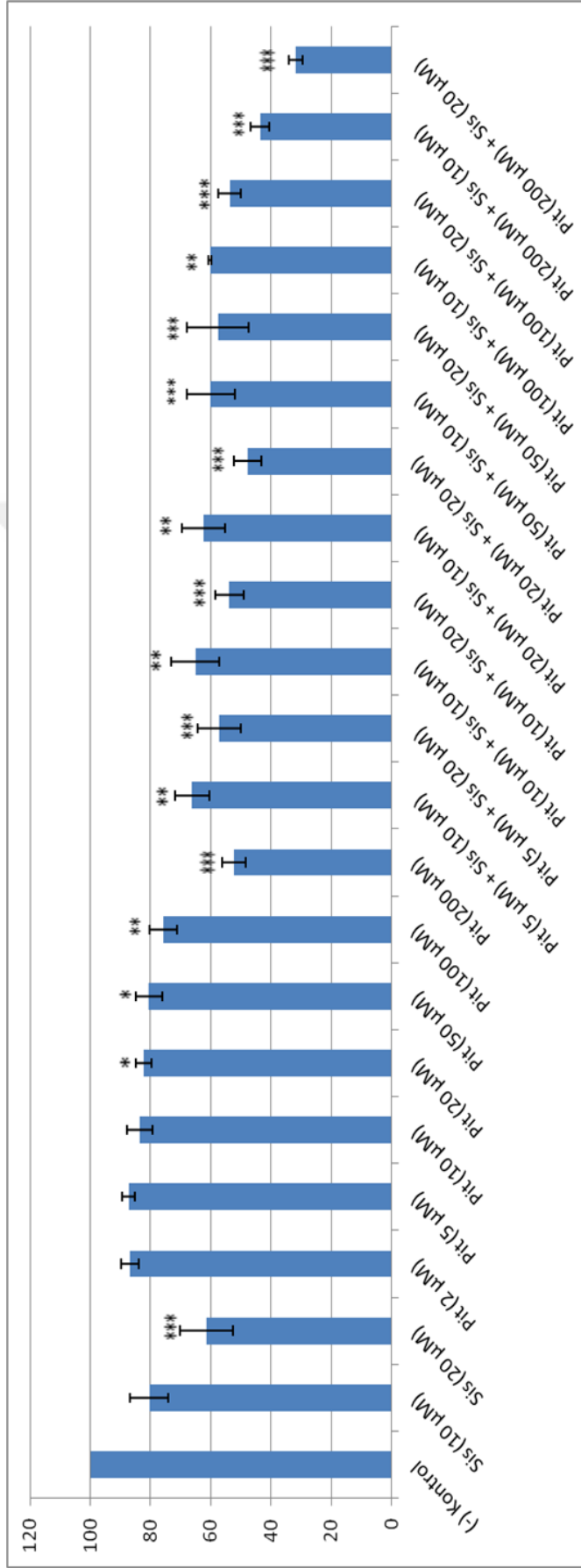
^a p<0,05 pozitif kontrol (10 μ M Sisplatin) ile kıyaslanmıştır. ^b p<0,05, ^c p<0,001, pozitif kontrol (20 μ M Sisplatin) ile kıyaslanmıştır).



*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri olarak verilmiştir.

Şekil 4.4. MTT yöntemine göre farklı konsantrasyonlarda pitavastatin ile 48 saat inkübe edilen HeLa hücrelerinin canlılık yüzdeleri. * (Pit: Pitavastatin)

Daha dar bir konsantrasyon aralığında etkisi değerlendirildiğinde (Şekil 4.4.); 2, 5 ve 10 µM konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı bir azalma görülmedi. ($p>0,05$). Canlılığın 20, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarda azaldığı, 200 µM konsantrasyonda %70'in altına düştüğü görüldü. Konsantrasyon artışına bağlı olarak canlılık 20, 50, 100 ve 200 µM kontrole göre anlamlı bulundu.



(Pit: Pitavastatin ve Sis: Sildenafil)

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama $\pm$ standart sapması olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir (Pitavastatin ve sildenafil uygulanan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır).

Negatif kontrol olarak % 0,5 EtOH içeren besiyeri uygulanmıştır. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, negatif kontrol [EtOH içeren besiyeri (% 0,5)] ile kıyaslanmıştır.)

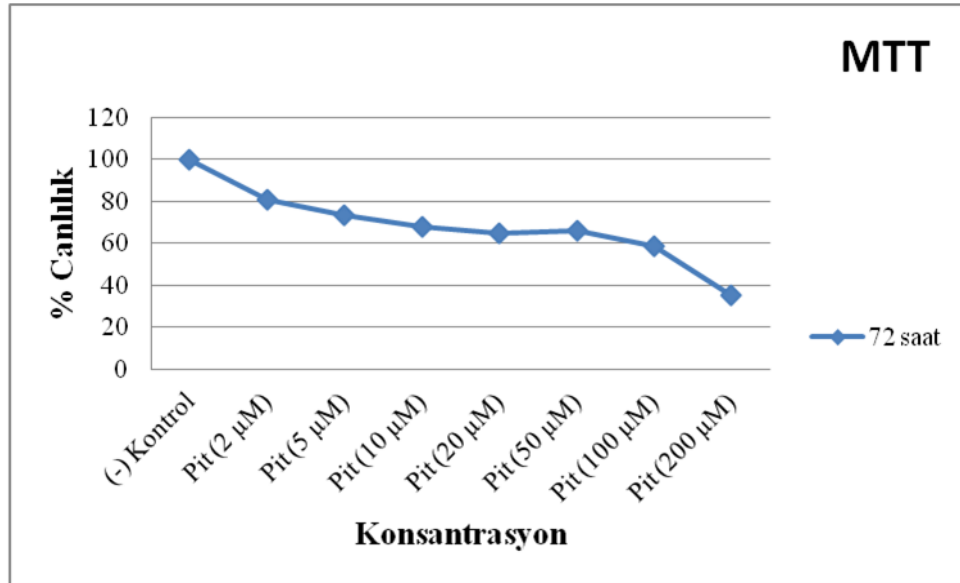
Şekil 4.5. MTT yöntemine göre pitavastatin ve sildenafilin 48 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi. *

4.1.3. Pitavastatin ve Pitavastatin ile Sisplatinin Kombine Etkisinin 72 Saat Maruziyet Süresinde HeLa Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

Tablo 4.3. MTT yöntemine göre pitavastatinin ve pitavastatin + sisplatinin 72 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi.*

	Gruplar	Ortalama Canlı Hücre Yüzdeleeri (% $\pm$ standart sapma)
1	(-) Kontrol (% 0,5 EtOH içeren besiyeri)	100,00 $\pm$ 0,00
2	(+) Kontrol (10 μ M Sisplatin)	73,56 $\pm$ 16,25 ^{+, b}
3	(+) Kontrol (20 μ M Sisplatin)	41,26 $\pm$ 21,31 ^{++, a}
4	2 μ M Pitavastatin	80,01 $\pm$ 4,20 ^{+, c}
5	5 μ M Pitavastatin	73,43 $\pm$ 4,07 ^{+, b}
6	10 μ M Pitavastatin	67,22 $\pm$ 7,45 ^{+, b}
7	20 μ M Pitavastatin	64,09 $\pm$ 7,54 ^{++, b}
8	50 μ M Pitavastatin	64,67 $\pm$ 11,83 ^{+, b}
9	100 μ M Pitavastatin	57,42 $\pm$ 10,67 ⁺⁺
10	200 μ M Pitavastatin	35,34 $\pm$ 5,71 ^{++, a}
	Kombine gruplar	
11	5 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	52,31 $\pm$ 12,70 ^{++, a}
12	5 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	31,34 $\pm$ 14,92 ^{++, a}
13	10 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	46,80 $\pm$ 16,16 ^{++, a}
14	10 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	29,08 $\pm$ 14,51 ^{++, a}
15	20 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	46,48 $\pm$ 14,94 ^{++, a}
16	20 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	25,82 $\pm$ 9,45 ^{++, a}
17	50 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	45,03 $\pm$ 10,87 ^{++, a}
18	50 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	25,95 $\pm$ 9,32 ^{++, a}
19	100 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	42,87 $\pm$ 12,67 ^{++, a}
20	100 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	26,81 $\pm$ 7,13 ^{++, a}
21	200 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	24,94 $\pm$ 12,89 ^{++, a}
22	200 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	14,92 $\pm$ 7,08 ^{++, a, b}

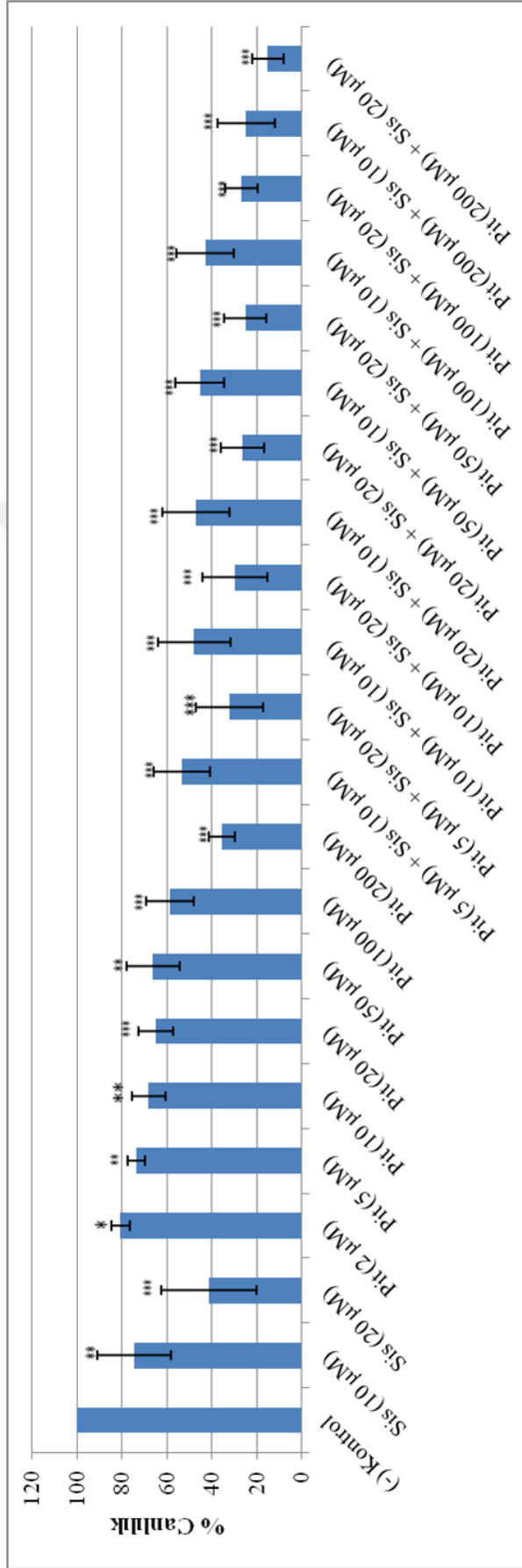
*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama $\pm$ standart sapması olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir (Pitavastatin ve sisplatin uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır). Negatif kontrol olarak % 0.5 EtOH içeren besiyeri ve pozitif kontrol olarak 10 μ M ve 20 μ M sisplatin uygulanmıştır. (⁺p<0,05, ⁺⁺p<0,001, negatif kontrol [EtOH içeren besiyeri (% 0,5)] ile kıyaslanmıştır. ^a p<0,05 pozitif kontrol (10 μ M Sisplatin) ile kıyaslanmıştır. ^b p<0,05, ^c p<0,001, pozitif kontrol (20 μ M Sisplatin) ile kıyaslanmıştır).



*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri olarak verilmiştir.

Şekil 4.7. MTT yöntemine göre farklı konsantrasyonlarda pitavastatin ile 72 saat inkübe edilen HeLa hücrelerinin canlılık yüzdeleri.* (Pit: Pitavastatin)

Pitavastatin, 2; 5; 10; 20; 50; 100 ve 200 µM konsantrasyonlarda 72 saat süre ile uygulandı. HeLa hücrelerinde pitavastatinin canlılığa olan etkisine Şekil 4.7.'ye bakıldığı zaman, 2 µM konsantrasyonunda kontrole göre anlamlı bir azalma görüldü. ($p < 0,05$) Pitavastatinin yüksek konsantrasyonlarda oluşturduğu sitotoksitenin doza bağlı olarak arttığı tespit edildi. Konsantrasyon artışına bağlı olarak canlılık 20 ve 200 µM konsantrasyonları için kontrole göre anlamlı ($p < 0,001$) bulundu. Pitavastatinin 10 µM konsantrasyonda kontrole göre canlılığı %70'in altına düşürdüğü görüldü.

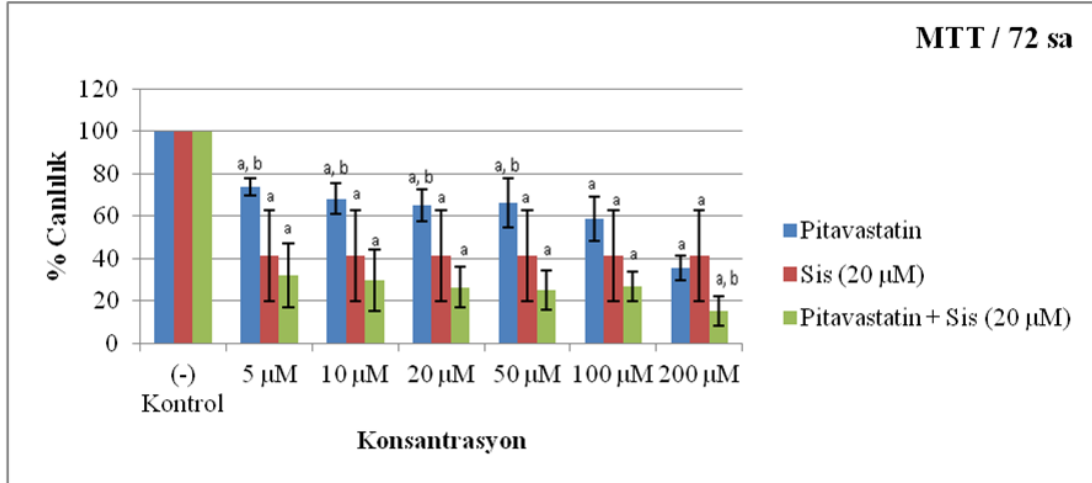


(Pit: Pitavastatin ve Sis: Sildenafil)

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama $\pm$ standart sapması olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir (Pitavastatin ve sildenafil uygulanan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır).

Negatif kontrol olarak % 0,5 EtOH içeren besiyeri kullanılmıştır. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, negatif kontrol [EtOH içeren besiyeri (% 0,5)] ile kıyaslanmıştır.)

Şekil 4.8. MTT yöntemine göre pitavastatin ve sildenafilin 72 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi. *



*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama $\pm$ standart sapması olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir (Pitavastatin ve sisplatin uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır). Negatif kontrol olarak % 0,5 EtOH içeren besiyeri uygulanmıştır.

^a $p < 0,05$ Negatif kontrol (% 0,5 EtOH içeren besiyeri); ^b $p < 0,05$ Pozitif kontrol (20 µM Sisplatin) ile kıyaslanmıştır.

(Grafik üzerinde gösterilen konsantrasyon pitavastatine ait olup kombine dozlarda da belirtilen konsantrasyonlarda çalışılmıştır.)

Şekil 4.9. Pitavastatin ve sisplatinin MTT yöntemine göre 72 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sinerjistik sitotoksik etkisi. *

Pitavastatin, 5; 10; 20; 50; 100 ve 200 µM konsantrasyonları tek başına ve 10 ve 20 µM sisplatinle kombine edilerek 72 saat süre ile uygulanmıştır. HeLa hücrelerinde pitavastatin ve sisplatinin canlılığa olan etkisine Şekil 4.9.'a bakıldığı zaman, 5 µM konsantrasyonundan itibaren kontrole göre anlamlı bir sinerjistik sitotoksikite görüldü. Kombine etkinin artan konsantrasyonlarda oluşturduğu sitotoksikitenin doza bağlı olarak arttığı tespit edildi. Pitavastatinin 5 µM ve sisplatinin 10 µM ve 20 µM dozunda ($p < 0,001$) kontrole göre canlılığı %70'in altına düşürdüğü görüldü.

4.2. Pitavastatinin HeLa Hücrelerinde NKA Yöntemi ile

Sitotoksikitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

0,125-500 µM konsantrasyon aralığında pitavastatinin HeLa hücrelerinde yapılan MTT geniş doz taraması sonucunda kontrol grubu ile kıyaslandığında 0,125 µM -2 µM konsantrasyon aralığında HeLa hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı gözlenmiştir. Ancak 2 µM-200 µM konsantrasyon aralığında daha fazla sitotoksik etki oluşturduğu gözlenmiştir ve tekrarlı çalışmalara ve NKA ile sitotoksikitenin belirlenmesinde bu doz aralığında devam edilmiştir. Pitavastatinin

HeLa hücreleri için 72 saat maruziyet süresinde IC₅₀ değeri 11,20 µM olarak belirlenmiştir.

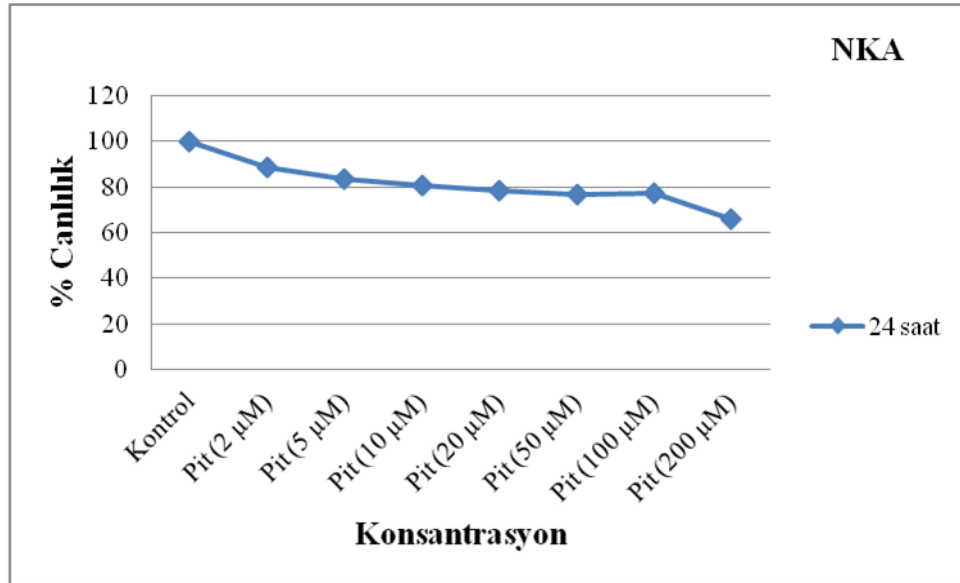
4.2.1. Pitavastatin ve Pitavastatin ile Sisplatinin Kombine Etkisinin 24 Saat Maruziyet Süresinde HeLa Hücrelerinde NKA Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

Tablo 4.4. NKA yöntemine göre pitavastatinin ve pitavastatin + sisplatinin 24 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi. *

	Gruplar	Ortalama Canlı Hücre Yüzdeleri (% ± standart sapma)
1	Kontrol	100,00 ± 0,00
2	(+) Kontrol (10 µM Sisplatin)	90,64 ± 4,13 ⁺
3	(+) Kontrol (20 µM Sisplatin)	85,63 ± 3,98 ⁺⁺
4	2 µM Pitavastatin	88,62 ± 0,43 ⁺
5	5 µM Pitavastatin	83,66 ± 0,95 ⁺⁺
6	10 µM Pitavastatin	80,70 ± 2,14 ^{++, a}
7	20 µM Pitavastatin	78,40 ± 2,63 ^{++, a}
8	50 µM Pitavastatin	76,77 ± 3,68 ^{++, a, b}
9	100 µM Pitavastatin	77,37 ± 4,34 ^{++, a, b}
10	200 µM Pitavastatin	65,65 ± 3,11 ^{++, a, c}
	Kombine gruplar	
11	5 µM Pitavastatin + 10 µM Sisplatin	82,22 ± 2,67 ^{++, a}
12	5 µM Pitavastatin + 20 µM Sisplatin	78,79 ± 3,70 ^{++, a}
13	10 µM Pitavastatin + 10 µM Sisplatin	79,65 ± 2,65 ^{++, a}
14	10 µM Pitavastatin + 20 µM Sisplatin	78,37 ± 3,20 ^{++, a}
15	20 µM Pitavastatin + 10 µM Sisplatin	75,39 ± 3,29 ^{++, a, b}
16	20 µM Pitavastatin + 20 µM Sisplatin	73,28 ± 4,35 ^{++, a, b}
17	50 µM Pitavastatin + 10 µM Sisplatin	77,05 ± 3,48 ^{++, a, b}
18	50 µM Pitavastatin + 20 µM Sisplatin	76,16 ± 1,76 ^{++, a, b}
19	100 µM Pitavastatin + 10 µM Sisplatin	80,40 ± 10,58 ^{++, a}
20	100 µM Pitavastatin + 20 µM Sisplatin	76,80 ± 8,51 ^{++, a, b}
21	200 µM Pitavastatin + 10 µM Sisplatin	60,56 ± 6,41 ^{++, a, c}
22	200 µM Pitavastatin + 20 µM Sisplatin	58,81 ± 6,75 ^{++, a, c}

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama ± standart sapması olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir (Pitavastatin ve sisplatin uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır). Pozitif kontrol olarak 10 µM ve 20 µM sisplatin uygulanmıştır. (⁺p<0,05, ⁺⁺p<0,001, kontrol grubu ile kıyaslanmıştır).

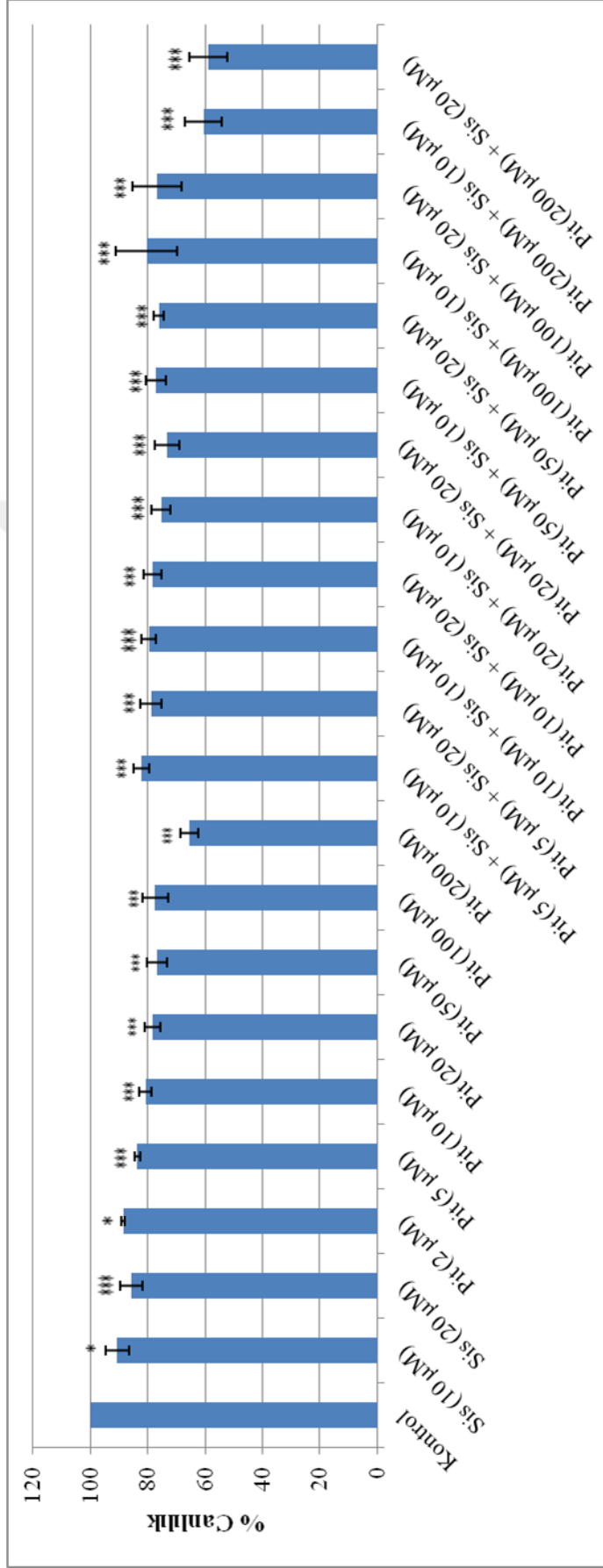
^a p<0,05 pozitif kontrol (10 µM Sisplatin) ile kıyaslanmıştır. ^b p<0,05, ^c p<0,001, pozitif kontrol (20 µM Sisplatin) ile kıyaslanmıştır).



*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri olarak verilmiştir.

Şekil 4.10. NKA yöntemine göre farklı konsantrasyonlarda pitavastatin ile 24 saat inkübe edilen HeLa hücrelerinin canlılık yüzdeleri. * (Pit: Pitavastatin)

Pitavastatin, 2, 5, 10, 20, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarda 24 saat süre ile uygulanmış olup HeLa hücrelerinde pitavastatinin canlılığa olan etkisine bakıldığı zaman, (Şekil 4.10.) 2 µM konsantrasyonunda kontrole göre anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,05$). Pitavastatinin 5 µM ($p<0,001$) artan konsantrasyonlarda oluşturduğu sitotoksitenin doza bağlı olarak arttığı tespit edildi. Konsantrasyon artışına bağlı olarak canlılık 2,5, 10 20 ve 50 µM konsantrasyonları için kontrole göre anlamlı ($p<0,001$) bulundu. Ancak 100 µM konsantrasyonda sitotoksitenin doza bağlı olarak artmadığı tespit edildi. Pitavastatinin 200 µM ($p<0,001$) konsantrasyonda kontrole göre canlılığı %70'in altına düşürdüğü görüldü.

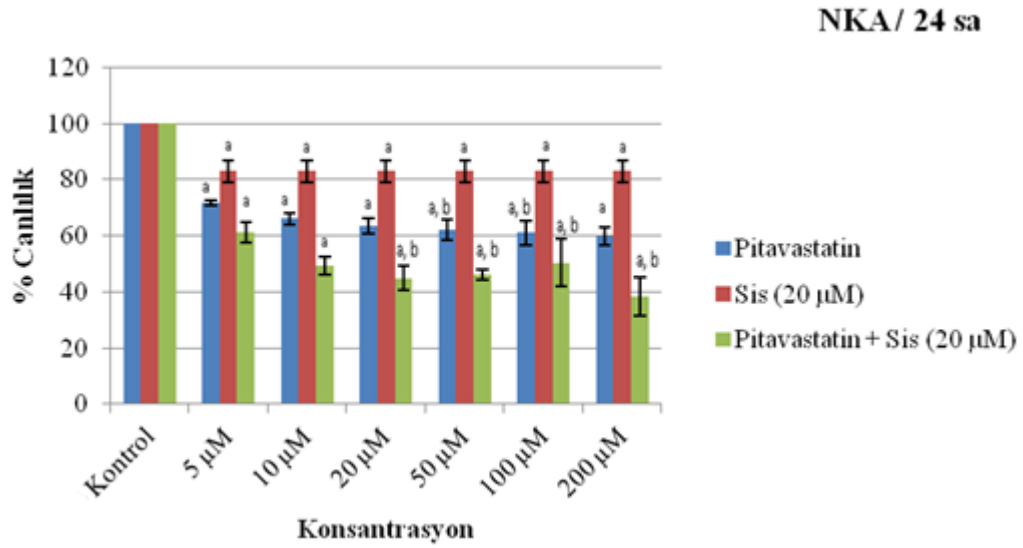


(Pit: Pitavastatin ve Sis: Sisplatin)

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması ± standart sapması olarak verilmiştir. Hücre canlılığı kontrole göre değerlendirilmiştir (Pitavastatin ve sisplatin uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır).

(*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 kontrol ile kıyaslanmıştır.)

Şekil 4.11. NKA yöntemine göre pitavastatin ve pitavastatin + sisplatinin 24 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi. *



*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama $\pm$ standart sapması olarak verilmiştir. Hücre canlılığı kontrole göre değerlendirilmiştir (Pitavastatin ve sisplatin uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır).
^a $p < 0,05$ Negatif kontrol (% 0,5 EtOH içeren besiyeri); ^b $p < 0,05$ Pozitif kontrol (20 µM Sisplatin) ile kıyaslanmıştır.
 (Grafik üzerinde gösterilen konsantrasyon pitavastatine ait olup kombine dozlarda da belirtilen konsantrasyonlarda çalışılmıştır.)

Şekil 4.12. Pitavastatin ve sisplatinin NKA yöntemine göre 24 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sinerjistik sitotoksik etkisi. *

Pitavastatin, 5; 10; 20; 50; 100 ve 200 µM konsantrasyonları tek başına ve 10 ve 20 µM sisplatinle kombine edilerek 24 saat süre ile uygulandı. HeLa hücrelerinde pitavastatin ve sisplatinin hücre canlılığına olan etkisine bakıldığı zaman, (Şekil 4.12.) 5 µM konsantrasyonundan itibaren kontrole göre anlamlı bir sinerjistik sitotoksikite görüldü. Kombine etkinin artan konsantrasyonlarda oluşturduğu sitotoksikitenin doza bağlı olarak arttığı tespit edildi. Pitavastatinin 200 µM ve sisplatinin 10 µM dozunda ($p < 0,001$) kontrole göre canlılığı %70'in altına düşürdüğü görüldü.

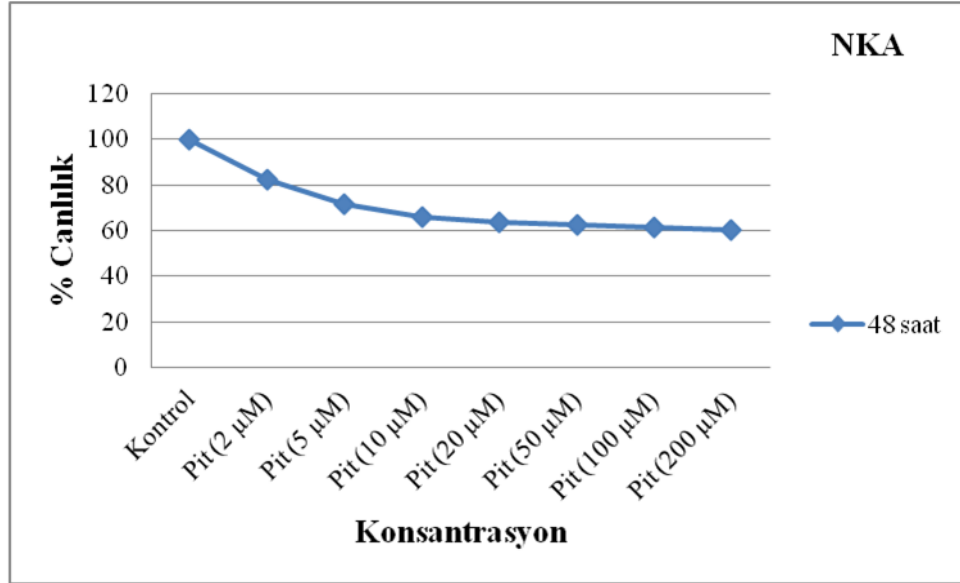
4.2.2. Pitavastatin ve Pitavastatin ile Sisplatinin Kombine Etkisinin 48 Saat Maruziyet Süresinde HeLa Hücrelerinde NKA Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

Tablo 4.5. NKA yöntemine göre pitavastatinin ve pitavastatin + sisplatinin 48 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi. *

	Gruplar	Ortalama Canlı Hücre Yüzdeleri (% $\pm$ standart sapma)
1	Kontrol	100,00 $\pm$ 0,00
2	(+) Kontrol (10 μ M Sisplatin)	90,28 $\pm$ 5,96 ⁺
3	(+) Kontrol (20 μ M Sisplatin)	83,00 $\pm$ 5,00 ⁺
4	2 μ M Pitavastatin	82,37 $\pm$ 4,90 ⁺
5	5 μ M Pitavastatin	71,83 $\pm$ 6,62 ^{++, a, b}
6	10 μ M Pitavastatin	66,15 $\pm$ 7,32 ^{++, a, b}
7	20 μ M Pitavastatin	63,58 $\pm$ 6,28 ^{++, a, c}
8	50 μ M Pitavastatin	62,24 $\pm$ 5,70 ^{++, a, c}
9	100 μ M Pitavastatin	61,17 $\pm$ 5,24 ^{++, a, c}
10	200 μ M Pitavastatin	60,00 $\pm$ 4,72 ^{++, a, c}
	Kombine gruplar	
11	5 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	62,46 $\pm$ 9,25 ^{++, a, c}
12	5 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	61,19 $\pm$ 8,74 ^{++, a, c}
13	10 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	54,50 $\pm$ 7,61 ^{++, a, c}
14	10 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	49,17 $\pm$ 5,26 ^{++, a, c}
15	20 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	50,77 $\pm$ 8,52 ^{++, a, c}
16	20 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	44,99 $\pm$ 4,12 ^{++, a, c}
17	50 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	49,93 $\pm$ 7,40 ^{++, a, c}
18	50 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	46,28 $\pm$ 4,70 ^{++, a, c}
19	100 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	53,30 $\pm$ 4,94 ^{++, a, c}
20	100 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	50,37 $\pm$ 2,14 ^{++, a, c}
21	200 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	49,57 $\pm$ 3,40 ^{++, a, c}
22	200 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	38,46 $\pm$ 0,17 ^{++, a, c}

*Sonn  lar    çalışmanın ortalama $\pm$ standart sapması olarak verilmiştir. H  re canlılığı kontrol grubuna g  re değerlendirilmiştir (Pitavastatin ve sisplatin uygulanmayan grup için h  re canlılığı %100 alınmıştır). Pozitif kontrol olarak 10 μ M ve 20 μ M sisplatin uygulanmıştır. (*p<0,05, **p<0,001, kontrol grubu ile kıyaslanmıştır).

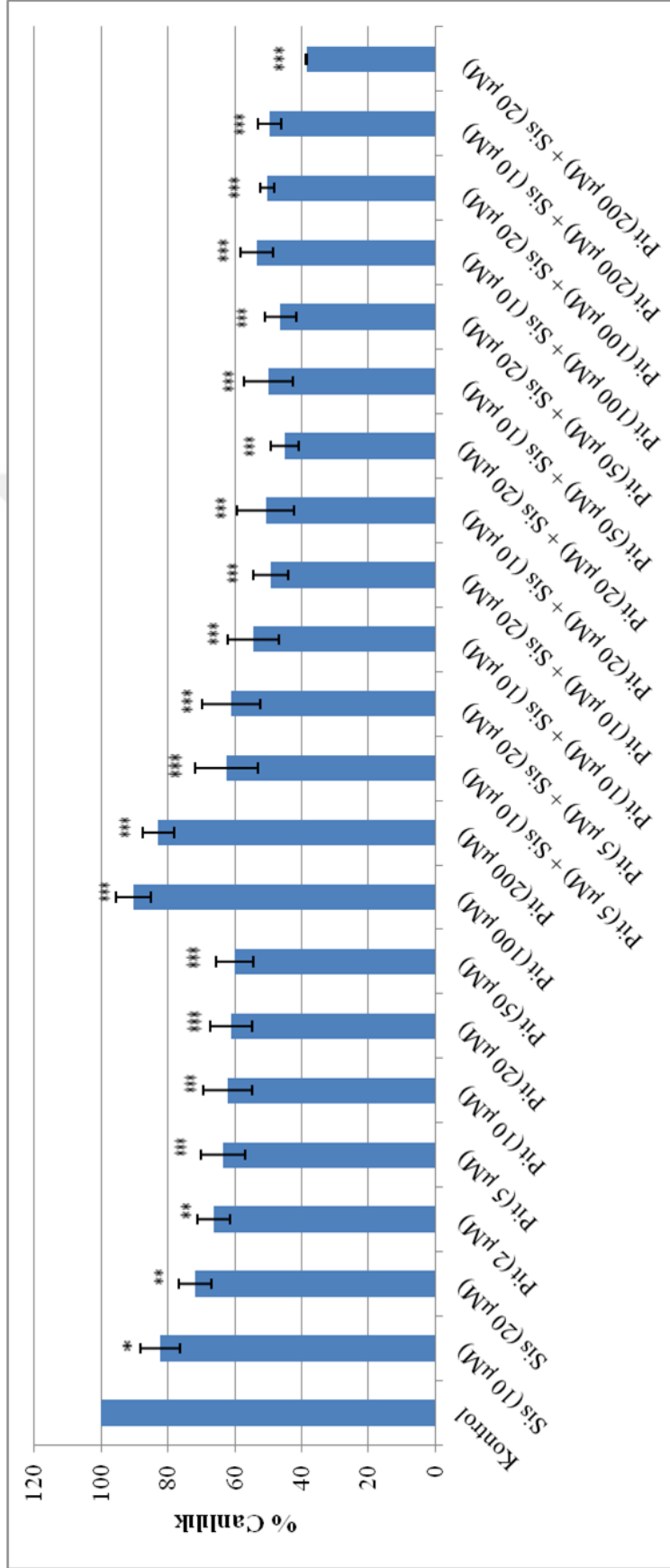
^a p<0,05 pozitif kontrol (10 μ M Sisplatin) ile kıyaslanmıştır. ^b p<0,05, ^c p<0,001, pozitif kontrol (20 μ M Sisplatin) ile kıyaslanmıştır).



*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri olarak verilmiştir.

Şekil 4.13. NKA yöntemine göre farklı konsantrasyonlarda pitavastatin ile 48 saat inkübe edilen HeLa hücrelerinin canlılık yüzdeleri. * (Pit: Pitavastatin)

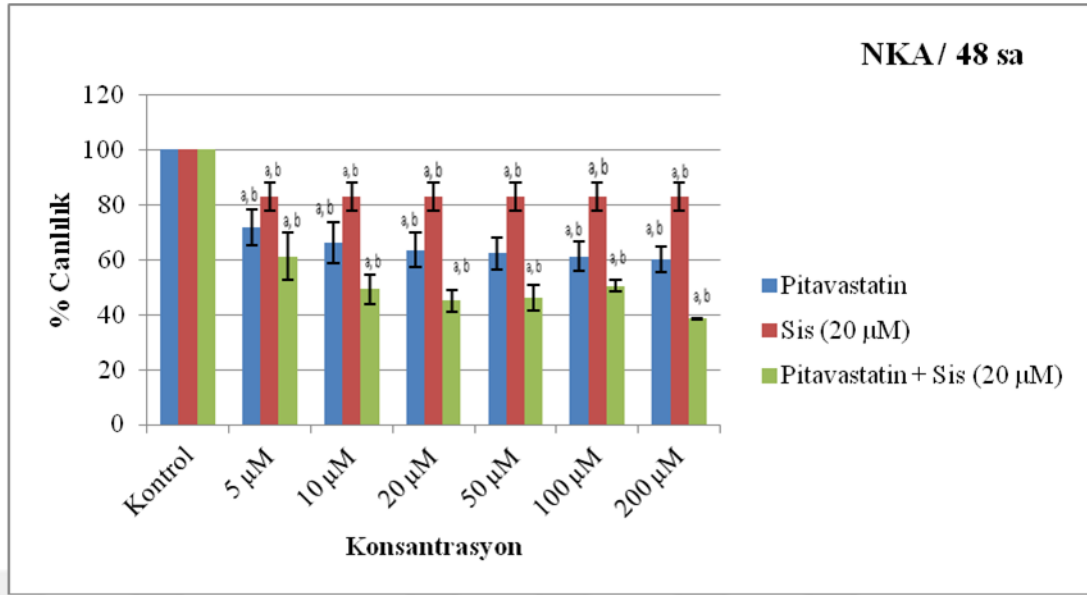
Pitavastatin, 2, 5, 10, 20, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarda 48 saat süre ile uygulandı. HeLa hücrelerinde pitavastatinin hücre canlılığına olan etkisine bakıldığı zaman, (Şekil 4.13.) 2 µM konsantrasyonunda kontrole göre anlamlı bir azalma görüldü ($p < 0,05$). Pitavastatinin 5 µM ($p < 0,001$) artan konsantrasyonlarda oluşturduğu sitotoksitenin doza bağlı olarak arttığı tespit edildi. Pitavastatinin 10 µM ($p < 0,001$) konsantrasyonda kontrole göre canlılığı %70'in altına düşürdüğü görüldü.



(Pit: Pitavastatin ve Sis: Sisplatin)

Sonuçlar üç çalışmanın ortalama $\pm$ standart sapması olarak verilmiştir. Hücre canlılığı kontrole göre değerlendirilmiştir. (Pitavastatin ve sisplatin uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır). ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, kontrol ile kıyaslanmıştır.)

Şekil 4.14. NKA yöntemine göre pitavastatin ve pitavastatin + sisplatinin 48 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi. *



*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Hücre canlılığı kontrole göre değerlendirilmiştir (Pitavastatin ve sisplatin uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır).

^a $p < 0,05$ Negatif kontrol (% 0,5 EtOH içeren besiyeri); ^b $p < 0,05$ Pozitif kontrol (20 µM Sisplatin) ile kıyaslanmıştır.

(Grafik üzerinde gösterilen konsantrasyon pitavastatine ait olup kombine dozlarda da belirtilen konsantrasyonlarda çalışılmıştır.)

Şekil 4.15. Pitavastatin ve sisplatinin NKA yöntemine göre 48 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sinerjistik sitotoksik etkisi. *

Pitavastatin, 5, 10, 20, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonları tek başına ve 10 ve 20 µM sisplatinle kombine edilerek 48 saat süre ile uygulandı. HeLa hücrelerinde pitavastatin ve sisplatinin hücre canlılığına olan etkisi (Şekil 4.15) 5 µM konsantrasyonundan itibaren kontrole göre anlamlı bir sinerjistik sitotoksosite görüldü. Kombine etkinin artan konsantrasyonlarda oluşturduğu sitotoksitenin doza bağlı olarak arttığı tespit edildi. Pitavastatinin 5 µM ve sisplatinin 10 ve 20 µM dozlarında ($p < 0,001$) kontrole göre canlılığı %70'in altına düşürdüğü görüldü.

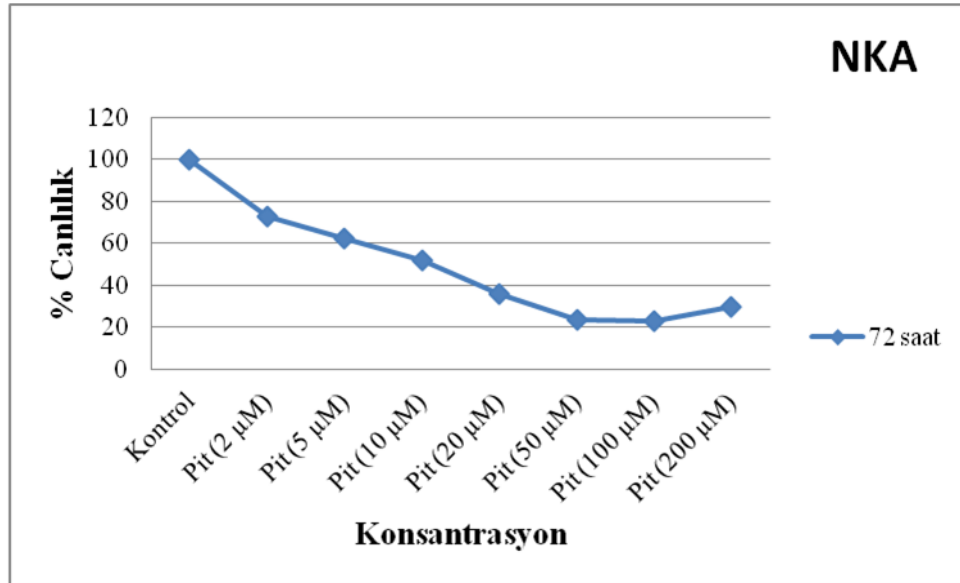
4.2.3. Pitavastatin ve Pitavastatin ile Sisplatinin Kombine Etkisinin 72 Saat Maruziyet Süresinde HeLa Hücrelerinde NKA Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

Tablo 4.6. NKA yöntemine göre pitavastatinin ve pitavastatin + sisplatinin 72 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi. *

	Gruplar	Ortalama Canlı Hücre Yüzdeleri (% $\pm$ standart sapma)
1	(-) Kontrol	100,00 $\pm$ 0,00
2	(+)Kontrol (10 μ M Sisplatin)	73,12 $\pm$ 1,41 ⁺⁺ , a, b
3	(+)Kontrol (20 μ M Sisplatin)	65,20 $\pm$ 4,39 ⁺⁺ , a
4	2 μ M Pitavastatin	72,74 $\pm$ 5,08 ⁺⁺ , b
5	5 μ M Pitavastatin	62,65 $\pm$ 6,11 ⁺⁺ , a
6	10 μ M Pitavastatin	52,00 $\pm$ 11,69 ⁺⁺ , a, c
7	20 μ M Pitavastatin	36,04 $\pm$ 9,50 ⁺⁺ , a, c
8	50 μ M Pitavastatin	23,64 $\pm$ 1,65 ⁺⁺ , a, c
9	100 μ M Pitavastatin	23,03 $\pm$ 0,59 ⁺⁺ , a, c
10	200 μ M Pitavastatin	30,06 $\pm$ 0,90 ⁺⁺ , a, c
Kombine gruplar		
11	5 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	52,48 $\pm$ 0,18 ⁺⁺ , a, c
12	5 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	42,00 $\pm$ 2,55 ⁺⁺ , a, c
13	10 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	35,80 $\pm$ 3,64 ⁺⁺ , a, c
14	10 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	28,35 $\pm$ 2,44 ⁺⁺ , a, c
15	20 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	24,02 $\pm$ 1,76 ⁺⁺ , a, c
16	20 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	21,05 $\pm$ 1,60 ⁺⁺ , a, c
17	50 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	20,62 $\pm$ 0,36 ⁺⁺ , a, c
18	50 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	19,71 $\pm$ 0,35 ⁺⁺ , a, c
19	100 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	21,91 $\pm$ 1,01 ⁺⁺ , a, c
20	100 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	20,47 $\pm$ 0,10 ⁺⁺ , a, c
21	200 μ M Pitavastatin + 10 μ M Sisplatin	29,78 $\pm$ 0,70 ⁺⁺ , a, c
22	200 μ M Pitavastatin + 20 μ M Sisplatin	23,45 $\pm$ 0,66 ⁺⁺ , a, c

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama $\pm$ standart sapması olarak verilmiştir. Hücre canlılığı kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir (Pitavastatin ve sisplatin uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır). Pozitif kontrol olarak 10 μ M ve 20 μ M sisplatin uygulanmıştır. (*p<0,05, **p<0,001, kontrol grubu ile kıyaslanmıştır).

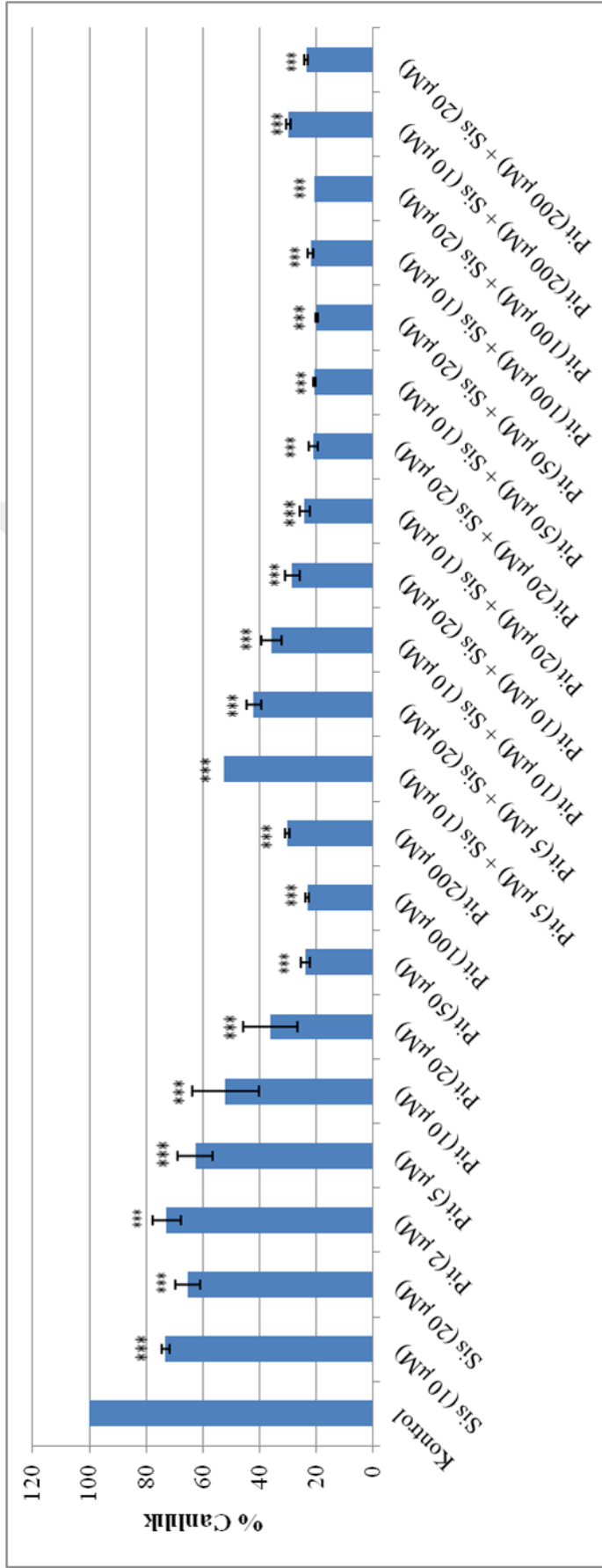
^a p<0,05 pozitif kontrol (10 μ M Sisplatin) ile kıyaslanmıştır. ^b p<0,05, ^c p<0,001, pozitif kontrol (20 μ M Sisplatin) ile kıyaslanmıştır).



*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri olarak verilmiştir.

Şekil 4.16. NKA yöntemine göre farklı konsantrasyonlarda pitavastatin ile 72 saat inkübe edilen HeLa hücrelerinin canlılık yüzdeleri. * (Pit: Pitavastatin)

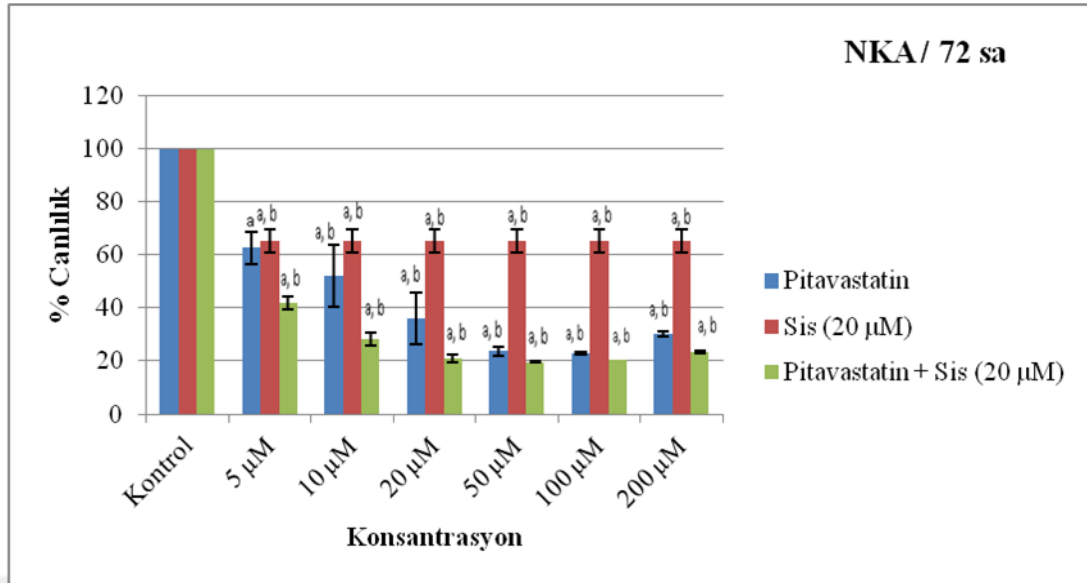
Pitavastatin, 2, 5, 10, 20, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarda 72 saat süre ile uygulandı. HeLa hücrelerinde pitavastatinin hücre canlılığına olan etkisine Şekil 4.16.'ya bakıldığı zaman, 2 µM konsantrasyonunda kontrole göre anlamlı bir azalma görüldü ($p < 0,001$) ve artan konsantrasyonlarda oluşturduğu sitotoksitenin doza bağlı olarak arttığı tespit edildi. Ancak 200 µM konsantrasyonda sitotoksitenin doza bağlı olarak artmadığı tespit edildi. Pitavastatinin 5 µM ($p < 0,001$) konsantrasyonda kontrole göre canlılığı %70'in altına düşürdüğü görüldü.



(Pit: Pitavastatin ve Sis: Sisplatin)

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması ± standart sapması olarak verilmiştir. Hücre canlılığı kontrole göre değerlendirilmiştir (Pitavastatin ve sisplatin uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır). (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, kontrol ile kıyaslanmıştır.)

Şekil 4.17. NKA yöntemine göre pitavastatin ve pitavastatin + sisplatinin 72 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi. *



*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama $\pm$ standart sapması olarak verilmiştir. Hücre canlılığı kontrole göre değerlendirilmiştir (Pitavastatin ve sisplatin uygulanmayan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır).
^a $p < 0,05$ Negatif kontrol (% 0,5 EtOH içeren besiyeri); ^b $p < 0,05$ Pozitif kontrol (20 µM Sisplatin) ile kıyaslanmıştır.

(Grafik üzerinde gösterilen konsantrasyon pitavastatine ait olup kombine dozlarda da belirtilen konsantrasyonlarda çalışılmıştır.)

Şekil 4.18. Pitavastatin ve sisplatinin NKA yöntemine göre 72 saat maruziyet süresinde HeLa hücrelerinde sinerjistik sitotoksik etkisi. *

Pitavastatin, 5, 10, 20, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonları tek başına ve 10 ve 20 µM sisplatinle kombine edilerek 72 saat süre ile uygulandı. HeLa hücrelerinde pitavastatin ve sisplatinin hücre canlılığına olan etkisine bakıldığı zaman, (Şekil 4.18.) 5 µM konsantrasyonundan itibaren kontrole göre anlamlı bir sinerjistik sitotoksikite görüldü. Kombine etkinin artan konsantrasyonlarda oluşturduğu sitotoksikitenin doza bağlı olarak arttığı tespit edildi. Pitavastatinin 5 µM ve sisplatinin 10 ve 20 µM dozlarında ($p < 0,001$) kontrole göre canlılığı %70'in altına düşürdüğü görüldü.

4.3. MTT ve NKA Analiz Sonuçlarının Karşılaştırılması

Bu tez çalışması kapsamında pitavastatin, sisplatin ve pitavastatin+sisplatinin HeLa hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkisi MTT ve NKA canlılık testleri ile belirlenmiş olup, iki farklı canlılık testinden elde edilen sitotoksikite verileri karşılaştırılmıştır. Pitavastatinin gerek tek başına ve gerekse sisplatin ile birlikte uygulanması sonucunda HeLa hücreleri üzerinde meydana gelen sitotoksik etkisiye dair elde edilen veriler incelendiğinde, NKA ile gözlenen sitotoksik etkinin MTT yöntemi ile gözlenen sitotoksik etkiden daha belirgin olduğu görülmüştür.

Her iki yönteme göre de benzer şekilde 72 saat maruziyet süresinde görülen sitotoksik etki 24 ve 48 saat maruziyet sürelerine göre daha yüksektir.



5. TARTIŞMA

Servikal kanser, dünyadaki en yaygın kanserlerden biridir ve yılda yaklaşık 550.000 yeni vaka ve 280.000 ölüm görülmektedir. Birçok gelişmiş ülkede, morbidite ve mortaliteyi azaltmak amacıyla servikal kanser tedavisi için bazı yararlı tarama, etkin tanı ve tedavi stratejileri araştırılmaktadır. Bununla birlikte, serviks kanserinde etkili tedavi yolu geliştirilmesi hala çalışmalar arasında önemli yer tutmaktadır (104). Son zamanlarda, statinlerin lipit düşürücü etkilerinin yanı sıra, birçok katı tümör hücrede apoptozu *in vitro* indükleyebilmelerine, metastazı *in vivo* inhibe edebilmelerine ve böylece antikanser ajan olarak kullanılabilme olasılıklarına ilgi giderek artmaktadır (105).

Bu tez çalışması kapsamında, son yıllarda statinlerin hipolipidemik etkilerinin yanı sıra antikanser etkinliklerini yansıtan çalışmalar ışığında, pitavastatinin HeLa hücrelerinde olası sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi ve mevcut tedavide kullanılan sisplatin ile kombine etkileri ortaya konmuştur. Bu çalışmada, MTT ve NKA yöntemlerinde pitavastatinin HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisinin konsantrasyon artışıyla birlikte artış gösterdiği saptanmıştır. Maddenin IC₅₀ değerleri NKA ve MTT yöntemleri için 72 saat maruziyet süresinde sırasıyla 11,20 µM ve 115,65 µM olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda uyguladığımız sitotoksikite yöntemlerinden olan MTT ile hücre canlılığı değerlendirilen bir çalışmada, lipofilik bir statin olan pitavastatinin, hücre canlılığı ve koloni oluşum testleri kullanılarak olası antikanser etkileri incelenmiştir. Karaciğer kanseri hücrelerinin büyümesini doza bağımlı ve zamana bağlı bir şekilde inhibe ettiği kaydedilmiştir. Koloni oluşumu ise kristal viyole yöntemiyle değerlendirilmiştir (9). Standart melanoma tedavisinde kullanılan dakarbazinin, pitavastatin ile kombine halde insan melanom hücrelerinde antikanser aktivitesini araştıran bir başka çalışmada ise, aynı şekilde hücre canlılığı MTT yöntemiyle değerlendirilmiş ve bizim verilerimizle paralel şekilde kombine tedavinin sinerjistik etkiyle hücre ölümünü artırdığı gösterilmiş olup bu sonucun elde ettiğimiz sonuçlar ile benzer olduğu görülmüştür (106).

Over kanserinde statinlerin tek başına etkisi daha önceki çalışmalarda bildirilmiş olmakla birlikte, hücre ölümüne neden olan ilaç konsantrasyonu, hiperkolesterolemi için statin tedavisi gören hastaların kullandığı ilaç dozundan

oldukça yüksektir. Bilindiği üzere statinler miyopati oluşturma riskine sahiptir. Bunun bir çözümü, gerekli dozu ve olası advers etkileri azaltmak için statinlerle kombinasyon halinde kullanılabilen ilaçları belirlemektir. Bir çalışmada, BH3 mimetik 4-{4-[(4'-kloro-2-bifenil)metil]-1-piperazinil}-N-[(4-{[(2R)-4-(dimetilamino)-1 (fenilsülfanil)-2-bütanil]amino}-3-nitrofenil)sülfonil]benzamid (ABT-737) veya fosfatidilinositol 3-kinaz inhibitörü piktilisib pitavastatin ile kombine edildiğinde, ilaç kombinasyonlarının over kanser hücre hatlarında, hücre ölümünde tek başına pitavastatinden daha etkili olduğu ayrıca ABT-737 veya piktilisib kombinasyonunun, birkaç over kanseri hücre dizisinde pitavastatin tarafından indüklenen hücre ölümünü belirgin şekilde artırdığı kaydedilmiştir (6).

Villarino ve ark. (7) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, pankreas duktal adenokarsinoma hastalarından elde edilen tümör hücrelerinde ve pankreas kanser hücre hatlarında pitavastatinin hücre canlılığını doz bağımlı inhibe ettiği bildirilmiştir. Ayrıca, moleküler seviyede, pitavastatinin, siklin bağımlı kinaz inhibitörü p21'in kolesterol bağımsız bir şekilde sentezlenmesini ve hedef bölgelerinde retinoblastoma tümör baskılayıcı proteininin baskılayıcı fosforilasyonunu bloke ettiği ve G₁/S sınırı boyunca ilerleme için gereken transkripsiyon faktörü olan transkripsiyon uzama faktörü-2 (E2F) hedef genlerin ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir.

In vitro kolon kanser kök hücreleri ve *in vivo* fare tümörü ksenograftlarında pitavastatinin etkilerini inceleyen araştırmacılar bu kök hücrelerin pitavastatin tedavisi ile inhibe edildiği, kök hücre belirteçlerinin ekspresyonunun azaldığı ve hücre apoptozunun indüklendiği sonucunu elde etmişlerdir. Çalışmada, pitavastatinin fare tümörü ksenograftlarının büyümesini inhibe ettiği ve pitavastatinin kolon karsinomasında kök hücrelerin çoğalmasının inhibisyonunda potansiyel bir rolü olduğu belirlenmiştir (10).

Yasui ve ark. (8) antienflamatuvar etkiler de dahil olmak üzere pleiotropik biyolojik etkilere sahip olan pitavastatinin fare modeli kullanarak kolit bağlantılı kolon kanseri gelişimine karşı potansiyel koruyucu özelliğini araştırmışlardır. Pitavastatinin mukozal enflamasyon, oksidatif stres ve hücre proliferasyonunun modülasyonu yoluyla kolit bağlantılı kolon karsinogenezisini inhibe etmede etkili olduğu gözlenmiştir.

Statinlerin antikanser etkileri üzerine dikkat çeken çalışmalar arasında *in vitro*, *in vivo* veya epidemiyolojik çalışmalarda pankreas, karaciğer, over, dil karsinoması, prostat, meme gibi birçok kanser türleri yer almakta olup statinlerin pankreas kanserine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, iki farklı pankreatik kanser hücre hattında hücre canlılığına olan etkisini tripan mavisi ve MTT testleriyle değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada, Akt / protein kinaz B sinyalizasyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Western blotting yönteminin sonuçlarına göre; atorvastatinin pAkt'yi azalttığı belirlenmiştir. Gemsitabin pankreas kanserinin tedavisinde standart kemoterapötik ilaçtır ve kombinasyon tedavisinde atorvastatinin gemsitabin etkisini artırdığı gözlenmiştir. Benzer sonuçlar atorvastatin ve 5-fluorourasil kombine edilerek de elde edilmiştir. Bu etkinin azalmış Akt fosforilasyonu ile ilişkili olduğu ve statinlerin öncelikle pankreatik kanser hücrelerinde P2X7-Akt sinyalizasyonunu hedefleyerek, bu hücreleri kemoterapötik ilaçlara duyarlı hale getirdiği vurgulanmıştır (107).

Zhang ve ark. (105) pitavastatin gibi lipofilik bir statin olan fluvastatinin üç hepatoselüler kanser hücre dizisinde potansiyel antikanser etkisini değerlendirmişlerdir. Fluvastatinin, doza bağımlı bir şekilde apoptoz indüksiyonu yaptığı ve hücre siklusunu G₂/M fazında durdurarak hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Çalışmanın sonunda, fluvastatinin bu hücrelerin invazyon potensini önemli ölçüde düşürdüğü ortaya konmuştur.

Fluvastatinin bu kez insan dili karsinoma hücre dizisi human oral squamous cell carcinoma (HSC-3) hücreleri üzerindeki etkisinin incelendiği bir başka çalışmada, apoptozu başlattığı ve kaspaz-3 aktivitesinde bir artış olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, fluvastatinin dil karsinoması için bir antikanser ajan olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (108).

Fluvastatin ile sisplatin kombinasyonunun epitelyal over kanser hücrelerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada, over kanser hücrelerinden olan SKOV3 hücreleri sisplatine karşı dirençli kabul edilirken; CAO3 hücreleri sisplatine duyarlı olarak kabul edilmektedir. CAO3 hücrelerinde, tek başına fluvastatin ya da sisplatinin hücresel proliferasyonu doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği MTT testi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca, fluvastatin ve sisplatin birlikte uygulandığında sinerjik sitotoksikite gösterdiği, SKOV3 hücrelerinde akış sitometri

analiziyle apopitoza neden olduğu belirtilmiştir. Gözlenen önleyici etkiler, tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmuştur. Çalışmanın sonunda, statinlerin over kanserinin adjuvan tedavisinde kullanılabilecek bir terapötik ajan olabileceği sonucuna varılmıştır (109). Ayrıca, jinekolojik malignansilerde, eşzamanlı statin tedavisinde over kanseri olan kadınlarda sağkalım arasında daha iyi bir korelasyon tespit edildiği belirtilmiştir (110).

Huang ve ark. (111) hepatoselüler hücrelerde hücre canlılığı, hücre çoğalması ve apopitoz düzenlenmesinde simvastatinin rolünü araştırmak ve simvastatinin yer aldığı spesifik düzenleyici mekanizmaları aydınlatmak amacıyla yaptıkları çalışmada MTT, tripan mavisi ve akış sitometrik analizleri gerçekleştirmişlerdir. Çalışmanın sonunda, simvastatinin, tedavi edilmemiş hücelere kıyasla karaciğer kanser hücreleri olan HepG2 ve Huh7 hücrelerinde hücre canlılığını ve proliferasyonu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir.

İnsan prostat kanseri hücrelerinde tek başına veya kombine halde atorvastatin ve aspirinin etkilerini ve mekanizmalarını değerlendiren bir çalışmada, prostat kanseri hücrelerindeki büyüme ve apopitoz, tripan mavisi ve propidyum iyodür boyama deneyleriyle belirlenmiştir. Bu çalışmada, atorvastatin ve aspirinin kombine uygulandıklarında prostat kanseri hücrelerinin büyümesini *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda inhibe ettikleri belirlenmiştir (112).

Park ve ark. (113) statinlerin meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığını doz bağımlı olarak azalttığını kaydetmişlerdir. Bu çalışmada, statinin üçlü negatif meme kanseri hücresi olan triple negative breast cancer (TNBC) hücreleri üzerindeki etkilerine, fosfoinozitid 3-kinaz (PI3K) yolağının aracılık ettiği ek olarak fosfoinozitid 3-kinaz inhibitörünün (LY294002) simvastatinin etkisini artırdığı belirtilmiştir. Simvastatin ile tedavi sonucunda, çeşitli üçlü negatif meme kanser hücrelerinin canlılığının azaldığı belirlenmiştir.

Bütün bunlara ek olarak, statinler esas olarak kanser tedavisi için tasarlanmamıştır, bu nedenle antikanser ajanlar olarak statinlerin etkinliğini optimize etmeden önce antikanser etkileri dikkatlice değerlendirilmeli ve karşılaştırılmalıdır. Jiang ve ark. (74) *in vitro* ortamda insan kanser hücrelerinin büyümesine karşı en iyi üç statinin, test edilen tüm hücrelerde serivastatin, pitavastatin ve fluvastatin olduğunu göstermektedir. Ayrıca, pitavastatinin *in vitro* ve *in vivo* olarak

fluvastatinden daha etkili olduğu belirtilmiştir. Otofaji veya apoptoz mekanizmaları üzerinden statin ve hücre ölümü arasındaki bağlantının anlaşılmasının kanser tedavisine yeni yaklaşımlar geliştirmeye yardımcı olabileceği vurgulanmıştır.

Literatür bilgisi doğrultusunda statinlerin çeşitli kanser türlerinde antitümöral etkilere sahip olduğuna dair çalışmalar mevcut iken, pitavastatinin serviks kanseri üzerindeki etkisi hakkında yeterli düzeyde veri olmadığı görölmektedir (114). Bunun dışında statinler tek başına etkili olmazsa, bu ilaç grubunun kombine tedavilerde etkin bir şekilde kullanılabileceğini gösteren yeterli kanıt vardır. Bunlar arasında, kombinasyon tedavilerinde statinlerin, yaygın olarak reçete edilen sisplatin, metotreksat, 5-florourasil ve doksorubisin gibi antikanser ilaçlarla kombinasyon halinde kullanıldığı ve kanser hücrelerinin antikanser ilaçların etkilerine duyarlı hale getirildiği üzerine birçok çalışma bulunmaktadır. Kolon kanserinde statinler ile ön tedavinin sisplatin kaynaklı apoptozu önemli ölçüde arttırdığı ve kemoterapötik ajanlara dirençten sorumlu P-glikoprotein ekspresyonunu azalttığı kaydedilmiştir. Ayrıca, statinlerin melanom, kolon ve akciğer karsinomunda doksorubisinin antitümör aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (5). Örneklerin tümü, statinlerin adjuvan tedavide kombine halinde ümit verici antikanser ilaçlar olarak kabul edilmesi gerektiğini düşündürmektedir (73).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, pitavastatinin HeLa hücre proliferasyonunu azalttığı, sitotoksisite yöntemlerinden MTT ve NKA ile belirlenmiş, servikal kanser tedavisinde kullanılan sisplatinle birlikte sitotoksik gücünün arttığı ilk kez tarafımızdan gösterilmiştir. Pitavastatinin HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisi olduğunun gösterilmesi ve sisplatinle kombinasyonu ile artan sitotoksik etkisinin her iki sitotoksisite yöntemi ile ortaya konması tez çalışmasının başarısı adına bir ölçü olabilir. Ancak, altında yatan olası moleküler mekanizmaların aydınlatılmasıyla çalışmanın ileri bir noktaya getirileceği kabul edilmeli ve ileri araştırmalar için bir başlangıç çalışması rolü üstlenebileceği belirtilmelidir. Pitavastatinin HeLa hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin altında yatan mekanizmaların tam olarak aydınlatılabilmesi için ileri bilimsel çalışmalara gereksinim olduğu açıktır. Ayrıca, bu konudaki araştırmaların kapsamı genişletilerek *in vivo*, *in vitro* ve klinik çalışmalarla desteklenmelidir. Elde ettiğimiz sonuçların literatürle uyumlu olması ve pitavastatinin sisplatin kombinasyonu ile sitotoksik etkisinin artış göstermesi, pitavastatinin servikal kanser tedavisi araştırmalarında kullanılabilecek potansiyel adaylardan olabileceğini düşündürmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Newton CL, Mould TA. Invasive cervical cancer. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*. 2017;27(1):7-13.
2. Gökçe Ö, Yılmaz A, Gürbüz V, Konaç E, Ekmekçi A. İnsan servikal kanser Hela hücrelerinde Vinorelbin'in apoptotik etkisi. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2011;25(1):5-14.
3. Qin G, Li P, Xue Z. Effect of allyl isothiocyanate on the viability and apoptosis of the human cervical cancer HeLa cell line in vitro. *Oncology letters*. 2018;15(6):8756-60.
4. Chan KK, Oza AM, Siu LL. The statins as anticancer agents. *Clinical cancer research*. 2003;9(1):10-9.
5. Kabel AM. Statins: a new hope for cancer therapy. *J Cancer Res Treatment*. 2013;1:36-8.
6. De Wolf E, De Wolf C, Richardson A. ABT-737 and pictilisib synergistically enhance pitavastatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells. *Oncology letters*. 2018;15(2):1979-84.
7. Villarino N, Signaevskaia L, van Niekerk J, Medal R, Kim H, Lahmy R, et al. A screen for inducers of bHLH activity identifies pitavastatin as a regulator of p21, Rb phosphorylation and E2F target gene expression in pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2017;8(32):53154.
8. Yasui Y, Suzuki R, Miyamoto S, Tsukamoto T, Sugie S, Kohno H, et al. A lipophilic statin, pitavastatin, suppresses inflammation-associated mouse colon carcinogenesis. *International journal of cancer*. 2007;121(10):2331-9.
9. You H-Y, Zhang W-J, Xie X-M, Zheng Z-H, Zhu H-L, Jiang F-Z. Pitavastatin suppressed liver cancer cells in vitro and in vivo. *OncoTargets and therapy*. 2016;9:5383.
10. Zhang Z, Zheng S, Yang W, Yang C, Yuan W. Targeting colon cancer stem cells with novel blood cholesterol drug pitavastatin. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(6):1226-33.
11. Hemaiswarya S, Doble M. Combination of phenylpropanoids with 5-fluorouracil as anti-cancer agents against human cervical cancer (HeLa) cell line. *Phytomedicine*. 2013;20(2):151-8.
12. Baykara O. Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2016;5(3):154-65.
13. Bilir N. Sigara ve kanser. Ankara: Klasmat Matbaacılık; 2008.
14. Kutluk T, Kars A. General information about cancer. Ankara: Turkish Association for Cancer Research & Control Publications2001[Turkish]. 1994.
15. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*. 2011;144(5):646-74.

16. What Is Cancer? [Internet]. 2015 [Erişim Tarihi 24 Mayıs 2018]. Erişim adresi: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
17. Yavuz B. Klorojenik Asidin İnsan Servikal Kanseri Hücreleri (Hela) Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Araştırılması [Yüksek lisans tezi]. Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi; 2006.
18. Porter R. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. Whitehouse Station, NJ: Merck & Co., Inc.; 2006. 2009.
19. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Molecular aspects of medicine*. 2000;21(6):167-223.
20. Burkitt MD, Duckworth CA, Williams JM, Pritchard DM. *Helicobacter pylori*-induced gastric pathology: insights from in vivo and ex vivo models. *Disease models & mechanisms*. 2017;10(2):89-104.
21. Kamzol W, Jaglarz K, Tomaszewski KA, Puskulluoglu M, Krzemieniecki K. Assessment of knowledge about cervical cancer and its prevention among female students aged 17–26 years. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2013;166(2):196-203.
22. Yokuş B, Çakır DÜ. Kanseri biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2012(1):7-18.
23. Calaf GM, Urzua U, Termini L, Aguayo F. Oxidative stress in female cancers. *Oncotarget*. 2018;9(34):23824.
24. Herceg Z, Hainaut P. Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis. *Molecular oncology*. 2007;1(1):26-41.
25. Özenoğlu S, Aydoğdu G, Dinçsoy AB, Taghidizaj AA, Derici K, Yılmaz E, et al. Liken sekonder bileşiklerinin farklı insan kanseri hücre tipleri üzerine antikanserojenik etkisi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 2013;70(4):215-26.
26. Futreal PA, Kasprzyk A, Birney E, Mullikin JC, Wooster R, Stratton MR. Cancer and genomics. *Nature*. 2001;409(6822):850.
27. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *cell*. 2000;100(1):57-70.
28. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009;30(7):1073-81.
29. Gruenbacher G, Thurnher M. Mevalonate metabolism in cancer. *Cancer letters*. 2015;356(2):192-6.
30. Cabadak H. Hücre siklusu ve kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. 2008;9(3):51-61.
31. Canpolat F. Hücre Siklusu ve Apoptoz. *Güncel Dermatoloji Dergisi*. 2016;1(1):11-7.
32. Kasap H. Tıbbi Biyoloji ve Genetik. Adana: Nobel Kitabevi; 2010.

33. Genç AC, Hacibekiroğlu İ. Mikrobiyota ve Kanser. *Journal of biotechnology and strategic health research*.1:123-31.
34. Whitaker K, Smith CF, Winstanley K, Wardle J. What prompts help-seeking for cancer 'alarm'symptoms? A primary care based survey. *British journal of cancer*. 2016;114(3):334.
35. Traxler P. Tyrosine kinases as targets in cancer therapy–successes and failures. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2003;7(2):215-34.
36. Abudayyak M, Yalçın CÖ, Korkut E. Kemoterapi İle İndüklenmiş Periferik Nöropatinin Tedavisi ve Önlenmesine Yönelik Farmakolojik Yaklaşımlar. *FABAD J Pharm Sci*. 2018;43(2):113-27.
37. Tozkoparan B, Aytaç SP. Kanser kemoterapisinde terapötik hedef olarak glutatyon s-transferazlar. *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*. 2007;27(2):139-64.
38. Waters JP, Pober JS, Bradley JR. Tumour necrosis factor and cancer. *The Journal of pathology*. 2013;230(3):241-8.
39. Ricci MS, Zong W-X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *The oncologist*. 2006;11(4):342-57.
40. Proskuryakov SY, Gabai V, Konoplyannikov A. Necrosis is an active and controlled form of programmed cell death. *Biochemistry (Moscow)*. 2002;67(4):387-408.
41. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*. 2004;306(5698):990-5.
42. Weaver BA, Cleveland DW. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer cell*. 2005;8(1):7-12.
43. Cervical cancer treatment [Internet]. 2018 [Erişim Tarihi 24 Mayıs 2018]. Erişim adresi: https://www.cancer.gov/types/cervical/patient/cervical-treatment-pdq#link/_290_toc.
44. Female reproductive system [Internet]. 2009 [Erişim Tarihi 24 Mayıs 2018]. Erişim adresi: <https://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR609921.jpg>.
45. Priya R, Hemavathi D, Hascitha J, Abirami S, Rajkumar T. Immunotherapy for cervical cancer-can it do another lung cancer? *Current problems in cancer*. 2018.
46. Basu P, Mittal S, Vale DB, Kharaji YC. Secondary prevention of cervical cancer. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2017.
47. Koç F, Akşit S, Kurugöl Z, Koturoğlu G, Halicioğlu O, Aslan A. Serviks Kanseri Hakkında Hekimlerin Bilgi Düzeyleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2010;20(5):281-6.
48. Wuertz BR, Darrah L, Wudel J, Ondrey FG. Thiazolidinediones abrogate cervical cancer growth. *Experimental cell research*. 2017;353(2):63-71.

49. Kessler TA, editor Cervical cancer: Prevention and early detection. Seminars in oncology nursing; 2017: Elsevier.
50. Kumar D, Basu S, Parija L, Rout D, Manna S, Dandapat J, et al. Curcumin and Ellagic acid synergistically induce ROS generation, DNA damage, p53 accumulation and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. Biomedicine & pharmacotherapy. 2016;81:31-7.
51. Xiao X, He Q, Lu C, Werle KD, Zhao R-X, Chen J, et al. Metformin impairs the growth of liver kinase B1-intact cervical cancer cells. Gynecologic oncology. 2012;127(1):249-55.
52. Cervical cancer [Internet]. 2015 [Erişim Tarihi 3 Mayıs 2018]. Erişim adresi: <http://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/cervical-cancer/en/>
53. Kanbur AGA, apik YDDC. Servikal kanserden korunma, erken tanı-tarama yöntemleri ve ebe/hemşirenin rolü. Hacettepe Üniversitesi Hemřirelik Fakóltesi Dergisi. 2011;18(1):061-72.
54. Tu LY, Bai HH, Cai JY, Deng SP. The mechanism of kaempferol induced apoptosis and inhibited proliferation in human cervical cancer SiHa cell: From macro to nano. Scanning. 2016;38(6):644-53.
55. Serkies K, Jassem J. Systemic therapy for cervical carcinoma–current status. Chinese Journal of Cancer Research. 2018;30(2):209.
56. Tyszkiewicz-Czochara M, Bukowska-Strakova K, Majka M. Metformin and caffeic acid regulate metabolic reprogramming in human cervical carcinoma SiHa/HTB-35 cells and augment anticancer activity of Cisplatin via cell cycle regulation. Food Chem Toxicol. 2017;106:260-72.
57. Temel MK. Sitotoksik kemoterapötiklerin yirminci yüzyıldaki gelişimi. Turkish Journal of Oncology/Türk Onkoloji Dergisi. 2015;30(1).
58. Erkurt MA, Kuku İ, Kaya E, Aydoğdu İ. Kanser kemoterapisi ve böbrek. Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi. 2009;16(1).
59. Bibu JK. Antineoplastic Drugs: Treatment Principles and Toxicity. Veterinary World. 2011;4(8):380.
60. Johnstone TC, Park GY, Lippard SJ. Understanding and improving platinum anticancer drugs–phenanthriplatin. Anticancer research. 2014;34(1):471-6.
61. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. Nature reviews Drug discovery. 2005;4(4):307.
62. Cisplatin [Internet]. 2018 [Erişim Tarihi 4 Mayıs 2018]. Erişim adresi: https://www.drugs.com/mtm/cisplatin.html_Cİ.
63. Alborzinia H, Can S, Holenya P, Scholl C, Lederer E, Kitanovic I, et al. Real-time monitoring of cisplatin-induced cell death. PloS one. 2011;6(5):e19714.
64. Erdemli EA, Ergeneci D, Atahan ř, Işıkay L. Cisplatinin sian böbrek ve testisleri üzerine etkileri. Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi Mecmuası. 1999;52(03).

65. Dilek İ. Kemoterapide toksisite değerlendirmesi. Türk Hematoloji Derneği. 2010.
66. Corrie PG. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine*. 2011;39(12):717-22.
67. Akçalı A. Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi. *Türk Onkoloji Dergisi*. 2010;25(3):119-23.
68. Gilgenkrantz S. Sixty years of HeLa cell cultures. *Histoire des sciences medicales*. 2014;48(1):139-44.
69. Gamble VN. The immortal life of Henrietta Lacks reconsidered. *Hastings Center Report*. 2014;44(1):inside back cover-inside back cover.
70. ATCC (American Type Culture Collection): The Global Bioresource Center. [Erişim tarihi 03 Haziran 2018]. Erişim adresi: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-2.aspx?geo_country=tr
71. Yılmaz A. H1-60 Hücre Hattında Mevastatin ve 5-Aza-2-Deoksitidin Apoptotik ve Epigenetik Etkilerinin Belirlenmesi [Doktora tezi]. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2011.
72. Kato S, Smalley S, Sadarangani A, Chen-Lin K, Oliva B, Branes J, et al. Lipophilic but not hydrophilic statins selectively induce cell death in gynaecological cancers expressing high levels of HMGCoA reductase. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010;14(5):1180-93.
73. Matuszewicz L, Meissner J, Toporkiewicz M, Sikorski AF. The effect of statins on cancer cells. *Tumor Biology*. 2015;36(7):4889-904.
74. Jiang P, Mukthavaram R, Chao Y, Nomura N, Bharati I, Fogal V, et al. In vitro and in vivo anticancer effects of mevalonate pathway modulation on human cancer cells. *British journal of cancer*. 2014;111(8):1562.
75. Wong WW, Dimitroulakos J, Minden M, Penn L. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia*. 2002;16(4):508.
76. Sabuncu T, Sönmez A, Bayram F, Cesur M, Aydoğdu A, İzol Torun AN, ve ark. Lipid metabolizma bozuklukları tanı ve tedavi kılavuzu. 4. Baskı. Ankara: Miki Matbaacılık; 2017.
77. Ansari JA, Bhandari U, Haque S, Pillai K. Enhancement of antioxidant defense mechanism by pitavastatin and rosuvastatin on obesity-induced oxidative stress in Wistar rats. *Toxicology mechanisms and methods*. 2012;22(1):67-73.
78. Başkurt M, Ökçün B, Ersanli M. Statinlerin pleiotropik etkileri. *Türkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences*. 2006;2(7):66-72.
79. Pisanti S, Picardi P, Ciaglia E, D'Alessandro A, Bifulco M. Novel prospects of statins as therapeutic agents in cancer. *Pharmacol Res*. 2014;88:84-98.
80. Osmak M. Statins and cancer: current and future prospects. *Cancer letters*. 2012;324(1):1-12.

81. Thurnher M, Nussbaumer O, Gruenbacher G. Novel aspects of mevalonate pathway inhibitors as antitumor agents. *Clinical Cancer Research*. 2012;clincanres. 0489.2012.
82. Saito Y. Pitavastatin: an overview. *Atherosclerosis Supplements*. 2011;12(3):271-6.
83. Yee LL, Wright EA. Pitavastatin calcium: clinical review of a new antihyperlipidemic medication. *Clinical therapeutics*. 2011;33(8):1023-42.
84. Ahmad H, Cheng-Lai A. Pitavastatin: a new HMG-CoA reductase inhibitor for the treatment of hypercholesterolemia. *Cardiology in review*. 2010;18(5):264-7.
85. da Silva PM. Are All Statins the Same? *American Journal of Cardiovascular Drugs*. 2011;11(2):93-107.
86. Duggan ST. Pitavastatin. *Drugs*. 2012;72(4):565-84.
87. Sansoy V. Pitavastatinin etkinliği ve gvenliği. *Turk Kardiyol Dern Ars*. 2017;45(3):1-4.
88. Koylan N. Pitavastatin–tolerabilite ve yan etki profili. *Turk Kardiyol Dern Ars*. 2017;45(3):16-23.
89. Tokur O, Aksoy A. In vitro sitotoksisite testleri. *Harran Üniversitesi Vet Fakültesi Derg*. 2017;6:112-8.
90. şahin E. Resveratrol İle Muamele Edilmiş Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücre Sitokinlerinin A549 Kanser Hücresine Etkilerinin Araştırılması [Doktora tezi]. Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi; 2015.
91. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell stem cell*. 2008;2(4):313-9.
92. Uzun İH, Bayındır F. Dental materyallerin biyoyumluluk test yöntemleri. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakltesi Dergisi*. 2011;28(2):115-22.
93. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique. Wiley, New York1994.
94. Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in vitro*. 2004;18(5):703-10.
95. Kalkan R. Sitotoksisite Analizleri [Bildiri]. Yakın Doğu Üniversitesi Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi Uygulamalı Hücre Kültürü Kursu; 3-4 Haziran 2016; Lefkoşa, KKTC.
96. Terzioğlu G, Keskin A, Demirel G. Hücre Proliferasyonu lm Yöntemleri ve çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması. *Turk J Immunol*. 2013;1:74-89.
97. Karaboğa Arslan AK. A-Chaconine ve A-Solanine’in Antikanserojen Etkilerinin RL95-2 Hücrelerinde Araştırılması [Doktora tezi]. Kayseri: Erciyes Üniversitesi; 2017.

98. Fernandes AP, Junqueira MdA, Marques NCT, Machado MAAM, Santos CF, Oliveira TM, et al. Effects of low-level laser therapy on stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Journal of Applied Oral Science*. 2016;24(4):332-7.
99. Bacanlı M. Bitkisel Kaynaklı Fenolik Yapıdaki Bileşiklerin Olası Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi [Doktora tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2014.
100. Repetto G, Del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*. 2008;3(7):1125.
101. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*. 1985;24(2-3):119-24.
102. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods*. 1986;89(2):271-7.
103. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.
104. Chen X-F, Liu Y. MicroRNA-744 inhibited cervical cancer growth and progression through apoptosis induction by regulating Bcl-2. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;81:379-87.
105. Zhang W, Wu J, Zhou L, Xie H-Y, Zheng S-S. Fluvastatin, a lipophilic statin, induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells through mitochondria-operated pathway. *Indian J Exp Biol*. 2010;48(12):1167-74.
106. Al-Qatati A, Aliwaini S. Combined pitavastatin and dacarbazine treatment activates apoptosis and autophagy resulting in synergistic cytotoxicity in melanoma cells. *Oncology letters*. 2017;14(6):7993-9.
107. Mistafa O, Stenius U. Statins inhibit Akt/PKB signaling via P2X7 receptor in pancreatic cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2009;78(9):1115-26.
108. Fujiwara K, Tsubaki M, Yamazoe Y, Nishiura S, Kawaguchi T, Ogaki M, et al. Fluvastatin induces apoptosis on human tongue carcinoma cell line HSC-3. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 2008;128(1):153-8.
109. Taylor-Harding B, Orsulic S, Karlan BY, Li AJ. Fluvastatin and cisplatin demonstrate synergistic cytotoxicity in epithelial ovarian cancer cells. *Gynecologic oncology*. 2010;119(3):549-56.
110. Elmore RG, Ioffe Y, Scoles DR, Karlan BY, Li AJ. Impact of statin therapy on survival in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 2008;111(1):102-5.
111. Huang X, Ma J, Xu J, Su Q, Zhao J. Simvastatin induces growth inhibition and apoptosis in HepG2 and Huh7 hepatocellular carcinoma cells via upregulation of Notch1 expression. *Molecular medicine reports*. 2015;11(3):2334-40.

112. He Y, Huang H, Farischon C, Li D, Du Z, Zhang K, et al. Combined effects of atorvastatin and aspirin on growth and apoptosis in human prostate cancer cells. *Oncology reports*. 2017;37(2):953-60.
113. Park YH, Jung HH, Ahn JS, Im Y-H. Statin induces inhibition of triple negative breast cancer (TNBC) cells via PI3K pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;439(2):275-9.
114. Crescencio ME, Rodríguez E, Páez A, Masso FA, Montaña LF, López-Marure R. Statins inhibit the proliferation and induce cell death of human papilloma virus positive and negative cervical cancer cells. *International journal of biomedical science: IJBS*. 2009;5(4):411.



8.EKLER

EK-1. Orjinallik Ekran Çıktısı



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	Aysun Ökçesiz
Ödev başlığı:	aysun YL tez
Gönderi Başlığı:	PİTAVASTATİN SİTOKSİSİTESİN.
Dosya adı:	Aysun_YL_TEZ_Turnitin.docx
Dosya boyutu:	1.94 M
Sayfa sayısı:	89
Kelime sayısı:	15,961
Karakter sayısı:	108,742
Gönderim Tarihi:	13-Ağu-2018 04:04 PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	989672057

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PİTAVASTATİN SİTOKSİSİTESİNİN SERVİKS KANSER
HÜCRE (HELA) HATTINDA DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Aysun ÖKÇESİZ

Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2018

Copyright 2018 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

PİTAVASTATİN SİTOTOKSİSİTESİNİN SERVİKS KANSER HÜCRE (HELA) HATTINDA DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%17	%8	%4	%12
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	%4
2	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	%3
3	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	%2
4	onkder.org İnternet Kaynağı	%1
5	dergi.omu.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
6	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	%1
7	Submitted to Adnan Menderes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
8	ivekkongre.com İnternet Kaynağı	<%1

9. ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı ve Soyadı: Aysun ÖKÇESİZ

Doğum Yeri: Kayseri

Doğum Tarihi: 13/07/1992

Uyruğu: T.C.

Adresi: Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim
Dalı 38039 Melikgazi/KAYSERİ

Telefon :(0352) 2076666/28276

E-mail: aysunokcesiz@erciyes.edu.tr

Ünvanı: Eczacı

Yabancı Dil: İngilizce (YDS 70)

II- Eğitimi

2016 – 2018: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji
Anabilim Dalı (Yüksek Lisans)

2011 – 2016: Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (Lisans)

2007 – 2011: Nuh Mehmet Küçükçalık Anadolu Lisesi

1999 – 2007: TED Kayseri Koleji Vakfı Özel İlköğretim Okulu

III- Mesleki Deneyimi

2016 – Devam ediyor Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi- Araştırma Görevlisi

IV- Bilimsel Faaliyetleri

Yayınları:

Ulusal Dergilerde Yayınlanan Makaleler:

Ökçesiz A., Ündeğer Bucurgat Ü., “Sitotoksisite Çalışmalarında Kök Hücre”, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 2018, Kabul edildi.

Onbaşlı D., Yuvalı Çelik G., **Ökçesiz A.**, "Mikrobiyal Biyofilmlere Karşı Yeni Antibiyofilm Stratejileri ve Nanoteknolojik Yaklaşımlar", Sağlık Bilimleri Dergisi, cilt.26, ss.262-266, 2017

Hakemli Kongre / Sempozyumların Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar:

Eken A., Bakir E. , **Ökçesiz A.**, "Protective effects of chlorogenic acid and vitamin c against oxidative stress caused by dimethoate in human erythrocytes", 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), ANKARA, TÜRKİYE, 26-29 Haziran 2018, pp.1-1

Eken A., Karaboğa Arslan A.K. , Öztürk E., **Ökçesiz A.**, Aycan M.B., "Cytotoxic effects of coumarin compounds imperatorin and osthole, alone and in combination with 5-fluorouracil in colon carcinoma cells", 2nd NPCPT International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy, KAYSERİ, TÜRKİYE, 8-11 Kasım 2017, vol.1, no.10, pp.1003-1003

Ökçesiz A., Onbaşlı D., Yuvalı Çelik G., Fidan S., "New Antibiofilm Strategies and Nanotechnological Approaches Against Microbial Biofilms", 3st International Nanoscience&Nanotechnology for Next Generation Conference, ANTALYA, TÜRKİYE, 20-22 Ekim 2016, pp.117-117

Katıldığı kongreler, sempozyum vb:

12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara, Haziran 2018

Hacettepe Farmasötik Toksikoloji Günleri-1, Ankara, Ocak 2018

2nd NPCPT International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy, Kayseri, Kasım 2017

IV. Toksikoloji Sempozyumu "Toksikolojide Kariyer Günleri", Eskişehir, Ocak 2017