

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

**PİTAVASTATİNİN SİSPLATİN İLE BİRLİKTE
ANTİKANSEROJEN ETKİLERİNİN İNSAN SERVİKS KANSER
HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Ecz. Aysun ÖKÇESİZ HACİSEYİTOĞLU

**Farmasötik Toksikoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2024

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

**PİTAVASTATİNİN SİSPLATİN İLE BİRLİKTE
ANTİKANSEROJEN ETKİLERİNİN İNSAN SERVİKS KANSER
HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Ecz. Aysun ÖKÇESİZ HACİSEYİTOĞLU

**Farmasötik Toksikoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

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

**İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşe EKEN**

**ANKARA
2024**

ONAY SAYFASI

PİTAVASTATİNİN SİSPLATİN İLE BİRLİKTE ANTİKANSEROJEN ETKİLERİNİN İNSAN SERVİKS KANSER HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI

Uzm. Ecz. Aysun ÖKÇESİZ HACİSEYİTOĞLU
Danışman: Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT
İkinci Danışman: Prof. Dr. Ayşe EKEN

Bu tez çalışması 03.01.2024 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Toksikoloji
Doktora Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. A. Nurşen BAŞARAN*
Başkent Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Terken BAYDAR*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Ü. Pınar ERKEKOĞLU*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ*
Ankara Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ*
Hacettepe Üniversitesi

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

18 Ocak 2024

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN
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 tezim 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 tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

08/12/2023

Aysun Ökçesiz Hacıseyitoğlu

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 ve Prof. Dr. Ayşe EKEN eş danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Aysun ÖKÇESİZ HACISEYİTOĞLU

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi, birikim ve deneyimlerini 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 Başkanım ve ikinci danışman hocam Prof. Dr. Ayşe EKEN'e ve anabilim dalımızın kıymetli hocaları Dr. Öğr. Üyesi İ. İpek BOŞGELMEZ, Doç. Dr. Burcu ÜNLÜ ENDİRLİK ve Dr. Öğr. Üyesi Elçin BAKIR'a,

Tez deneylerim sırasında bilgi ve deneyimlerini paylaşarak destek olan Prof. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ'e ve Doç. Dr. Hande Canpınar'a,

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

Dostlukları ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan desteklerini her zaman özveri ile gösteren Hacettepe Üniversitesi ve Erciyes Üniversitesi'ndeki tüm araştırma görevlisi dostlarıma,

Beni özveriyle yetiştirerek bu günlere getiren her zaman yanımda olan ve varlıklarıyla bana güç veren canımdan çok sevdiğim biricik aileme,

Ve bu süreçte bana her zaman destek olan değerli eşime en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Hacettepe Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (THD-2019-17809) ve Erciyes Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (TDK-2021-10828) tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Ökçesiz Haciseyitoğlu, A., Pitavastatinin Sisplatin ile Birlikte Antikanserojen Etkilerinin İnsan Serviks Kanser Hücrelerinde Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2024. Serviks kanseri, günümüzde dünya genelinde kadınlarda en yaygın görülen malign tümörlerden biridir. Pitavastatin, hiperkolesterolemi tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) redüktaz inhibitörüdür ve son yıllarda antikanser etkisi üzerinde durulmaktadır. Bu çalışmada, pitavastatinin serviks kanseri hücreleri (HeLa) üzerindeki olası antikanser etkilerinin *in vitro* koşullarda belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle, akım sitometrisinde hücre apoptozu ve hücre döngüsü analizleri yapılmıştır. Genotoksik etkiler standart Comet deneyi ve formamidopirimidin glikozilaz (fpg) ile modifiye edilmiş Comet deneyi ile değerlendirilmiştir. HeLa hücrelerinde hücre içi reaktif oksijen bileşikleri (ROB) seviyeleri ölçülmüştür. Ayrıca, apoptoz ile ilgili proteinlerin etkileri kaspaz 3/8/9 test kiti ve Western blot ile değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, hücre döngüsü analizinde, subG1 oranında bir artışın olduğu ve HeLa hücrelerinde apoptozun indüklendiği gözlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda pitavastatinin ROB oluşumuna neden olduğu görülmüştür. DNA hasarı, kontrole kıyasla 20 µM konsantrasyonun üzerinde önemli ölçüde artmıştır. Pitavastatinin HeLa hücrelerinde kaspaz-9 ve -3 ekspresyonunu ve bölünmüş poli adenzin difosfat riboz polimerazı (PARP) artırdığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, pitavastatinin sisplatin ile kombine etkisinin tek başına etkisinden daha güçlü olduğu ve pitavastatinin servikal kanser tedavisi araştırmalarında kullanılmak üzere potansiyel bir aday olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Comet, HeLa, Serviks Kanseri, Pitavastatin.

ABSTRACT

Ökçesiz Haciseyitoğlu, A., Investigation of Anticarcinogenic Effects of Pitavastatin with Cisplatin in Human Cervical Cancer Cells, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Doctor of Philosophy Thesis in Pharmaceutical Toxicology, Ankara, 2024. Cervical cancer is one of the most widespread malignant tumors in women around the world today. Pitavastatin is a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitor widely used to treat hypercholesterolemia and in recent studies focuses that its anticancer effect. In this thesis study, it was aimed to determine the possible anticancer effects of pitavastatin on cervical cancer cells (HeLa) under in vitro conditions. For this reason, cell apoptosis and cell cycle analyses were performed in flow cytometry. Genotoxic effects were assessed with standard Comet assay and formamidopyrimidine glycosylase (fpg)-modified Comet assay. Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were measured in HeLa cells. Also, the effects of apoptosis related proteins were evaluated by caspase 3/8/9 multiple assay kit and Western blotting. According to results, in cell cycle analysis, an increased proportion of sub G1 cells was monitored and induced apoptosis in HeLa cells. Pitavastatin was shown to cause the generation of ROS in high concentrations. DNA damage increased significantly above the 20 µM concentration compared to the control. It was observed that pitavastatin increased the expression of active caspase-9 and -3 and upregulated cleaved poly adenosine diphosphate ribose polymerase (PARP) in HeLa cells. In conclusion, it was shown that the combined effect of pitavastatin with cisplatin was stronger than its solo effect and pitavastatin may be a potential candidate for use in cervical cancer treatment research.

Key Words: Apoptosis, Comet, HeLa, Cervical Cancer, Pitavastatin.

İÇİNDEKİLER

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	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Serviks Anatomisi ve Görevi	2
2.2. Serviks Kanseri	3
2.3. Servik Kanseri Tanısı ve Tedavisi	5
2.3.1. Sisplatin	6
2.4. Statinler	11
2.4.1. Statinlerin Toksikokinetik Etkileri	12
2.4.2. Statinlerin Advers Etkileri	15
2.4.3. Statinlerin Pleotropik Etkileri	17
2.5. Pitavastatin	28
2.6. Tez Çalışmasında Kullanılan Yöntemler	32
2.6.1. Kullanılan Hücre Hattı: HeLa Hücre Hattı	32
2.6.2. Apoptozun Değerlendirilmesi	33
2.6.3. Genotoksisitenin Değerlendirilmesi	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM	48
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	48
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	49
3.3. Hazırlanan Çözeltiler	50
3.3.1. Yapılan Analizlerde Kullanılan Pitavastatin Çözeltileri	50
3.3.2. Apoptoz Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler	50

3.3.3. ROB Tayininde Kullanılan Çözeltiler	51
3.3.4. Comet ve fpg-Comet Yöntemi ile Genotoksisite Tayininde Kullanılan Çözeltiler	51
3.3.5. Western Blot Analizinde Kullanılan Çözeltiler	54
3.3.6. Kaspaz 3/8/9 Tayininde Kullanılan Çözeltiler	55
3.4. Yöntemler	55
3.4.1. Pitavastatinin Hücre Siklusu Üzerindeki Etkilerinin HeLa Hücrelerinde Belirlenmesi	55
3.4.2. Pitavastatinin Erken Apoptotik Etkilerin HeLa Hücrelerinde Belirlenmesi	57
3.4.3. Pitavastatinin ROB Oluşumu Üzerine Olan Etkilerinin HeLa Hücrelerinde Belirlenmesi	57
3.4.4. Pitavastatinin Genotoksik Etkilerinin HeLa Hücrelerinde Belirlenmesi	58
3.4.5. Pitavastatin Uygulanmış HeLa Hücrelerinde Western Blotting ile Protein Tayini	60
3.4.6. Pitavastatin Uygulanmış HeLa Hücrelerinde Kaspaz 3/8/9 Düzeylerinin Ölçümü	60
3.5. İstatistiksel Yöntemler	61
4. BULGULAR	62
4.1. Pitavastatinin HeLa Hücrelerinde Hücre Döngüsü Üzerine Etkileri ve Geç Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	62
4.2. Pitavastatinin HeLa Hücrelerinde Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	64
4.3. Pitavastatinin HeLa Hücrelerinde ROB Oluşumu Üzerine Olan Etkilerinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	67
4.4. Pitavastatinin HeLa Hücrelerinde DNA Hasarı Üzerindeki Etkilerinin Comet ve fpg-comet Yöntemi ile Belirlenmesine İlişkin Bulgular	70
4.5. Pitavastatinin HeLa Hücrelerinde Apoptotik Yolak Üzerine Olan Etkilerinin Western Blotting Yöntemiyle Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	73
4.6. Pitavastatinin HeLa Hücrelerinde Kaspaz 3/8/9 Seviyelerinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	75

5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	87
7. KAYNAKLAR	88
8. EKLER	100
EK-1.Dijital Makbuz	
EK-2. Orjinallik Ekran Çıktısı	
9. ÖZGEÇMİŞ	102

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC	Amerikan tip kültür koleksiyonu
ATP	Adenozin trifosfat
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
AP	Apürinik/apirimidinik bölge
Asetil-CoA	Asetil-Koenzim A
Bcl-2	B hücreli lenfoma-2
CYP 2C8	Sitokrom P450 2C8
CYP 2C9	Sitokrom P450 2C9
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
Endo (III)	Endonükleaz III
Fas-L	Fas ligandı
FBS	Yenidoğan Sığır Serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FIGO	Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu
fpg	Formamidopirimidin DNA glikozilaz
HeLa	İnsan serviks adenokarsinoma hücresi
HMG CoA R	Hidroksimetil glutaril CoA redüktaz
HPV	İnsan papilloma virüsü
IC₅₀	Hücrelerin %50'sinin öldüğü inhibitör konsantrasyon
KoQ10	Koenzim Q10
MEA	6-etil-o-toluidin
MEEO	Orta elektroendozmoz
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
MCF-7	İnsan meme adenokarsinoma hücre dizisi
NKA	Nötral kırmızı alım
p53	Tümör protein 53
OATP1B1	Organik anyon taşıyan polipeptit
PARP	Poli adenozin difosfat riboz polimerazı

PI	Propidium iyodür
ROB	Reaktif oksijen bileşikleri
TNF	Tümör nekroze edici
TUNEL	Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP nick uç etiketleme
µM	Mikromolar
8-oksoGua	8-okso-7,8-dihidroguanin

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa	
2.1.	Serviksin anatomik yapısı.	2
2.2.	Sisplatinin böbrek yetmezliğine yol açtığı olası toksisite mekanizması.	8
2.3.	Hücre döngüsü fazları.	18
2.4.	Mevalonat yolağı.	22
2.5.	Pitavastatin kalsiyum yapısı.	29
2.6.	HeLa hücrelerinin mikroskopik görünümü.	33
2.7.	Akım sitometrinin çalışma prensibi.	38
2.8.	Western blot tekniğinin akış şeması.	40
2.9.	Genotoksinlerin DNA üzerindeki etkileri.	41
2.10.	Alkali Comet testi akış şeması.	45
2.11.	Standart Comet testi ile fpg-Comet testinin karşılaştırmalı iş akışı.	47
4.1.	HeLa hücresinde pitavastatinin ve sisplatin kombinasyonlarının hücre döngüsü dağılımını gösteren akım sitometri histogramları.	63
4.2.	Pitavastatinin HeLa Hücrelerindeki Erken Apoptotik Etkileri.	64
4.3.	Erken apoptoz tayini ile elde edilen akım sitometri histogramları.	66
4.4.	Pitavastatin uygulanan HeLa hücrelerinin zamana bağlı ROB düzeyini gösteren floresan seviyeleri.	68
4.5.	Pitavastatin uygulanan HeLa hücrelerinin 4. saatteki floresan seviyeleri.	69
4.6.	Pitavastatin (100 µM) uygulanan HeLa hücrelerinin zamana bağlı floresan seviyeleri.	69
4.7.	Pitavastatin uygulanan HeLa hücrelerin Comet görüntüleri.	70
4.8.	Pitavastatinin HeLa hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki DNA hasarı üzerine etkileri.	71
4.9.	Pitavastatinin HeLa hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki DNA hasarı üzerine etkileri.	72
4.10.	Pitavastatinin HeLa hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki DNA hasarı üzerine etkileri.	73
4.11.	Western blotting deneyi sonucunda apoptotik yolaktaki ilgili proteinlerin ekspresyonları.	74
4.12.	Pitavastatin uygulanan HeLa hücrelerinin 24 saat maruziyet süresinde kaspaz 3/8/9 seviyeleri.	76

TABLolar

Tablo	Sayfa
2.1. Statinlerin kaynağına göre sınıflandırılması.	11
2.2. Lipofilik ve hidrofilik statinler.	12
2.3. Statinlerin özellikleri.	14
2.4. Statine bağlı advers etki risk faktörleri.	16
2.5. Pitavastatin kalsiyumun fizikokimyasal özellikleri.	29
2.6. Pitavastatinin serum konsantrasyonunu azaltabilen ve artırabilen ilaçlar.	30
2.7. ATCC'den temin edilen HeLa hücre hattına ait özellikler.	33
2.8. Apoptoz ile nekroz arasındaki farklar.	34
2.9. Apoptozun değerlendirildiği yöntemler.	36
4.1. Pitavastatinin HeLa Hücrelerinde Geç Apoptotik Etkileri ve Hücre Döngüsü Analizleri.	62

1. GİRİŞ

Serviks kanseri, dünya çapında kadınları etkileyen en yaygın kanser türlerinden biridir. 2020'de tahminen 604.000 kadın serviks kanseri teşhisi almış olup ve yaklaşık 342.000 kadın bu hastalıktan ölmüştür. Servikal kanserlerin yüksek insidans oranları ve yüksek mortalite oranları büyük ölçüde düşük ve orta gelirli ülkelerde görülür. Serviks kanseri için farklı tedavi türleri mevcut olup kanserin evresi, genel sağlık durumu gibi birçok faktör göz önünde bulundurularak tedaviye karar verilmektedir (1-3).

Statinler, kolesterol sentezinde hız sınırlayıcı basamak olan hidroksimetil glutaril CoA redüktaz (HMG CoA R) enzimini inhibe ederek hipolipidemik etki gösteren ilaçlardır (4). Statinlerin antikanser etkilerine olan ilgi artmış olmasına rağmen bu konuda gerçekleştirilmiş az sayıda çalışma bulunmaktadır ve olası antikanser etkilerin mekanizması tam olarak açıklık kazanmamıştır. Pitavastatin bu ailenin en yeni üyesidir (5). Daha önce yaptığımız bir çalışmada, pitavastatinin çeşitli dozlarının tek başına ve sisplatin ile kombinasyonunun 24, 48 ve 72 saatlik maruziyet sürelerinin ardından sitotoksik etkiler *in vitro* olarak hücre canlılığını ve membran bütünlüğünü test eden yöntemlerle belirlenmiştir Ayrıca, pitavastatinin insan serviks kanser hücre hattına (HeLa) serviks kanser tedavisinin standart ilacı olan sisplatinin ile kombine uygulamasında sisplatinin sitotoksik etkisini artırdığı gözlenmiştir (6). Bu verilerden yola çıkarak hazırlanan bu doktora çalışmasının amacı, HeLa hücre hattında pitavastatinin tek başına ve sisplatin ile kombinasyonunun potansiyel antikanser etkilerini değerlendirmek için apoptoz, oksidatif stres ve DNA hasarı ile ilgili olası mekanizmaları belirlemektir. Olası antikanser etkilerini belirlemek için; hücre siklusu analizi, erken apoptoz ile geç apoptozun akım sitometrisi ile değerlendirilmesi, reaktif oksijen bileşikleri (ROB) düzeyinin belirlenmesi, genotoksik etkinin tek hücre jel elektroforez (Comet) yöntemi ile ve oksidatif hasara karşı koruyucu formamidopirimidin DNA glikozilaz (fpg) enzimlerinin kullanıldığı geliştirilmiş Comet yöntemi ile tayini, apoptoz yolağındaki önemli bir protein olan poli adenzin difosfat riboz polimeraz (PARP) ve bölünmüş PARP düzeyleri ile kaspaz 3/8/9 seviyelerinin western blot/kit yöntemleri ile tespiti yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serviks Anatomisi ve Görevi

Uterusun alt dar ucuna serviks adı verilir. Serviks stroma ve epitelden oluşan 2-3 cm uzunluğunda silindirik bir yapıdır. Endoservikal kanal uterus boşluğunu ve vajinanın lümenini birbirine bağlar. Serviksın alt kısmı olan ektoserviks, vajinal epitelin devamı olan çok katlı yassı epitel ile kaplıdır. Endoservikal kanal ise mukus salgılayan kolumnar epitel ile kaplıdır (7). Serviks yapısı Şekil 2.1.'de verilmiştir. Serviksın birincil görevi, fetüsün büyümesini ve doğumunu desteklemek için gebelik sırasında morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere uğramaktır. Serviks bu rolü yerine getirebilmek için gebelik boyunca kapsamlı bir şekilde yenilenir. Serviks, fetüsü rahim içinde tutmak ve onu vajinal mikro biyomdan ve diğer patojenik mikroorganizmalardan korumak için üçüncü trimestere kadar kapalı kalır. Bu yeniden yapılanma servikste yapısal ve mekanik bir değişikliği içerir. Doğum sırasında endokrin ve parakrin sinyalleri, sitokinlerin, prostaglandinlerin ve oksitosin salınımını tetikler. Gebelikte serviksın yeniden yapılanması ile ilgili son yıllarda artan sayıda çalışma yayınlanmaktadır (8, 9).



Şekil 2.1. Serviksın anatomik yapısı (10).

2.2. Serviks Kanseri

Serviks kanseri jinekolojik tümörlerden biridir ve dünya çapında kadınlarda kansere bağlı ölümler arasında dördüncü sıradadır (11). Ayrıca, dünya genelinde kadınlar arasında en yaygın ikinci kanser olmasıyla beraber günümüzde, serviks kanserine bağlı ölümlerin %85'ten fazlası düşük ve orta gelirli ülkelerde meydana gelmektedir. Bu ülkelerde tarama yöntemlerinin ve aşılama programlarının sürekli iyileştirme çalışmaları devam etmektedir (12). Yüksek gelirli ülkelerde ise serviks kanseri insidansı ve mortalitesi, resmi tarama programlarının başlatılmasından bu yana geçen 30 yılda yarıdan fazla azalmıştır (13).

Serviks kanseri, insan papilloma virüsünün (HPV) yüksek riskli türleri ile kalıcı enfeksiyonu ile meydana gelir. İki yüksek riskli tip olan HPV 16 ve HPV 18, dünya çapında serviks kanserlerinin %70'ine neden olmaktadır (14). Bununla birlikte HPV, serviks kanseri için gerekli ancak yeterli olmayan bir etiyolojik faktördür. HPV cinsel yolla bulaşan yaygın bir enfeksiyondur, ancak HPV enfeksiyonlarının çoğu vücudun bağışıklık sistemi tarafından yok edilir (15). HPV enfeksiyon riskini artırdığı düşünülen faktörler; cinsel aktivite, sosyo-ekonomik düzey, yaş, oral kontraseptif kullanımı ve immün sistemin baskılanması olarak sayılabilir (16). Serviks kanseri erken dönemde fark edilebilir belirti veya semptomlara neden olmayabilir. Olası belirtileri ve semptomları vajinal kanama, olağandışı vajinal akıntı, pelvik ağrısı, sisparoni ve postkoital kanama olarak bilinmektedir (17). Koruma yolu olarak en etkili görülen yöntem aşılama (16). Yüksek riskli HPV tiplerine karşı koruma sağlayan aşılar da mevcuttur. (18). HPV aşıları ile yeni serviks kanseri vakaları azaltılabilmektedir (1, 3, 11, 13).

İlk HPV aşısı 2006 yılında klinik tedaviye sunulmuştur. Bivalent (human papillomavirus 16/18), kuadrivalan (human papillomavirus 6/11/16/18) ve nonavalan (human papillomavirus 6/11/16/18/31/33/45/52/58) aşılar Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından ön yeterliliğe sahiptir ve ruhsatlandırma işlemi yaygın şekilde yapılmıştır (19).

HPV aşılama programını başlatan ilk ülke olan Avustralya'da (2007'de), 12 ve 13 yaşlarındaki kız ve erkek çocuklarda %70'in üzerinde aşı kapsamı ile dört değerlikli Gardasil aşısı kullanılmış ve programın uygulanmasından sonraki 3 yıl içinde 18 yaş altı kadınlarda yüksek dereceli servikal displazide %38 azalma gözlenmiştir (13).

Bununla birlikte HPV aşısı serviks kanseri görülme sıklığını azaltsa da, 2021'de Amerika Birleşik Devletleri'nde serviks kanserinden tahmini 4.290 ölüm meydana geldiği raporlanmıştır (20).

Ülkemizde ise yıllık yeni vaka sayısı 1.800 olarak belirtilmektedir. Serviks kanseri insidansı 4/100.000'dir ve hastaların yarısından fazlasına ileri evrede tanı konmaktadır. Erken evrede tanı alan bireylere cerrahi yollarla kür sağlanabilmekteyken ileri evrede primer tedavi kemoradyoterapidir ve nüks sebebiyle sağkalım azalmaktadır. (18). Ülkemizde HPV aşıları, Nisan 2007 tarihinden beri uygulanmaktadır, ancak ulusal aşı takviminde yer almamaktadır. Kişi kendi imkanlarıyla aşıya erişim sağlamaktadır. Dünya'da ise HPV aşısı kadınlar için 71 ülkenin, erkekler için ise 11 ülkenin ulusal aşı programında yer almaktadır. Özellikle, DSÖ hedefi ise bu aşının 9-14 yaş arası kızlara cinsel ilişki öncesi uygulanmasıdır (16, 18, 21).

Aşının ciddi bir şekilde uygulandığı ülkelerde serviks kanserinin neredeyse tamamen ortadan kaldırılması mümkündür. HPV aşısına erişim için herkes için mümkün olmalıdır. (19). Ek olarak, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi, Food and Drug Administration (FDA) ise bu konuda 26 yaşına kadar herkesin aşı olması gerekliliğini vurgulamaktadır. Ancak, aşı oranları özellikle erkek ergenler için yetersizdir. Ayrıca, HPV aşılmasının nispeten yakın bir zamanda başlatılması göz önüne alındığında, daha yaşlı kadın ve erkek bireyler korunmasız kalmaktadır ve HPV enfeksiyonu bu nesillerde oldukça yaygın olmaya devam etmektedir; bu nedenle 2018'de FDA, Gardasil-9 uygulaması için yaş sınırının erkekler ve kadınlar için 26'dan 45'e yükseltilmesini onaylamıştır. Bununla birlikte, ergenler arasında genel olarak düşük profilaktik aşılanma oranları ve yaşlı kadınlarda önceden var olan enfeksiyonlar, HPV ile ilişkili servikal displazi ve servikal kanseri tedavi etmek için terapötik HPV aşılarının geliştirilmesinin acil ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Serviks kanseri vakalarının çoğundaki rolleri nedeniyle, yüksek riskli HPV 16 ve HPV 18 tipleri HPV antijenine özgü immünoterapilerin geliştirilmesi çalışmalarının temel hedeflerinden biridir (15, 16).

2.3. Servik Kanseri Tanısı ve Tedavisi

Tanı, servikal biyopsinin histopatolojik değerlendirmesine dayanır. Serviks kanseri semptomları olan kadınlarda pelvik muayene, serviks ve vajinal mukozanın görüntülenmesi ve servikal sitoloji gerekmektedir. Hastalık mikroinvaziv olduğunda veya endoservikal kanalda olduğunda serviks normal görünebilir. Serviks kanseri lenfatik damarlar yoluyla pelvik, para-aortik, mediastinal, supraklaviküler ve inguinal lenf nodlarına metastaz yapabilir. Semptomatik hastalarda veya sitolojisi görünür lezyon olmadan invazyonu düşündüren kadınlarda kolposkopi ve biyopsi yapılmaktadır. Evreleme klinik olarak tümör boyutuna ve pelvik yayılım derecesine göre belirlenir (13).

İnvaziv serviks kanseri, parametrium, vajina, uterus ve mesane ve rektum gibi komşu organlara doğrudan yayılım yoluyla yayılır. Aynı zamanda lenfatik kanallar boyunca bölgesel lenf düğümlerine ve para-aortik düğümlere yayılım gösterir. Hematojen yolla akciğerlere, karaciğere ve iskelete uzak metastaz geç bir olgudur. Evreleme belirlenirken tüm dünyada standart olarak kullanılan Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu, The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) evrelemesi kullanılır. Serviks, 1958 yılında FIGO tarafından kanser için klinik evreleme sistemindeki ilk organdır. Daha sonra patolojik evreleme yapılmış ve 2018 yılında FIGO, evreyi belirlemek için mümkün olduğu kadar klinik, radyolojik veya patolojik bulgularla evrelemeyi revize etmiştir. FIGO'ya göre serviks kanseri 4 evreden oluşur ve bu evreler kendi içinde de sınıflandırılır. Evre I, kesinlikle serviksle sınırlı olan karsinomdur; uterus korpusuna uzanımı göz ardı edilmelidir. Evre II, serviksin ötesine uzanan ancak pelvik duvara uzanmayan karsinomdur. Karsinom vajinayı tutar ancak alt üçte birlik kısma kadar ulaşmaz. Evre III, pelvik yan duvara uzanan karsinomdur. Rektal muayenede tümör ile pelvik yan duvar arasında kansersiz bir boşluk görülmez ve tümör vajinanın alt üçte birlik kısmını kapsar. Hidronefrozu veya böbrek fonksiyon görmeyen tüm vakalar Evre III kanserlerdir.

Evre IV, gerçek pelvisin ötesine yayılmış veya klinik olarak mesane ve/veya rektum mukozasını tutan karsinomdur (10, 22, 23). Tarama programları, hastalık belirtilerini erken bir aşamada tespit ederek, durumun etkili tedavisine ve yönetimine olanak tanır. Yapılan taramalar, tanıda oldukça etkilidir (3, 13).

Serviks kanserinin mevcut tedavileri arasında cerrahi, radyasyon ve kemoterapi yer almaktadır. Tedavilerindeki bu gelişmeler olmasına rağmen, ileri evre serviks kanseri hastalarının, tümör nüksü ve metastazı nedeniyle hayatta kalma oranları düşüktür. Onkogenlerin aktivasyonunun, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunun ve düzensiz sinyal yollarının servikal onkogeneze yol açtığı bilinmektedir. Servikal tümör oluşumunun moleküler mekanizmaları tam olarak açık değildir (11). Sistemik tedaviler, serviks kanseri için sonuçları iyileştirmiş olup araştırmalar bu yönde devam etmektedir (3, 13). Tedavide kullanılan ajanlar platin bileşikleri, ifosfamid, dibromodulkitol, doksorubisin, paklitaksel, topotekan olarak sayılmaktadır (3).

Platin bazlı ilaçlar sisplatin, karboplatin ve oksaliplatin, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak platin bileşiklerinin seçicilik eksikliği, yüksek sistemik toksisite ve ilaca direnç gibi yan etkileri klinik uygulamalarını ciddi şekilde sınırlamaktadır. Tedavi sırasında sisplatin ve karboplatin sonunda ilaç direncine neden olması sebebiyle üçüncü nesil platin klinik ilacı oksaliplatin geliştirilmiştir. Oksaliplatinin etki mekanizması sisplatin ile benzer olup sisplatin veya karboplatin ile çapraz direnç oluşturmaz (24).

2.3.1. Sisplatin

Sisplatin, geniş spektrumlu özelliklere sahip güçlü bir antineoplastik kemoterapötik ajandır. 1845'te ilk kez sentezlenmiş ve 1893'te Alfred Werner sisplatinin yapısını ortaya çıkarmıştır. 1960'lı yıllarda kansere karşı bir ilaç olarak keşfedilmesi, kanser tedavisinde yeni bir çağ açmıştır. Rosenberg ve arkadaşları, çeşitli platin komplekslerinin sıçanlarda sarkomlar üzerindeki etkilerini başarıyla test etmişlerdir (25). 1978 yılında platin bazlı bir kemoterapötik ajan olarak onay almıştır ve DSÖ'nün temel ilaçlar listesinde yer alan kemoterapötiklerden biridir (26).

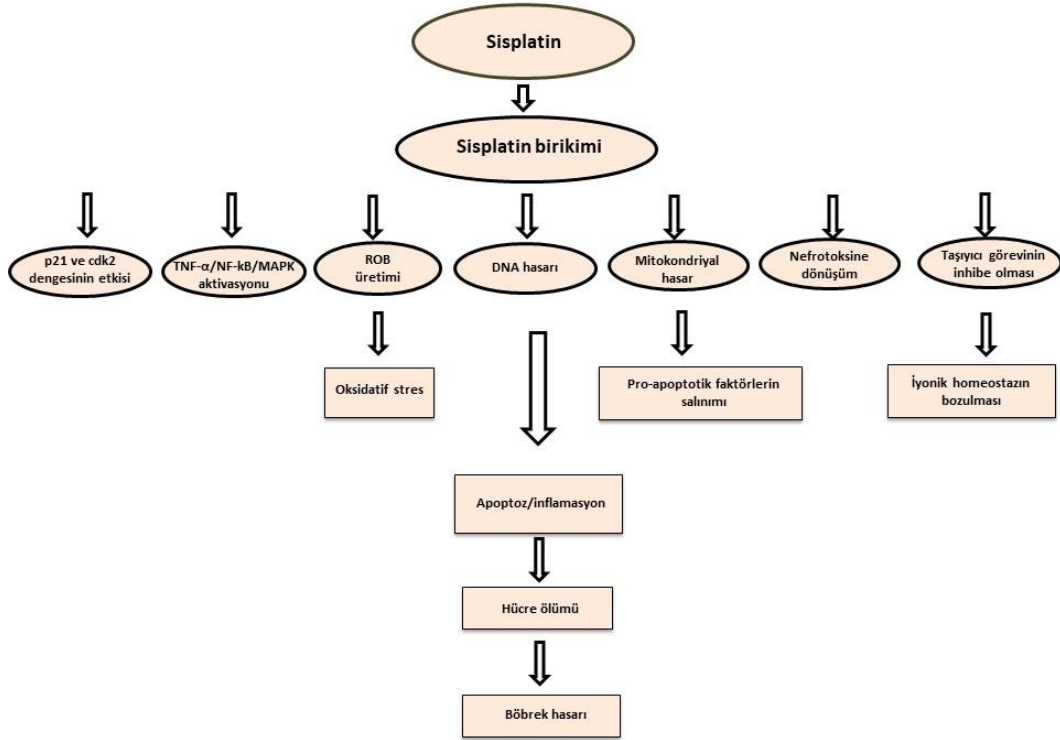
Sisplatinin tümör hücrelerindeki etkisi de uzun zamandır üzerinde çalışılan konulardan biridir ve genel olarak tümör hücrelerine ilk olarak bakır taşıyıcı yoluyla taşındığı bilinmektedir. Tümör hücresine girdikten sonra platin kompleksi, genellikle su molekülleri veya sülfhidril grupları içeren diğer küçük moleküller tarafından değiştirilmesinin ardından aktivasyon basamağından geçer. Sisplatin, stoplazmada bir dizi kimyasal reaksiyondan sonra DNA'ya bağlanarak zincir içi ve zincirler arası

çapraz bağlantılar oluşturarak DNA yapısını değiştirir ve DNA hasarına neden olur. En nükleofilik DNA bölgesi, guaninin N7 pozisyonudur. Bu DNA hasarı hücre döngüsünü engelleyebilir ve hızla çoğalan tümör hücrelerinde apoptozu tetikleyebilir. Böbreklerde proksimal tübüler epitel hücreleri sisplatinin birincil hedefleridir. Özellikle ölüm ligandları tarafından tetiklenen sinyal yolları hem apoptoza hem de inflamasyona aracılık eder. Sisplatin nefrotoksisitesinde kaspaz 8 gibi ekstrinsik yolda önemli anahtar moleküllerinin rolleri üzerine yapılacak gelecekteki çalışmalar, bu patolojik durumdaki etkiler hakkında bize daha çok fikir verecektir (27). Etkinliğine rağmen, majör yan etkiler kullanımını son derece sınırlandırmaktadır. Bunlar nefrotoksisite, hepatotoksisite, nörotoksisite, kemik iliği baskılanması, ototoksisite ve kardiyotoksisiteyi içerir (24, 28). Ayrıca sisplatin tedavisinin ilaç direnci gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Sisplatin direncinin ve toksikolojik etkilerin üstesinden gelmek için kombinasyon ilaç tedavisi üzerine çalışılmaktadır (29).

Sisplatinin Nefrotoksik Etkisi

Sisplatin renal yolla atılır ve renal proksimal tübüllerde birikerek nefrotoksisiteye neden olabilir. Kullanımı genellikle kreatinin klerensi >60 mL/dk olan hastalarla sınırlıdır ve sisplatin kaynaklı nefrotoksisite yaygındır ve dozlamayı sınırlayabilir. Sisplatin akut böbrek hasarına ve kronik böbrek hastalığına neden olabilir. Klinik öncesi alanda yapılan çalışmalarla sisplatin nefrotoksisitesinin altında yatan moleküler mekanizmalar hakkında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Sisplatin nefrotoksisitesine yönelik çeşitli farmakolojik, moleküler ve genetik yaklaşımlar tanımlanmıştır (27, 30). Nefrotoksisitenin böbreklere doğrudan ve dolaylı hasardan kaynaklandığı yaygın olarak kabul edilmekle beraber tübüler hasara ve böbrek yetmezliğine yol açan mekanizmalar oldukça karmaşıktır (31). Bu alanda yapılan çalışmalar, DNA hasarı, mitokondriyal hasar, oksidatif stres ve endoplazmik retikulum stresi gibi hücre içi stresleri içeren sisplatin nefrotoksisitesinin hücresel ve moleküler mekanizmaları hakkında bilgi vermektedir. Sisplatin nefrotoksisitesinin patogenezinde anahtar roller otofaji, hücre döngüsü durması, apoptoz, programlanmış nekroz ve inflamasyon olarak görülmektedir. Sisplatinin böbrek yetmezliğine yol açtığı olası mekanizma Şekil 2.2.'de verilmiştir. Ek olarak, ortaya çıkan bulgulara göre

epigenetik faktörlerin de sisplatin kaynaklı akut böbrek hasarına ve kronik böbrek hastalığına neden olduğunu göstermektedir (27).



Şekil 2.2. Sisplatinin böbrek yetmezliğine yol açtığı olası toksisite mekanizması (31).

Sisplatin kaynaklı nefrotoksisite doz bağımlıdır ve sisplatinin bireylerin %20'sinde oluşturduğu nefrotoksisitenin renal tübüler epitel hücrelerinde meydana geldiği bilinmektedir (26).

Sisplatinin Kardiyotoksik Etkisi

Sisplatin kaynaklı kardiyotoksisite klinik vakaları son on yılda artmıştır. Sisplatin kardiyotoksisitesinin kesin mekanizmasını anlayabilmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Oksidatif stres, sisplatin kaynaklı kardiyotoksisitenin altında yatan ana mekanizma gibi görünmektedir. Ayrıca, DNA hasarı, inflamasyon gibi birçok faktörün de kardiyotoksisiteye sebep olduğu düşünülmektedir. Örneğin, sisplatinin kardiyotoksisiteye neden olan bir sıçan modelinde mitokondriyal DNA'da önemli hasara neden olduğu gösterilmiştir (31).

Akut ve kümülatif kardiyotoksisite, sisplatin tedavisi için başlıca sınırlayıcı faktörlerdendir. Şiddetli kardiyotoksik olaylar genellikle sisplatin uygulamasından sonra meydana gelir ve bu olaylar, kardiyotoksisite ve aritmilerin yanı sıra elektrokardiyografik değişiklikler, miyokardit ve kardiyomiyopati olarak ortaya çıkar. Bu sebeple, birçok ilaç sisplatin kaynaklı kardiyotoksisiteyi azaltmak için denenmiştir; ancak, çok azı başarıya ulaşmıştır. Hipolipidemik etkileri sebebiyle klinikte kullanılan statinler, antioksidan, antiinflamatuvar, antitrombotik renal ve vasküler koruyucu etkiler gibi çoklu etkiye sahiptir. Statinlerin kullanımı, öncelikle kardiyomiyositler üzerindeki olası antiapoptotik etkileri yoluyla, kardiyovasküler hastalarda azalmış mortalite ve morbidite ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, statinlerin bu kardiyotoksisiteyi engellemedeki altında yatan moleküler mekanizmalar henüz ortaya konmamıştır (24, 28).

İnflamatuvar yanıtın sisplatinin neden olduğu kardiyotoksisitenin patolojik sürecinde çok önemli bir rol oynadığı bilindiğinden *wogonin* adlı kardiyoprotektif ve antiinflamatuvar özelliklere sahip doğal bir flavonoid bileşikle çalışan bir grup araştırmacı, *wogonin*'in sisplatin kaynaklı kardiyotoksisiteyi antagonize etme potansiyelini *in vivo* ve *in vitro* olarak değerlendirmiştir. Çalışmanın sonunda, *wogonin*'in bu kardiyotoksisiteyi azaltmada büyük bir potansiyele sahip olduğu vurgulanmıştır (32). Yine bu amaçla yapılan çalışmaların birinde sinapik asit, oksidatif stresi ve inflamasyonu engelleyerek sisplatin kaynaklı kardiyotoksisiteyi önlediği bildirilmiştir. Bu çalışmada sıçanlarda toksisite oluşturmak için sisplatin 5 haftalık bir süre boyunca uygulanmış ve elektrokardiyogramlar sisplatin toksisitesi etki gösterdikten sonra elde edilmiştir. Kalp dokusunda ve serumda proinflamatuvar sitokinler ve oksidatif ve nitrozatif stres göstergelerinin düzeyi değerlendirilmiştir. Biyokimyasal olarak sisplatin oksidatif sitokin düzeylerini artırmış olup histolojik değerlendirme sonuçlarına göre sisplatine maruz kalan hayvanların kalp dokusunda histopatolojik bulgular gözlenmiştir. Sinapik asit, tümör nekroze edici faktörü (TNF)-alfa, interlökin-6, malondialdehit seviyelerini azaltmıştır. Sinapik asit ayrıca oksidatif ve nitrozatif stresi de azaltmıştır. Histopatolojik olarak sinapik asit uygulanan dokular sisplatine maruz kalmış dokulara göre daha az hasar görmüştür. Sonuç olarak, bu çalışmada sinapik asit sisplatinin neden olduğu kardiyotoksisiteye karşı koruyucu etki göstermiştir (33).

Sisplatinin Ototoksik Etkisi

Sisplatin kaynaklı ototoksikite hastaların %10-90'ında görülürken, çocuklar yetişkinlerden daha fazla etkilenmektedir. Koklea hücrelerinde aşırı ROB üretimi işitme kaybından sorumludur. Sisplatinin toksik etkisine bağlı işitme kaybı genellikle yüksek frekans aralığında, iki taraflı ve kalıcıdır. Sisplatinin neden olduğu ototoksikitenin tedavisi için; antioksidanların ve antiinflamatuvar ajanların lokal veya sistematik uygulanmasının çok önemli olduğu çeşitli yaklaşımlar bildirilmektedir (34).

Sisplatinle Kombine Tedavi

Sisplatin bazı kanser tedavilerinde oldukça başarılı olmasına rağmen, sisplatin ile tedavi edilen hastalarda kemoterapiye direnç, düşük prognoz, çok sayıda yan etki gibi birçok sorunla karşılaşmaktadır. Bu sorunların üstesinden gelmek için kombinasyon tedavileri kullanılır. Kombinasyon tedavisi, farklı etki mekanizmasına sahip iki veya daha fazla ilacın kullanıldığı bir tedavidir. Platin komplekslerine odaklanan bilimsel araştırmanın temel amacı, ana bileşik sisplatin ile karşılaştırıldığında üstün etkinliğe, azaltılmış toksisiteye, çapraz direnç eksikliğine veya geliştirilmiş farmakolojik özelliklere sahip bileşikleri tanımlamaktır. Sisplatin sıklıkla bir, iki, üç ve hatta dört başka ilaçla kombine halde kullanılır ve olumlu sonuçlar alınır. Sisplatin direncini en aza indirmek için kombine tedaviler geliştirilmiş ve kanseri yenmede daha etkili olduğu kanıtlanmıştır. Bu nedenle, tümör hücrelerinde sisplatin tarafından tetiklenen biyokimyasal mekanizmaların anlaşılması, daha etkili platin türevlerinin veya diğer ilaçların tasarlanmasına yol açabilir ve yeni terapötik stratejiler sağlayabilir ve yan etkileri azaltabilir. Ortak hedef, ilaçların birlikte etkisinde kanser hücrelerini öldürmede sinerjistik veya en azından aditif etkiler üreterek, hiçbir advers etki meydana getirmemesidir (25, 34). Bu amaçla yapılan araştırmalar arasında serviksin skuamöz hücreli karsinomu olan hastalarda kombinasyon kemoterapisinin gerekliliği vurgulanmıştır. Kombinasyon kemoterapisine ilişkin çok sayıda çalışma bildirilmiş olmasına rağmen bu çalışmaların çoğu, skuamöz olmayan serviks karsinomlu hastaları içeren, nispeten küçük, randomize olmayan bir seri çalışmalardır (3).

2.4. Statinler

HMG-CoA redüktaz inhibitörleri olarak statinler karaciğerde kolesterol sentezini bloke eder, böylece plazmadaki düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterolünün azalmasına yol açan reaksiyonları tetikler. Bu ilaçlar, hiperkolesteroleminin tedavisinde kullanılmaktadır ve kardiyovasküler hastalıkların korunmasında hem birincil hem de ikincil korumada kanıtlanmış yararları nedeniyle kardiyovasküler tedavide güvenilir olan bir ilaç grubudur. Statinler lipofilik ve hidrofilik türleri içerir: simvastatin, lovastatin, serivastatin, fluvastatin, pitavastatin ve atorvastatin lipofilik statinlerdir, pravastatin ise hidrofilik statinlere örnektir (35). Birçok çalışma klinik ortamda lipofilik ve hidrofilik statinleri karşılaştırmıştır. Lipofilik statinler adenozin trifosfat (ATP) üretimini azaltır; bu da teorik olarak iskemiden sonra miyokard fonksiyonunu bozar. Bu, lipofilik statinlerin miyokardiyal şoku şiddetlendirdiği ve koroner reperfüzyonu takiben doku ATP'sini azalttığı, buna karşın hidrofilik statinlerin bu etkileri göstermediği bir hayvan çalışmasında gösterilmiştir. Bir meta-analiz, lipofilik statinlerin hidrofilik statinlerle kıyaslanabilir majör advers etkilere sahip olduğu sonucuna varmıştır (36). Bununla birlikte lipofilik statinlerin hidrofilik statinlerden önemli ölçüde daha etkili olduğu da belirtilmektedir. Ancak statinlerin aktiviteleri arasında anlamlı bir fark olmadığı bilinmektedir (37). Bunun dışında günümüzde bir başka sınıflandırmada statinler iki gruba ayrılmaktadır: Tip-I türevler mevastatin, lovastatin, pravastatin ve simvastatin gibi fermantasyon ürünlerinden üretilir. Tip II statinler, fluvastatin, atorvastatin, serivastatin, pitavastatin ve rosuvastatin sentetik kökenli ilaçlardır (38). Statinlerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması Tablo 2.1.'de, Lipofilik ve hidrofilik statinler Tablo 2.2.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Statinlerin kaynağına göre sınıflandırılması (38).

<i>Tip I Türevler (fermente ürünler)</i>	<i>Tip II Türevler (sentetik türevler)</i>
Mevastatin	Fluvastatin
Lovastatin	Atorvastatin
Pravastatin	Serivastatin
Simvastatin	Pitavastatin
	Rosuvastatin

Tablo 2.2. Lipofilik ve hidrofilik statinler (36).

<i>Lipofilik statinler</i>	<i>Hidrofilik statinler</i>
Fluvastatin	Rosuvastatin
Lovastatin	Pravastatin
Atorvastatin	
Simvastatin	
Pitavastatin	

Statin ailesinin ilk üyesi mevastatindir. Lovastatin ve simvastatin laktonlardır, dolayısıyla vücutta aktif açık formlarına dönüşen kapalı halkalı ön ilaçlardır ve HMG CoA R üzerindeki inhibitör etkileri büyük ölçüde çözünürlüklerine bağlı olduğundan hidroksil asitler oluştururlar. Bununla birlikte, statinlerin uygulanmasını kısıtlayan en önemli sınırlamalardan biri, bazı statinler için biyoyararlanımın genellikle %50'nin altında olmasıdır. Biyoyararlanımı artırmak için, misel, nanokristal ve lipid bazlı nanopartiküller gibi statinlerle yüklü nanotaşıyıcılar, gastrointestinal sistemde daha iyi ilaç alımına izin veren, umut verici sonuçlarla incelenmiştir (38, 39).

2.4.1. Statinlerin Toksikokinetik Etkileri

Statinler amfifilik ilaçlardır. Lipofilik ajanlar (simvastatin, fluvastatin, atorvastatin) doğrudan membran etkileşimleri yoluyla veya pravastatin gibi hidrofilik ajanlar taşıyıcı proteinler yoluyla hücrelere girerler. Çoğu statin (pravastatin ve kısmen rosuvastatin hariç) ilk geçiş karaciğer metabolizmasına uğrar; sistemik biyoyararlanım uygulanan dozun %5-30'una kadar düşer. Metabolitlerin çoğu, yine pravastatin ve ayrıca fluvastatin dışında, farmakolojik olarak aktiftir. Rosuvastatinin barsak emilimi oldukça değişkendir, bu durum %30'dan %85'e kadar farklılık göstermektedir (40). Statin konsantrasyonlarını artıran hususlar (örn. ilaç-ilaç etkileşimleri) olumsuz etki riskini artırabilir. Bu etkileşimler statinlerin farmakokinetik özelliklerine dayanır: simvastatin, lovastatin ve atorvastatin sitokrom P450 (CYP) 3A yoluyla metabolize edilir, ancak diğerleri bu yoldan bağımsız olarak metabolize edilir. Pravastatin ve rosuvastatin ise metabolik işleme en az maruz kalan hidrofilik moleküllerdir. Statinlerin metabolik dönüşümü, değişken kolesterol düşürücü aktiviteyi minimal düzeyde açıklamaktadır. Farmakolojik açıdan

bakıldığında statinler, kolesterol sentezinde hız sınırlayıcı bir adım olan HMG CoA R'ı inhibe eden hipolipidemik ilaçlardır. Statinlerin lipofilitesi farklı dokulara erişmelerini sağlar. Daha lipofilik statin, hepatik olmayan dokularda daha yüksek düzeyde maruziyete neden olurken, hidrofilik statinler daha hepatoselektiftir. Böylece statinlerin hepatik ve hepatik olmayan dokulardaki farklı etkileri öngörülebilir. Statinlerin farmakokinetiği, hidrofilik veya lipofilik özelliklerine ve uygun membran taşıyıcılarına bağlı olarak değişmektedir. Hidrofilik statinlerin başlangıçta karaciğerde biriktiği ve burada membran taşıyıcılarından biri olan organik anyon taşıyan polipeptit (OATP1B1) tarafından alındıkları gösterilmiştir. OATP1B1 aynı zamanda lipofilik karakterli pitavastatin absorpsiyonunun en önemli taşıyıcısıdır. Statinler feces, idrar, safra yoluyla metabolitler halinde veya genellikle değişmeden atılırlar (37, 40, 41). Statinlerin özellikleri Tablo 2.3.'te verilmiştir.

Tablo 2.3. Statinlerin özelliklikleri (41).

<i>Statin ismi</i>	<i>Kaynak</i>	<i>Yapı</i>	<i>Çözünürlük</i>	<i>Uygulanan form</i>	<i>Metabolizma</i>	<i>Klirens</i>
Atorvastatin	Sentetik	Pirol	Lipofilik	Aktif hidroksi asit	CYP 3A4	Hepatik
Fluvastatin	Sentetik	İndol	Lipofilik	Aktif hidroksi asit	CYP2C9	Hepatik
Lovastatin	Mantar	Naftalen	Lipofilik	İnaktif lakton	CYP 3A4	Hepatik
Pitavastatin	Sentetik	Kinolin	Lipofilik	Aktif hidroksi asit	Sınırlı CYP2C9/19	Hepatik
Pravastatin	Mantar	Naftalen	Hidrofilik	Aktif hidroksi asit	Minimal	Hepatik ve renal
Rosuvastatin	Sentetik	Pirimidin	Hidrofilik	Aktif hidroksi asit	Sınırlı CYP2C9/8	Hepatik ve renal
Simvastatin	Mantar	Naftalen	Lipofilik	İnaktif lakton	CYP 3A4	Hepatik

2.4.2. Statinlerin Advers Etkileri

Alanyazında, statin kullanımından kaynaklanan advers etkiler arasında olumsuz kas etkileri sıkça rapor edilmektedir. Statin kaynaklı rabdomiyoliz doz bağımlıdır; bildirilen risk yaklaşık %0,04-%0,2 olup ölüm oranı %7,8 ve milyon reçete başına 0,15 ölüm oranıdır. Daha az şiddetli miyopatiler de doz bağımlıdır ve yaklaşık %0,1-%1 oranında görülür. Statin miyopatisini açıklayan moleküler mekanizmalar halen bilinmemektedir; ancak, enerji üretiminde önceden var olan eksiklikler semptom gelişimine katkıda bulunabilir. Son zamanlarda yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, statin tedavisinin hücrel oksidatif stresi tetikleyebileceğini ve mitokondriyal fonksiyon ve kas kalsiyum homeostazisinde bozulmalara neden olarak miyotoksisiteye yol açabileceğini ileri sürmektedir (42). Statin intoleransı ve olumsuz etkilere ilişkin endojen ve ekzojen risk faktörlerinin bir özeti Tablo 2.4.'te verilmiştir.

Tablo 2.4. Statine bağılı advers etki risk faktörleri (42).

<i>Endojen faktörler</i>
İleri yaş (80 yaş üstü)
Kadın cinsiyeti
Asya etnik kökeni
Düşük vücut kitle indeksi, küçük vücut yapısı, kırılabilirlik
Önceden var olan/açıklanamayan kas/eklem/tendon ağrısı öyküsü
Yükselmiş kreatin kinaz geçmişi
Ailede miyopati öyküsü
Statin tedavisi ile ilişkilili ailede miyopati öyküsü
Nöromusküler hastalıklar
Şiddetli böbrek hastalığı
Akut/dekompanse karaciğer hastalığı
Hipertansiyon/kalp yetmezliği
Hipotiroidizm (tedavi edilmemiş)
Diyabet
Genetik polimorfizm
<i>Ekzojen faktörler</i>
Yüksek statin dozu*
Alkol kötüye kullanımı
Yasadışı uyuşturucu kullanımı (kokain, amfetaminler)
Antipsikotikler
İlaç-statin etkileşimleri
Fibratlar (özellikle gemfibrozil)
Nikotik asit
Amiodaron
Verapamil
Varfarin
Siklosporin
Makrolid antibiyotikler
Azol antifungalleri
Proteaz inhibitörleri
Çok miktarda greyfurt suyu tüketimi (> günde 1 litre)
Ağır ve/veya alışılmadık egzersiz

Bu risk faktörlerini en aza indirmek ve statinlerin advers etkilerinin yönetimine ilişkin çeşitli ilkeler belirlenmiştir (42). Bunlar şu şekilde sıralanabilir:

- Statin kullanımının endike olduğundan emin olunmalıdır. Hasta kardiyovasküler yönden göreceği etkiler konusunda bilgilendirilmelidir.
- Statin kullanımında herhangi bir kontrendikasyon olmadığından emin olunmalıdır.

- Yarar-zarar oranı düşünülerek görülebilecek yan etkiler konusunda endişelenmeden uzun süreli statin tedavisinin başarısı konusunda danışmanlık yapılmalıdır. Diyabetle ilgili uzun vadeli endişelerden uzak durulmalıdır.
- Diyet ve sağlıklı yaşam önerileri vurgulanmalıdır.
- Daha düşük ve/veya aralıklı statin dozu kullanımı konusunda önerilerde bulunulmalı veya farklı bir statin kullanımına geçilmelidir.
- Miyaljiyi hafifletmek için takviye önerilmemelidir.

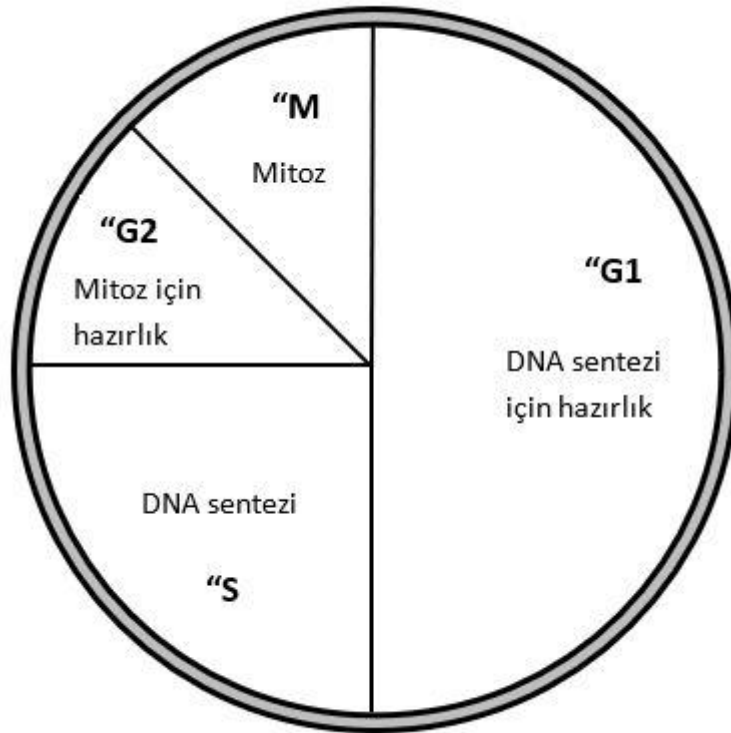
2.4.3. Statinlerin Pleotropik Etkileri

"Pleiotropi", Yunanca "pleion" (daha fazla) ve "tropos" (yön/yol) sözcüklerinden gelir ve "birden fazla yol" anlamına gelir. Farmakolojide bu terim, bir farmakolojik ajanın özel olarak geliştirildiği amacı dışındaki yararlı ya da istenmeyen etkilerini ifade eder. Birçok kanıt ana terapötik etkilerinin kolesterol biyosentezinin inhibisyonu ile ilişkili olduğunu öne sürmesine rağmen, statinler aynı zamanda kolesterol düşürme kapasitelerinden bağımsız mekanizmalar aracılığıyla (terapötik) etkiler de gösterirler. Bu pleiotropik etkiler doğası gereği çeşitlidir ve kardiyovasküler fonksiyonun iyileştirilmesinin yanısıra geniş antioksidan ve antiinflamatuvar etkilere, antifibrotik etkilere, kemik oluşumunu artırıcı etkilere ve nörolojik ve renal koruyucu etkilere sahip olabileceği bilinmektedir. Bunun yanısıra bunama, kanser, multipl skleroz ve optik nörit gibi kronik inflamatuvar hastalıklar, inflamatuvar barsak hastalığı, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı ve alkole bağlı olmayan steatohepatit gibi hayatı tehdit eden hastalıkların tedavisinde olumlu etkiler göstermiştir (43, 44). Bütün bunlar, statinlerin sadece kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için değil, aynı zamanda hayatı tehdit eden diğer hastalıklar için de araştırılması gerektiğine bir işarettir ve statinler bu tür hastalıkların tedavisinde çok iyi bir alternatif olabilir. Bu nedenle, yukarıda belirtilen hastalıkların standart tedavi kılavuzlarına statinlerin eklenebilmesi için daha iyi bir tablo elde etmek amacıyla daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (44).

Statinlerin Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkileri

Hücre homeostazı, hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengeye bağlıdır (45). Hücre döngüsü, hücre büyümesi ve proliferasyonu, organizma gelişimi, DNA hasarı

ve onarımı, hasara yanıt olarak doku hiperplazisi ve hastalıkları içeren karmaşık süreci içerir. Aynı zamanda, birbirini izleyen iki mitotik bölünme arasındaki aralık olarak da tanımlanabilir (46, 47). Hücre döngüsü interfaz ve mitoz olmak üzere iki aşamaya ayrılır. İnter faz, G₀, G₁, Sentez fazı (S) ve G₂ fazlarını içermektedir. (Gap=G) (48, 49). G₁ fazı, hücrenin metabolik değişikliklerle bölünmesi için hazırlıkların yapıldığı aşamadır. Bu aşamada hücrenin boyutunda büyüme meydana gelir. S fazında DNA sentezi gerçekleşir, G₂ fazı ise hızlı hücre büyümesinin gerçekleştiği ve mitozu hazır hale geldiği dönemdir. Mitoz ve sitokinez, mitotik (M) fazda meydana gelir. Bu döngü, G-S, G-M gibi kritik kontrol noktaları ve metafaz anafaz kontrol noktaları tarafından sağlanır. Bu döngünün kontrolü, siklinler olarak bilinen birkaç protein ailesi tarafından düzenlenir (50). Hücre döngüsü fazları Şekil 2.3.'te verilmiştir.



Şekil 2.3. Hücre döngüsü fazları (51).

Hücre döngüsü kontrolü, kanser gelişimini önlemede çok önemlidir. Hücre döngüsü, hücrelerin uygun şekilde çoğalmasını ve bölünmesini sağlayan, sıkı bir şekilde düzenlenen bir süreçtir. Genomun bütünlüğünü sağlayan karmaşık bir protein

ağı ve düzenleyici yollar tarafından kontrol edilir. Hücre döngüsü düzensizliği, kontrolsüz hücre büyümesi ve çoğalmasının yanı sıra apoptoz gibi diğer kanser belirtilerine de yol açabilir. Siklin inhibitörleri ve kontrol noktası aktivatörleri, özellikle diğer tedavilerle kombinasyon halinde kanser tedavisinde umut vaat etmektedir (48). *In vitro* çalışmalar, statinlerin hücre döngüsünü düzenleyen bu proteinleri etkilediğini göstermiştir (52). Statinlerin bu proteinlerin ekspresyonu üzerindeki etkisiyle G1/S ve G2/M'de hücre döngüsü durmasına neden olur (43). Statin ailesi üzerinde bu konuda çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Fluvastatin ile ilgili bir çalışmada, servikal kanser hücre hattında hücre döngüsü üzerindeki etkisi akım sitometrisi ile incelenmiştir (53). Kontrole kıyasla S fazı yüzdesinde önemli bir azalma ile bu hücrelere 48 saat maruz kalındığında orta derecede G1 fazı durması gözlemlendiği vurgulanmıştır. Ayrıca, bu çalışmaya göre apoptotik hücre yüzdesinde önemli bir artış gözlemlenmiştir. Simvastatin, lovastatin veya mevastatine 48 saat maruz bırakılan embriyonal karsinom, yumurtalık kanseri ve kolorektal kanser hücrelerinin hücre döngüsü analizi üzerine yapılan başka bir çalışmada, kontrol gruplarına kıyasla S fazındaki azalma gibi hücre sayısında azalma olduğu kaydedilmiştir (54). Başka bir çalışmada araştırmacılar, statinlerin neden olduğu antiproliferatif etkinin, hücre döngüsündeki G1 ve G2/M fazlarındaki hücre yüzdesindeki artışla ilişkili olabileceğini vurgulamıştır (55). Hücre döngüsü analizleri uzun zamandır akım sitometrisi ile yapılabilmektedir. Akım sitometrisinin ilk günlerinden itibaren hücre döngüsü analizinin değerli bir uygulama haline geldiği vurgulanmaktadır. Akım sitometrisini hücre döngüsü analiziyle birleştirmeye yönelik önemli sayıda yaklaşım vardır. (56).

Kanser Tedavisinde Statinlerin Yeri

Kanser, kontrolsüz bölünme ve çoğalma sonucu oluşan bir hastalıktır. Belirli kanser türleri için standart yaklaşımlar geliştirilmiş olmasına rağmen, kanser kişiye özel bir hastalıktır. Günümüzde mevcut tedavilere ek olarak teknolojinin ilerlemesi ile yeni yöntemler geliştirilmeye devam edilmektedir (57). Bu çalışmalar arasında kanserin biyolojik temeline dair anlayışımız büyük ölçüde artmıştır. İnsan genomunun dizilenmesi, kanserin moleküler etkenlerini tanımlamak için kullanılan teknolojilerin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu durum da, moleküler hedefli tedavilerin rasyonel

tasarımına yol açmıştır. Ancak kanserdeki genetik duruma bağlı olarak görülen değişkenlik, bireye özgü tedaviyi akla getirmektedir. Hedefe yönelik tedavilere karşı ortaya çıkan direnç gelişimi, ek terapötik stratejilerin hala gerekli olduğu anlamına gelmektedir (58).

Son 20 yılda epidemiyolojik çalışmaların ve klinik verilerin desteğiyle statinlerin kanserin önlenmesinde ve tedavisinde önemli rol oynayabileceği vurgulanmıştır. Statinlerin antikanser etkisi henüz tam olarak anlaşılammıştır. Statinlerin olası antikanser etkisi statin tipine ve tümörün tipine bağlıdır (59). Bu yönde geçtiğimiz birkaç yılda yapılan çalışmalar, statinlerin farklı kanser türlerinin tedavisinde faydalı etkilerini vurgulamıştır. Yaklaşık 200.000 kişiden oluşan geniş bir kohort çalışmada, uzun süreli statin kullanımının farklı kanser hastalarında hayatta kalma oranlarını iyileştirmedeki olumlu etkisinin altı çizilmiştir (60). Yapılan bir çalışmada, statinlerin karaciğer kanseri riskiyle ters ilişkili olduğunu, statine maruz kalma süresine bakılmaksızın statin kullanan bireyler arasında karaciğer kanseri riskinde azalma olduğunu göstermektedir. Hayvan modellerinde yapılan ilk çalışmalarda statinlerin karsinojenitesine ilişkin endişeler ortaya konduğunda, statinlerin birincil karaciğer kanserine karşı kemopreventif bir potansiyele sahip olabileceğini öne süren çalışmalar giderek artmaktadır (61).

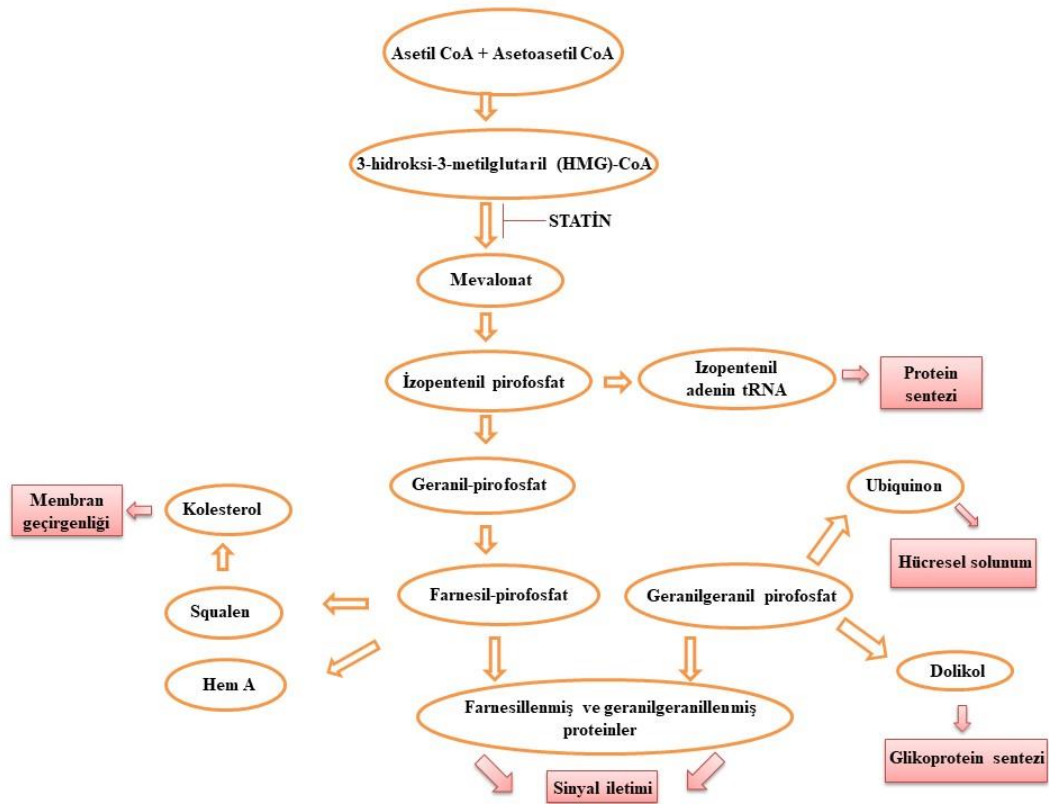
Statinlerin antikanser ilaçlar olarak veya geleneksel kemoterapötik ilaçlarla kombine adjuvan olarak kullanımı kanıtlanmıştır (62). Bazı araştırmalar, statinlerin ve antineoplastiklerin birlikte uygulanmasının sinerjistik sitotoksositeye neden olduğunu göstermiştir (59, 63). Statinlerin diğer ajanlarla kombinasyon tedavisinin hem lipid hedeflerine ulaşmak hem de eşlik eden hastalıkları tedavi etmek için giderek daha yaygın hale gelmesi muhtemeldir. Statin türleri sitokrom P450 tarafından metabolize edilen ilaçlarla etkileşime girme derecesine göre farklılık gösterir. Sitokrom P450 tarafından metabolize edilen ilaçlarla etkileşim riski düşük olan pitavastatin, bu nedenle dislipidemi ve kardiyovasküler hastalığın tedavisinde yararlı bir katkı sunar (64).

Kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar önermek için statinler ile hücre proliferasyonunun inhibisyonu arasındaki bağlantıyı anlamak faydalı görünmektedir. Yapılan çalışmalar ışığında elde edilen veriler, statinlerin plazma ve tümörlerde yüksek konsantrasyon ve birikiminin antikanser etkisine önemli ölçüde fayda

sağlayacağı bulgusunu desteklemektedir (65). Veriler, statinlerin sağlıklı hücrelerde ve kanser hücrelerinde hücre döngüsünü belirli aşamalarda durdurduğunu ve uyardığını göstermektedir. Hücre ölümü, oksidatif stres ve ROB oluşumu ile yakından ilişkilidir çünkü bu oluşumlar lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi hayati makromoleküllere ciddi şekilde zarar verir. Statinlerin mitokondriyal disfonksiyona neden olduğu ve bunun da ROB üretiminde artışa neden olduğu düşünülmektedir (66).

Kanser hücrelerinin, yüksek düzeyde çoğalmayı sürdürmek için daha fazla kolesterol ve kolesterol üretiminde kullanılan bileşenlere ihtiyaç duyduğu gösterilmiştir. Ayrıca, şaşırtıcı bir şekilde, kanser teşhisi konan hastalarda dolaşımdaki kolesterol düzeylerinin sürekli olarak daha düşük olduğu gözlenip, ancak tümörün zarında yüksek olması, kolesterolün kanserli hücreler ve tümörler tarafından kullanımının karsinojenez ve belki de metastazın önemli bir göstergesi olduğunu göstermektedir. Statinler mevalonat yolunun ilk aşamasını etkilediğinden, bu ilaçların güçlü klinik etkileri, kolesterol sentezini sınırlayarak veya izoprenoid oluşumunu engelleyerek kanserin büyümesini engelleyebilir. Ek olarak statinler, karsinojenezi ve metastazı engelleyebilen proinflamatuvar sitokinlerin üretimini baskılayarak antiinflamatuvar özelliklere de sahiptir. Statinlerin prenilasyonu azaltma yeteneği, karsinojenez ve kanser ilerleme yolları yoluyla sinyal iletimini baskılayabilir (44). Statinlerin insan meme adenokarsinomu hücre dizisi (MCF-7) üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışmada, hücre ölümü, ROB üretimi ve mitokondriyal membran potansiyeli gözlenmiştir. Statinlerin hem apoptoza hem de nekroza neden olduğu gösterilmiştir. Statinlerin tek başına veya doksorubisin veya sisplatin gibi antineoplastik ajanlarla kombinasyon halinde uygulanmasının meme kanseri tedavisinde etkili bir alternatif olabileceği vurgulanmıştır (55). Halihazırda devam eden fazla klinik çalışma vardır, ancak statinlerin kanser tedavisinde kullanımına ilişkin bilgiler yetersizdir (67). Son ilaç çalışmaları, statinlerin farklı kanser türlerinde antikanser etkisini ortaya koymuştur. Ayrıca, çeşitli kanser hücrelerinde etki mekanizmalarını aydınlatmak için birçok çalışma yapılmıştır. Statinlerin ana antikanser mekanizması, hücre zarı bütünlüğü, hücre döngüsü ilerlemesi ve protein sentezi gibi hücre fonksiyonlarının sürdürülmesinde gerekli olan mevalonat yolunun inhibisyonudur. Bu inhibisyon kanser büyümesinin ve ilerlemesinin baskılanmasına yol açar (5).

Hücre ölümüne neden olan diğer bir temel mekanizmanın mevalonat yolundan meydana geldiği düşünülmektedir. Bu şekilde statinler, kolesterol sentezini ve birçok molekülü, örneğin koenzim Q10'u (KoQ10) inhibe eder. KoQ10, ubikinonlar olarak bilinen elektron taşıma zinciri bileşenlerinden biridir. KoQ10, ATP enerjisinin üretiminde rol oynar. Bu nedenle KoQ10 konsantrasyonundaki azalma, özellikle mitokondriyal disfonksiyonun düzenlenmesinde gözlenen önemli bir husustur. Çalışmalar, statinlerin KoQ10 üzerindeki etkisiyle ATP üretiminde azalmaya yol açabileceğini ve bu etkinin sitotoksositeye neden olabileceğini göstermiştir (68). Mevalonat yolağına Şekil 2.4.'ten ulaşılabilir.



Şekil 2.4. Mevalonat yolağı (69).

Statinlerin karaciğer kanseri üzerinde olumlu etkisi olduğunu öne süren başka bir çalışmada, bir grup bilim insanı, bir meta-analize göre, statin kullanımının maruz kalma süresinden bağımsız olarak karaciğer kanseri riskinde %40 oranında azalmaya neden olduğunu bildirmiştir. Bu kullanımın karaciğer kanseri riski ile ters orantılı olduğu da bildirilmiştir (61).

Tüm statinlerde belirgin antikanser etkiler gözlenmesine rağmen mevcut veriler, her bir statin türevinin antitümör etkilerinde bazı farklılıklar olduğunu ileri sürmektedir. Ayrıca statinler, farmakokinetik 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 (65).

Statinlerin hücre proliferasyonu, apoptoz, inflamasyon, anjiyogenez ve oksidatif stres gibi tümör gelişiminde önemli rolleri olan birçok hayati sürece müdahale ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, statinlerin tümör gelişimini modüle etme kapasitesine ilişkin sonuçlar hala tartışmalıdır. Statinlerin aktivitelerinin, statin tipine, hücre dizisine, statin dozuna ve inkübasyon süresine büyük ölçüde bağlı olduğu düşünülmektedir (70). Bununla birlikte klinik çalışmalarda statinlerin antikanser etkileri üzerine vurgu yapılmaktadır. Bu çalışmaların genel değerlendirmesi, statinlerin diğer ajanlarla kombinasyonunun, tek başına yapılan denemelerden daha umut verici sonuçlar verdiğini göstermiştir. Bu kombine tedavilerdeki potansiyel sinerjileri araştırmak ve doğrulamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu açıktır (71).

Statinlerin Antioksidan-Oksidan Etkisi

Hipolipidemik amaçla kullanılan statinlerin oksidatif stresi azaltarak kardiyovasküler hastalıklarda antioksidan yönüyle de kullanıldığı bilinmektedir. *İn vitro* ve *in vivo* modellerle yapılan birçok çalışma, statinlerin ROS üretimini azaltarak kalp rahatsızlıklarında koruyucu ajan olarak kullanımını desteklemektedir. Ancak statinlerin oksidatif stres üzerindeki etkisi çeşitli doku ve organlarda farklılık göstermektedir (35). Oksidatif stres, kanserin önemli bir nedeni olarak giderek daha fazla tanınmaktadır (72). Birçok çalışmada, statine bağlı toksisitenin altında yatan mekanizmalardan birinin oksidatif strese bağlı olduğu düşünülmektedir. Antioksidan savunma yetersizliğinin veya serbest radikallerin aşırı üretiminin oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir (35).

Bazı durumlarda, oksidatif stresin varlığı iyi olabilir; bağışıklık reaksiyonları ROB'a bağlıdır ve ROB'un hücre sinyal mekanizmasında önemli rolleri vardır. Oksidatif stres diyabet, kanser, artrit, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmiş olup oksidatif stresin hastalığın nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu net değildir (73). Statinler ile oksidatif stres arasındaki ilişkiyi analiz eden çalışmalardan biri, statinlerin izole edilmiş sıçan hepatositlerinde ROB oluşumunu arttırdığını göstermiştir. Söz konusu çalışmada araştırmacılar, üç farklı statinin hücre üzerindeki etkisini farklı konsantrasyonlarda uygulamışlardır. Statin uygulamasından sonra ROB oluşumuna ek olarak lipid peroksidasyonunda bir artış bildirmişlerdir. Hücresel mitokondriyal membran potansiyelinde de bir artış gözlenmiştir. Ayrıca L-karnitin uygulamasının statine bağlı bu toksisite belirteçlerinde azalmaya neden olarak önleyici bir ajan olarak değerlendirilebileceği gösterilmiştir (74). Bu çalışmada gözlemlendiği gibi statinlerin artan oksidatif strese neden olduğunu doğrulayan *in vitro* çalışmalarda benzer sonuçlar kaydedilmiştir. Bir başka çalışmada, murin kolon karsinomu ve melanom hücrelerinde simvastatin sitotoksitesinde oksidatif stresin rolünü açıklığa kavuşturmak için yola çıkmış ve simvastatinin hücre içi oksidatif hasarı artırarak ve apoptozu indükleyerek hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (75).

Statinlerin Genotoksik Etkisi

Oksidatif saldırıların en önemli hedeflerinden birinin DNA olduğu bilinmektedir. Onarım mekanizmaları oksidatif DNA hasarını ortadan kaldıramazsa, yaşa bağlı işlevler ve ardından malignite gelişimi de dahil olmak üzere hücrelerde disfonksiyon meydana gelebileceği bilinmektedir. Bu nedenle statinlerin DNA üzerindeki etkileri önemlidir (72).

Tek Hücre jel elektroforezi yöntemi diğer adıyla Comet testi neredeyse tüm hücre tiplerinde DNA hasarının araştırılmasına izin verir. Genotoksik ajanlara maruz kalmanın bir göstergesi olarak DNA hasarını tespit etmek için yaygın olarak kullanılır. Comet testi, insan, çevre ve ekogenotoksikolojik çalışmalarda kullanılan bir yöntemdir ve genotoksikite testlerinde biyositler, kimyasal ürünler, zirai ilaçlar, ilaçlar ve gıda katkı maddelerinin genotoksikite etkisini tespit etmek için yapılır (76). DNA hasarının

değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan Comet testi basit, hassas, hızlı ve çok yönlü bir test olup ökaryotik hücrelerde hemen her hücre tipi için kullanılabilir. (73).

ROB, DNA kırılmalarına neden olur ancak diğer birçok ajan da öyledir ve kırılmalar, DNA onarımında ara maddeler olarak da görünebilir. Oksidatif saldırının daha spesifik bir göstergesi, oksitlenmiş pürinlerin veya pirimidinlerin varlığıdır. Genotoksinlere mesleki veya çevresel maruziyetin bir sonucu olarak hasardaki (baz oksidasyonu dahil) artışların kanser riskini artırması muhtemeldir ve Comet analizi bu alanda yararlı bir araştırma aracıdır (73).

Statinlerin olası genotoksik etkileri ile ilgili birçok çalışma bulunmakta olup genel olarak yapılan çalışmalarda statinlerin klinik kullanımda genotoksik risk oluşturmadığı görülmektedir. Statinlerin potansiyel genotoksik etkilerini değerlendiren çalışmalar arasında, in vivo ve in vitro mutajenite deneyleri yer almaktadır. Bu çalışmalara örnek olarak bir grup araştırmacı lovastatinin genotoksik potansiyelini Comet testi ile incelemiş ve doksorubisinin neden olduğu DNA kırıklarını onardığını, topoizomera II inhibitörlerine direncin lovastatin ile DNA hasarında azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar, lovastatinin antikanser ilaçların yan etkilerini hafifletmek için klinik olarak yararlı olabileceğini vurgulamıştır (77).

Bazı araştırmalar, çeşitli kanser türlerinde statinlerin antikanser yönünü vurgulamaktadır. Yukarıdaki çalışmalara göre, statinlerin standart ve fpg ile modifiye edilmiş alkalın Comet testi, mikronükleus testi, kromozom aberasyonu ve kardeş kromatit değişim testleri kullanılarak genotoksik bir ajan olduğu öne sürülmüştür. Fpg enziminin varlığında ve yokluğunda Comet parametreleri arasındaki fark, statinlerin neden olduğu DNA hasarına oksidatif stresin aracılık ettiğini düşündürmüş olup memeli sistemlerde detaylı çalışmalar yapılması gerekmektedir (37).

Statinlerin Apoptoz Yolağı Üzerine Etkileri

Apoptoz, organizmaların gelişimi ve homeostazında önemli bir rolü olan programlanmış bir hücre ölümü şeklidir. Bu süreç çok çeşitli enzim ve organel tarafından kontrol edilir (78). Apoptoz, kontrollü bir şekilde hasar görmüş hücrelerin hızlı bir şekilde uzaklaşmasına izin verir. Buna karşılık, aşırı hücre hasardan kaynaklanan bir hücre ölümü şekli olan nekroz sırasında, hücreler parçalanır ve

sitoplazmik materyal serbest kalır. Apoptozun başlatılması oldukça koordineli ve düzenlenmiş bir süreçtir. B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) ailesi proteinleri (Bax, Bak ve Bcl-2), IL-1 b-dönüştürücü enzim (ICE) proteazları (kaspazlar) ve tümör protein 53 (p53) gibi birçok farklı hücre içi ve hücre dışı sinyal tarafından indüklenebilir veya baskılanabilir. p53, insan kanserlerinde en sık değişen genidir. DNA hasarı, G1'de hücre döngüsü durmasına veya apoptozun indüklenmesine yol açan p53 ekspresyonunu indükler. Bax, nükleer matris ve nükleer zarfinkiler de dahil olmak üzere çeşitli proteinlerin bölünmesine aracılık eden ve sonunda DNA parçalanmasına yol açan kaspazların aktivasyonu ile memeli hücrelerinde apoptozu indükler (79). Ayrıca, Bcl-2 ailesi, homeostaz ve bağışıklık gibi olayları kontrol eden bir süreç olan içsel apoptozu düzenleyen bir gen grubudur. Aile üyelerinin apoptoz ve hücre ölümünde oynadığı önemli roller iyi bilinmektedir. Daha yüksek organizmalarda Bcl-2 proteinleri, mitokondriyal dış zarın bütünlüğünü düzenleyerek intrinsik apoptozu koordine eder; bu fonksiyonun bazal metazoalardan kaynaklandığı görülmektedir (80). Bcl-2 ve Bcl-xL'deki azalmalar ve Bax'teki artış, proapoptotik bir hücre ortamını destekler. Statinlerin kardiyovasküler olmayan hastalıklardaki etkileri için önerilen mekanizmalardan biri, proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 protein ailesinin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikleri içerir. Birkaç rapor, statinlerin anti-apoptotik protein Bcl-2 seviyelerini düşürdüğünü ve apoptozu ve hücre ölümünü arttırdığını bulmuştur. Buna karşılık, statinlerin, apoptozu ve hücre ölümünü desteklediğine ve bazı durumlarda Bcl-2 seviyelerini arttırdığına dair kanıtlar da mevcuttur. Statinlerin proapoptotik etkilerini destekleyen kanıtların tümü olmasa da çoğu, kanser hücre hatlarındaki verilere ve nispeten yüksek ilaç konsantrasyonlarının kullanımına dayanmaktadır. Statinlerin antiapoptotik etkisini gösteren çalışmalar daha azdır ve genellikle çok daha düşük ilaç konsantrasyonları ve normal hücreler kullanılmıştır (81).

Farklı mekanizmalarla ölümden kaçınmak, karsinogenezin önemli bir moleküler yönüdür. Bu nedenle apoptozu tetiklemek kanser tedavisinin temel hedeflerinden biri haline gelmiştir. Apoptoz mekanizması oldukça karmaşıktır ve intrinsik ve ekstrinsik olarak adlandırılan iki ana yolla aktive edilir. Apoptozun her iki yolu da kaspaz aktivasyonu ile çalışır. Her iki apoptoz yolunun en kritik hedefleri ölüm reseptörleri, adaptör proteinleri, Bcl-2 ailesinin pro ve antiapoptotik proteinleri,

hücre içi ROB ve Ca²⁺ seviyeleri, mitokondriyal membran geçirgenliği, p53 ve başlatıcı ve efektör kaspazlar olarak görülmektedir (82). Hücreler, içsel veya dışsal sinyalleri aldıktan sonra kaspazlar aracılı yolların rotasını takip eder. Kaspazlar, farklı türde düzenlenmiş hücre ölümü, apoptoz ve piroptozu aracılık ederek hücre ölümünü indüklemek için farklı substratları parçalar (83, 84).

Ekstrinsik sinyal yolağı, apoptozu indüklemek için dış sinyaller tarafından başlatılan apoptotik bir sinyal yoludur. Bu yolun başlatılmasındaki ilk adım, TNF'ye bağlanan ölüm ligandlarını içerir. Çeşitli tipte ölüm ligandları vardır; bunlar arasında Fas ligandı (Fas-L), tümör nekrozu ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand ve TNF bulunur. Ölüm reseptörleri, ekstrinsik yolun aktivasyonunu hafifleterek hayati bir rol oynar (85). Ekstrinsik sinyal yolunda, ölüm reseptörü ile onun ligandının bağlanmasıyla oluşan sinyal kompleksi kaspaz-8 oluşumunu sağlarken, kaspaz-8 sırasıyla efektör kaspazlar olan 3,6 ve 7'yi aktive eder. Kaspaz-3 nihai uygulayıcı kaspazdır ve apoptoz sırasında PARP'ın bölünmesinden birincil derecede sorumludur (83, 84).

Kaspaz-6 bir apoptoz yürütücü kaspaz olarak kategorize edilir ancak diğer yürütücülerden önemli farklılıklar gösterir. Genel olarak, kaspaz-6'nın apoptoz dışındaki biyolojik süreçlerdeki işlevleri hakkında çok az şey bilinmektedir. Alzheimer hastalığı dahil olmak üzere çeşitli nörolojik bozukluklarla ilişkilendirilmiş olsa da, işlevi ve diğer biyolojik süreçlerdeki rolü tam olarak bilinmemektedir (86). Kaspaz-7'nin ise kaspaz-3 ile ortak birkaç endojen protein substratına sahip olması ve her iki kaspazın da sırasıyla ölüm reseptörü ve DNA hasarı ile indüklenen apoptoz sırasında başlatıcı kaspaz-8 ve -9 tarafından proteolitik olarak aktive edilmesi sebebiyle kaspaz-7'nin spesifik özellikleri ile ilgili yeterli bilgi mevcut değildir. Bununla birlikte, giderek artan biyokimyasal ve fizyolojik veriler, kaspaz-7'nin kaspaz-3'ten önemli şekillerde farklılıklar da gösterdiğini ortaya koymaktadır. Örneğin, birkaç substrat kaspaz-7 tarafından spesifik olarak parçalanırken kaspaz-3 tarafından parçalanmaz (87).

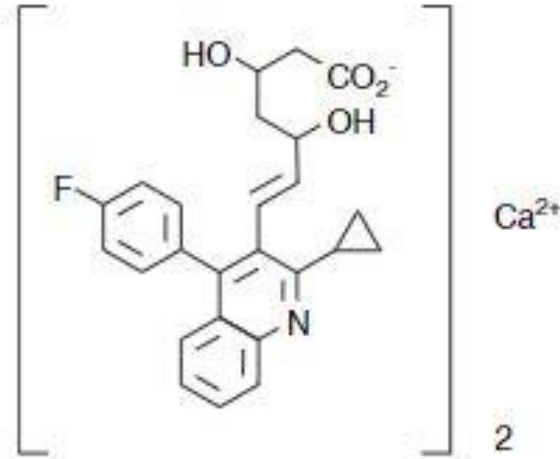
İntrinsik ya da mitokondriyal yolda, ilaçlar, radyasyon, oksitleyici ajanlar, toksinler, ksenobiyotikler gibi hücre dışı uyarılara ve hipoksi, aşırı yüksek sitozolik kalsiyum konsantrasyonları, ROB, endoplazmik retikulum stresi, mitokondriyal translokasyon gibi hücre içi uyarılara yanıt olarak aktive edilir. Bcl-2 ailesi bu yolağı

düzenler (82). İntrinsik sinyal yolağında, sitokrom c mitokondriden sitoplazmaya salınır ve apoptotik peptidaz aktive edici faktör-1, deoksiadenozin trifosfat ve kaspaz-9 ile oligomerize olarak kaspaz-9'u aktive eder. İlginç bir şekilde, DNA hasarı gibi strese yanıt olarak sitokrom c, sitoplazmik kaspaz aktive edilmeden önce çekirdeğe göç eder. Sitokrom c aktiviteleri, translyasyon sonrası modifikasyonlar tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Spesifik olarak fosforilasyon, proteinin çoklu aktiviteleri arasında geçiş görevi görebilir. Bu yolların düzensizliği birçok hastalığın patogeneğinde önemli bir rol oynar (88).

Bu yolak üzerine yapılan bir çalışmada atorvastatinin, ROB üretimini arttırdığı ve ardından kaspaz-9, -3'ü ve Bcl-2/Bax'ın karşılıklı regülasyonunu aktive ettiği bildirilmiştir. Bununla birlikte MMP'nin azalması ve sitozolik sitokrom c, Apaf1, kaspaz-9'un yanı sıra farklı p38, Jun kinaz ve hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz mitojenle aktive olan protein kinazların fosforilasyonunda artış gözlemlendiği belirtilmiştir (35). Bu sonuçlar kesin değildir ve kardiyovasküler olmayan hastalıklar için statini yeniden konumlandırmanın doğru olup olmadığını belirlemek için kesinlikle ek araştırmalara ihtiyaç vardır.

2.5. Pitavastatin

Statin ailesinin son üyesi pitavastatindir (89). Pitavastatinin kimyasal adı (+)-monokalsiyum bis (3R,5S,6E)-7-(2-siklopropil-4-[4-florofenil]-3-kinolil-3,5-dihidroksi-6-heptenoat olup sentetik yolla üretilen pitavastatinin yapısı Şekil 2.5.'te verilmiştir (90). Pitavastatin, güçlü farmakolojik etkisini HMG-CoA redüktazın aktif bölgesine güçlü bir şekilde bağlanarak elde eder. HMG-CoA redüktaz hidrofilik alanlar ve hidrofobik alanlardan oluşur ve pitavastatinin bu aktif kısımda hidrofilik amino grupları ile 10 hidrojen bağı oluşturduğu düşünülmektedir. Siklopropil grubu, yapı-aktivite ilişkisinin önemli bir özelliğidir ve bu grup, HMG-CoA redüktazın hidrofobik alanlarına uyumludur. Pitavastatinde siklopropil grubu yerine izopropil grubu bulunur. Analoglarının inhibitör aktivitesinin pitavastatininkinin yalnızca beşte biri kadar olduğu bildirildiğinden pitavastatin, enzim yapısına uyacak şekilde tasarlanmış bir bileşik olarak kabul edilebilir (91).



Şekil 2.5. Pitavastatin kalsiyum yapısı (91).

Pitavastatin kalsiyum normal koşullarda beyaz katı formda olup oda sıcaklığında saklanmaktadır. Fizikokimyasal özellikleri Tablo 2.5.'te özetlenmiştir.

Tablo 2.5. Pitavastatin kalsiyumun fizikokimyasal özellikleri (92).

<i>Fizikokimyasal özellik</i>	<i>Özellik</i>
Formülü	C ₅₀ H ₄₆ CaF ₂ N ₂ O ₈
Molekül ağırlığı	880,98
CAS numarası	147526-32-7
Görünümü	Beyaz toz
Safsızlık	≥%98
Saklama koşulları	Oda sıcaklığı

Pitavastatin de diğer statinler gibi kolesterol üreten bir enzim olan HMG-COA redüktazın inhibitörüdür. Lipit ve kolesterol düşürücü etkileri nedeniyle hiperlipidemi ve ateroskleroz tedavisinde yaygın olarak reçete edilen ilaçlardandır. Primer hiperlipidemi veya karışık tip dislipideminin tedavisinde kullanılmak üzere Japonya'da 2003 yılında medikal kullanıma sunulmuş FDA tarafından 2009'da onaylanmıştır (93, 94). Pitavastatin, koroner, serebrovasküler ve periferik arter hastalığı riski yüksek olan kişilerde hiperkolesterolemi tedavisinde endikedir.

Mortalite üzerine etkisi gösterilmemiştir. Pitavastatinin 1, 2 ve 4 mg'lık tabletler halinde formları mevcuttur ve oral yolla kullanılır. Tavsiye edilen doz, tolere edilebilirlik ve lipit seviyelerine bağlı olarak günde bir kez 2 ila 4 mg'dır (95). Kolesterolü düşürmede çok güçlü etkiye sahip benzersiz bir lipofilik statin olarak değerlendirilmektedir (93). Pitavastatinin oral emilimi %80 ile fluvastatinden sonra ikinci sıradadır ve proteine bağlanma düzeyi de oldukça yüksektir (pitavastatin, simvastatin, atorvastatin ve lovastatin için >%95, pravastatin için %50) (96).

Pitavastatin maksimum plazma konsantrasyonuna oral uygulamadan sonra yaklaşık 1 saat içinde ulaşır. Biyoyararlanımı %60'ın üzerindedir. Kolonda bir miktar emilimi vardır; ancak emilimi esas olarak ince barsakta meydana gelir. Diğer tüm statinlerle karşılaştırıldığında pitavastatin, en yüksek plazma konsantrasyonlarına en hızlı şekilde ulaşır ve en yüksek biyoyararlanıma sahiptir. Pitavastatin büyük ölçüde proteine (> %99) ve öncelikle albümin ve alfa-1 asit glikoproteine bağlanır (95).

Pitavastatin esas olarak karaciğer UGT'leri yoluyla glukuronidasyon yoluyla metabolize edilir ve sitokrom P450 enzimleri tarafından nispeten yalnızca minimum düzeyde metabolizma vardır (95). CYP2C9 ve CYP2C8 substratı olması yönleriyle bilinir (97). Pitavastatin, farmakokinetik özellikleri ve minimum ilaç etkileşimine sahip olması yönüyle oldukça avantajlıdır (97-99). Pitavastatinin serum konsantrasyonunu azaltabilen ve artırabilen ilaçlar Tablo 2.6.'da özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Pitavastatinin serum konsantrasyonunu azaltabilen ve artırabilen ilaçlar (95).

Pitavastatinin serum konsantrasyonunu azaltabilen ilaçlar	Pitavastatinin serum konsantrasyonunu artırabilen ilaçlar
Darunavir	Siklosporin
Ritonavir, lopinavir	Eritromisin
Ezetimib	Rifampin
Digoksin	Atazanavir
İtrakonazol	Gemfibrozil
	Fenofibrat
	Enalapril
	Diltiazem

Lipofilik statindir ve enterohepatik siklusa girmesi sebebiyle uzun bir yarılanma ömrüne sahiptir (yaklaşık 11 saat). Bu süre çok önemlidir, bu durum pitavastatinin 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzimini tutarlı bir şekilde inhibe etmesine neden olur. Pitavastatinin büyük bir kısmı (%79) feçesle, yaklaşık %15'i ise idrarla atılır (95).

Düşük metabolizma ve yüksek biyoyararlanım gibi diğer statinlerden farklı olan bazı farmakodinamik ve farmakokinetik özellikler, ilave potansiyel faydaların altında yatan sebepler arasındadır. Sınırlı veri nedeniyle, lipoproteinler üzerindeki potansiyel olumlu etkilerinin hala doğrulanması gerekmektedir. Diğer statinler gibi pitavastatinin de inflamasyon, fibroz, endotel fonksiyonu, anjiyogenez, apoptoz, hücre döngüsü ve adezyon moleküllerinin düzenlenmesi gibi farklı biyolojik süreçler üzerinde lipit dışı faydalı etkileri vardır. Günümüzde pitavastatinin kanser nüks ve ölüm riskinin azalmasıyla ilişkili olduğu ve kemoterapötik ilaçlarla kombinasyon halinde dirençli tümör hücrelerinde direncin aşılmasında etkili olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, kanser çalışmalarında uygulanması için potansiyel bir terapötik ajan olarak pitavastatine ilgi artmıştır (100).

Pitavastatinin bu lipitten bağımsız etkileri osteoartrit, astım, kanser, nörolojik, hepatik ve renal bozukluklar gibi çeşitli durumları esas olarak antiinflamatuvar ve antioksidan mekanizmalar yoluyla etkilemesidir. Tüm bu etkilerinden dolayı (aynı zamanda yüksek güvenliğinden dolayı), pitavastatin birçok hastalığın tedavisinde geleneksel tedaviye ek olarak bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. Statinler arasında pitavastatinin meme kanseri ve glioblastoma kanser hücrelerinin canlılığını azaltmada diğer statinlere göre daha etkili olduğu gösterilmiştir (93, 94). Ayrıca, pitavastatinin pankreas kanseri hücrelerine karşı antikanser aktivitesine sahip olduğu ve hücre canlılığı, tümör sferoid büyümesi ve koloni oluşumunda ciddi azalmalar sağladığı gösterilmiştir (101). Bir başka çalışmada, pitavastatinin oral skuamöz hücreli karsinom üzerindeki olası antikanser etkisi değerlendirilmiş ve pitavastatinin, hücre canlılığını seçici olarak baskıladığını ve intrinsik apoptozu indüklediği ortaya konmuştur (5). Pitavastatinin çeşitli klinik öncesi kanser modellerinde güçlü antikanser aktivitesine sahip olabileceği de gösterilmiştir. Antikanser aktivite, pitavastatinin *in vivo* beklenen plazma konsantrasyonlarına klinik olarak uygun konsantrasyonlarda ulaşması ve kanser hücrelerinde büyümeyi inhibe etmesi ve

apoptozu indüklemesi ile elde edilmektedir (102). Bununla birlikte, pitavastatinin farklı hastalıkların tedavisindeki etkisini araştırmak, açıklamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

2.6. Tez alışmasında Kullanılan Yöntemler

Toksikolojide 3R (replacement, reduction, refinement) prensibine göre *in vitro* modellerin kullanımı yaygındır. Mekanistik çalışmaların daha geniş doz aralığında *in vitro* modellerle yapılması avantajlıdır. Bu alışmada HeLa hücre hattınının kullanılmasının temel nedeni, HeLa hücre hattı üzerinde pitavastatin ile daha önce herhangi bir çalışmanın yapılmamış olmasıdır. Bu nedenle, daha önce yapılan ön çalışmada sitotoksisite testleri uygulanarak genel doz taraması yapılmıştır ve bu tez çalışmasında da ilk adım olması hedeflenmiştir (6). Bu açıdan baktığımızda öncelikle pitavastatinin sitotoksisitesi geniş bir doz aralığında incelenmiş ve daha sonra bu bilgiler ve literatür ışığında hücre döngüsü analizi, apoptoz, DNA hasarı, oksidatif stres gibi detaylı mekanistik çalışmalar yapmak bu tez çalışmasında hedeflenmiştir. Amaç pitavastatinin HeLa hücreleri üzerindeki etkisini daha detaylı incelemektir. HeLa hücre hattını kullanmanın asıl amacı, farklı kanser tedavilerinde başarılı sonuçlar veren pitavastatinin serviks kanseri tedavisindeki rolünü incelemektir.

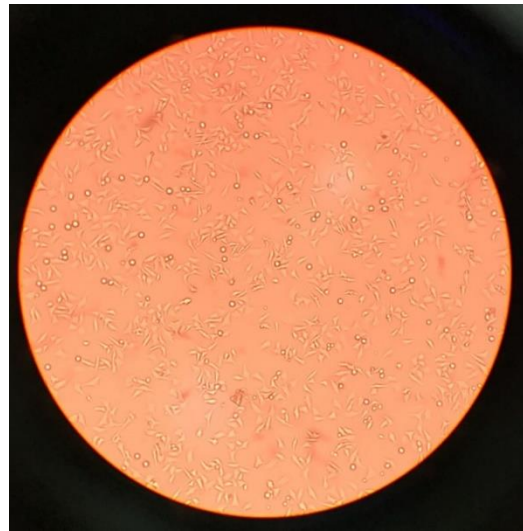
2.6.1. Kullanılan Hücre Hattı: HeLa Hücre Hattı

HeLa hücreleri hücreesel ve moleküler biyolojide en yaygın kullanılan hücre dizilerinden biridir. HeLa, kültürde oluşturulan ilk insan hücre dizisidir ve o yıllardan beri biyolojik araştırmalarda en yaygın kullanılan insan hücre dizisi haline gelmiştir. Model organizma olarak uygulanması, önemli biyolojik süreçlerin karakterizasyonuna ve 70.000'den fazla yayına katkıda bulunmuştur. Hücre dizisi, daha sonra 1951'de kanserden ölen Henrietta Lacks adlı bir hastanın serviks kanseri tümöründen elde edilmiştir. HeLa hücrelerinin ilk kullanımlarından biri, ocuk felci virüsüne karşı aşı geliştirmek amacıyla olmuştur. Ancak, son zamanlarda, HeLa hücrelerinin merkezi bir rol oynadığı keşifler, yani HPV ile serviks kanseri arasındaki bağlantıda telomerazın rolü nedeniyle iki Nobel ödülü almıştır (103). Bu tez çalışmasında kullanılan hücre hattı Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (American Type Culture Collection=ATCC), (ATCC® CCL-2™) temin edilmiştir (104). HeLa hücre hattına

ait özellikler Tablo 2.7.'de özetlenmiş ve HeLa hücrelerinin mikroskopik görünümü Şekil 2.6.'da verilmiştir.

Tablo 2.7. ATCC'den temin edilen HeLa hücre hattına ait özellikler (104).

Elde edildiği organizma	<i>Homo sapiens</i> , insan
Hücre tipi	Epitel hücreleri
Morfoloji	Epitelyal
Organ	Uterus; serviks
Patojenite	Adenokarsinoma
Uygulamalar	3 boyutlu hücre kültürü Biyoüretim
Ürün formatı	Donmuş
Saklama koşulları	Sıvı azot buharı



Şekil 2.6. HeLa hücrelerinin mikroskopik görünümü.

2.6.2. Apoptozun Değerlendirilmesi

Geçtiğimiz on yıl boyunca hücre ölümünün altında yatan mekanizmalar, tıpın çeşitli alanlarındaki birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir. Apoptoz, inflamatuvar olmayan programlanmış hücre ölümünü tanımlamak için yaygın olarak kullanılan genel bir terimdir (105). Bu mekanizmalar, başlama, yürütme ve ölüm sonrası hücre imha mekanizmalarını düzenleyen çok çeşitli sinyalleşme basamaklarını içerir (106).

Başlama fazı; hücre ölümünün başladığı fazıdır ve bu aşamada indükleyici moleküllerden FasL ve TNF- α rol alır. Bunlar da belli reseptörleri etkileyerek sinyal iletim moleküllerini indükler. Hücrede ölüm kararı ölüm fazında alınır. Kaspazlar bu fazda etkin bir şekilde görev alır (51). Kaspaz-3, Kaspaz-6 ve Kaspaz-7 hücre yapısının bozulmasından sorumludur. Son olarak kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (kaspazla aktifleşen DNAz) çekirdek DNA'sının 180-200 baz çiftiyle fragmanlara bölünmesine neden olur. Bu DNA fragmanları, apoptotik cisimcikler adı verilen sitoplazma zarından koluşan küçük kesecikler halinde paketlenir ve bu kesecikler, komşu hücreler tarafından fagositoz yoluyla atılır ve apoptotik süreç tamamlanır (105).

Nekrozda ise durum tam tersidir. Sıklıkla programlanmamış şekilde gerçekleşir ve koagülasyon nekrozu, erime nekrozu, kazeöz nekroz, yağ nekrozu kangrenöz nekroz ve fibrinoid nekroz olmak üzere 6 türden oluşur. Genellikle hipoksi sebebiyle meydana gelir (107). Apoptoz veya nekrozun toksik maddeler veya patofizyolojik koşullar tarafından ortaya oluşmasına bakılmaksızın, bunlar kavramsal olarak hücre ölümünün farklı formları olarak kabul edilir. Bununla birlikte, klasik apoptoz ve nekrozun, olası morfolojik ve biyokimyasal ölümlerin geniş bir aralığını temsil eder. İki klasik ölüm türü, aynı uyarıya maruz kalan dokularda veya hücre kültürlerinde eş zamanlı olarak meydana gelebilir ve sıklıkla aynı başlangıç hasarının yoğunluğu, apoptoz veya nekrozun prevalansını belirler. Çoğu durumda, bunların düzenli bir şekilde yürütülmesi, apoptoz adı verilen karakteristik morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle sonuçlanır. Bununla birlikte, nekrozda ise hücrelerin morfolojik görünümü ve bazı biyokimyasal değişiklikleri klasik apoptozdan farklıdır (108). Apoptoz ile nekroz arasındaki farklar Tablo 2.8.'de verilmiştir.

Tablo 2.8. Apoptoz ile nekroz arasındaki farklar (107).

Apoptoz	Nekroz
Fizyolojik şartlarda da oluşabilir	Patolojik etkiler neticesinde oluşur
Organeller sağlamdır	Organeller bozular
Programlıdır	İyon dengesi bozular
ATP gereklidir	ATP gerekli değildir
DNA kırıkları oluşur	DNA rastgele parçalanır
İnflamasyon görülmez	İnflamasyon görülür
Apoptotik cisimcikler oluşur	Hücre lizisi gerçekleşir
Hücre küçülür	Hücre şişer

Apoptozu saptamak için doğru ve tekrarlanabilir laboratuvar yöntemlerinin geliştirilmesi, bu koşullara yönelik araştırmalar için hayati öneme sahiptir.

Apoptotik hücreler, azalmış DNA içerikleri ve nükleer yoğunlaşmayı içeren ve akım sitometrisi (sub G1 DNA içeriği), Tripan Mavisi veya Hoechst boyaması ile tespit edilebilen morfolojik değişiklikler temelinde tanınır. Plazma zarı bileşimi ve işlevindeki değişiklikler, Anneksin V-florokrom konjugatlarıyla reaksiyona giren fosfatidilserinin plazma zarı üzerinde görünmesiyle tespit edilir. PI boyama ile birleştirildiğinde bu yöntem, erken ve geç apoptotik olayları ayırt edebilir. Apoptozun en iyi tanınan biyokimyasal işaretleri, kaspaz aktivasyonu, kromatinin yoğunlaşması ve genomik DNA'nın nükleozomal fragmanlara parçalanmasıdır. Çeşitli analizler ile aktif kaspazların birçok hücrenel proteini parçaladığı ve ortaya çıkan parçaların apoptoz belirteçleri olarak görev yapabileceği anlaşılmaktadır. Son olarak, mitokondri ve Bcl-2 ailesi proteinleri, Bax ve sitokrom c gibi apoptojenik faktörler de bu süreçte önemli rol oynar (109). Bu testler arasında her birinin sınırlamaları olmasına rağmen en çok kullanılanları hematoksil-eozin, giemsa boyamalar, Anneksin V yöntemi, Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP nick uç etiketleme (TUNEL) yöntemi, agaroz jel elektroforezi, kaspaz seviyelerinin ölçümü ve akım sitometri yöntemiyle western blotting yöntemleri sayılabilir (110, 111). Apoptozun değerlendirildiği yöntemler aşağıdaki Tablo 2.9'da verilmiştir.

Tablo 2.9. Apoptozun değerlendirildiği yöntemler (107).

<i>Morfolojik görüntüleme yöntemleri</i>
Işık mikroskobu <ul style="list-style-type: none"> • Hematoksilen boyama • Giemsa boyama
Floresan Mikroskobu / Lazerli Konfokal Mikroskop <ul style="list-style-type: none"> • Propidium İyodür (PI) • Hoechst boyama
Elektron Mikroskobu
Faz Kontrast Mikroskobu
<i>İmmunohistokimyasal yöntemler</i>
Anneksin V Yöntemi
TUNEL Yöntemi
M30 Yöntemi
Kaspaz-3 Yöntemi
<i>Biyokimyasal yöntemler</i>
Agaroz Jel Elektroforezi
Western Blot <ul style="list-style-type: none"> • Substrat kırılmaları • Aktif kaspazın belirlenmesi • Sitokrom c salınımı
Akım sitometri
<i>İmmunolojik yöntemler</i>
ELISA <ul style="list-style-type: none"> • DNA Fragmentasyonu • M30 Düzeyi
Fluorometrik Yöntem <ul style="list-style-type: none"> • Kaspaz Aktivasyonu
<i>Moleküler biyoloji yöntemleri</i>
DNA Microarrays

Elektron mikroskopi yönteminin klasik alternatifi, hücrelerin ana morfolojik özelliklerinin tanınmasına da olanak tanıyan Giemsa boyamadır. Bununla birlikte, ileri bozulma aşamasındaki apoptotik ve nekrotik hücreler ve kromatinsiz apoptotik cisimcikler, sıklıkla kaybolur, bu da sonuçların hücre ölümünden kaynaklandığını göstermektedir (112). Annexin V/PI çift boyama yöntemi, apoptotik oranı ölçmek ve erken apoptozu geç apoptozdan ayırmak için yaygın olarak uygulanmaktadır (113).

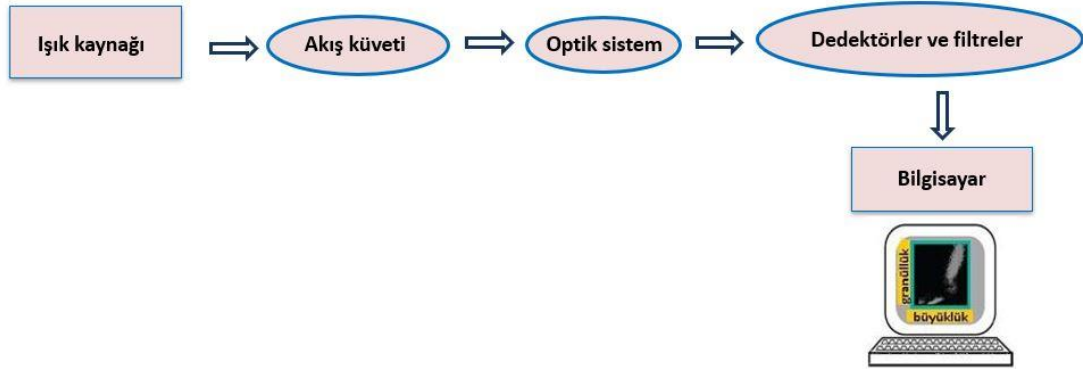
TUNEL yöntemi, serbest 3'-hidroksil terminalini etiketleyerek DNA kırıklarını tespit eder. Apoptozun erken ve geç evrelerinde genomik DNA kırılmalarının ortaya çıktığı göz önüne alındığında, TUNEL boyaması apoptotik hücre ölümünün bir ölçüsü olarak yaygın şekilde kullanılmaya devam etmektedir. Testin avantajları arasında

göreceli performans kolaylığı ve hücre kültürleri ve doku örneklerinde apoptozun değerlendirilmesinde TUNEL test kitlerinin geniş çapta kullanılabilirliği yer alır. (114).

Bu tez çalışması kapsamında, pitavastatinin hücre canlılığı üzerindeki etkisinin yanı sıra hücre ölümünün apoptoz sonucu olup olmadığının anlaşılması önemli olduğundan erken ve geç apoptoz etkileri akım sitometrisi ile incelenmiştir. Bu yöntemde apoptotik hücrelerin tespiti, apoptozda eksprese edildiği bilinen herhangi bir hücre yüzeyi proteininin, bir floresan madde ile boyanmış bir antikor kullanılarak tespit edilmesiyle gerçekleştirilir. Kolay uygulanabilir olması ve niceliksel sonuçlar verebilmesi nedeniyle tercih ettiğimiz güvenilir bir yöntemdir. Akım sitometrisi canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücreler arasında ayırım yapılmasına olanak tanır (111).

Akım Sitometrisi

Akım sitometrinin çalışma prensibi, hücrelerin yüzeyinde bulunan belirteçlere floresan boyalarla işaretli özgün antikorların bağlanmasına dayanır. Boyanan hücreler tek sıra olacak şekilde akış kanalındayken lazer ışıkla buluşur ve hücrelerin her biri ışık saçar ya da üzerinde floresan bulunanlar floresan ışığı yayabilir. Lensler aracılığıyla bu ışıklar toplanır ve uygun dedektörlere gönderilir. Alınan bu sinyaller dedektörler tarafından dijital sistemlere dönüştürülür. Her bir hücre için toplanan veriler bilgisayar ortamında hücrelerin floresan yoğunluğu hakkında yorum yapılmasına imkân verir. Akım sitometrinin çalışma prensibini anlatan görsel Şekil 2.7.'de verilmiştir. Akım sitometrisi floresanslı ölçen bir teknolojidir ve biyoteknoloji ve tıp başta olmak üzere bilimin birçok alanında kullanıldığı gibi endüstriyel uygulamalarda da kullanılmaktadır. Hücre büyüklüğü ve süspansiyon yoğunluğuna göre sınıflandırma yapan bu cihaz ve teknikle hücre canlılık ve döngüsünün analizinde ve ilaç ölçümlerinde kullanımı mevcuttur (115).



Şekil 2.7. Akım sitometrinin çalışma prensibi (115).

Akım sitometrisi bir karışımdan birden fazla fenotipik alt grubu tanımlayabilir, tek bir hücreyi seçebilir ve hatta hücre sınıflandırma adı verilen bir işlemle o hücreyi izole edebilir. Güçlü analitik kapasitesi, akım sitometrisinin karmaşık hücre karışımlarından veri toplamasına ve en nadir popülasyonları bile ayırt etmesine olanak tanır. Ayrılan bu hücreler istenirse steril koşullar altında bile izole edilebilir. Son dönemdeki gelişmelerle 45 yıldır en çok kullanılan teknoloji olan polikromatik akım sitometrisinden, artık spektral akım sitometrisine hızla geçilmektedir (116).

Polikromatik akım sitometrisi tek dedektör, tek renk prensibine dayanmaktadır. Burada saçılma ve floresans ölçümleri, tüm spektrumu kapsamayan bireysel bantları toplayan bant geçiren ve dikroik filtrelerle dayanmaktadır. Polikromatik akım sitometrisi plazma hücrelerinin değerlendirilmesinde özellikle yararlıdır (116, 117).

Spektral akım sitometrisi, cihaz tasarımı ve veri analizinde çeşitli seçenekler sunar ve bu seçimler çalışmanın gerekliliğine göre belirlenir (118). Spektral akım sitometrisi kesinlikle akım sitometrisinin geleceği konumundadır. Ancak mevcut haliyle hala önemli ölçüde geliştirilebilecek birçok özellik bulunmaktadır. Yeni nesil akım sitometreleri mevcut spektral akım sitometrisini temel alacaktır. Bu yöntemde hücre döngüsü ile hücrelerin metabolik ve yapısal bileşenleri arasında ilişki kurulması mevcut çalışmalarla mümkün olabilecektir (116). Son yıllardaki optik, dedektör ve elektronik alanındaki gelişmelerle tek hücre akım spektroskopisinde ilerleme kaydedilmiştir. Bu tür ölçümleri rutin olarak yapan birkaç araştırma laboratuvarında

ticari cihazların yeni uygulamalarla geliştirilmesi ve spektral akım sitometrisi yaklaşımının daha fazla benimsenmesi beklenmektedir (118).

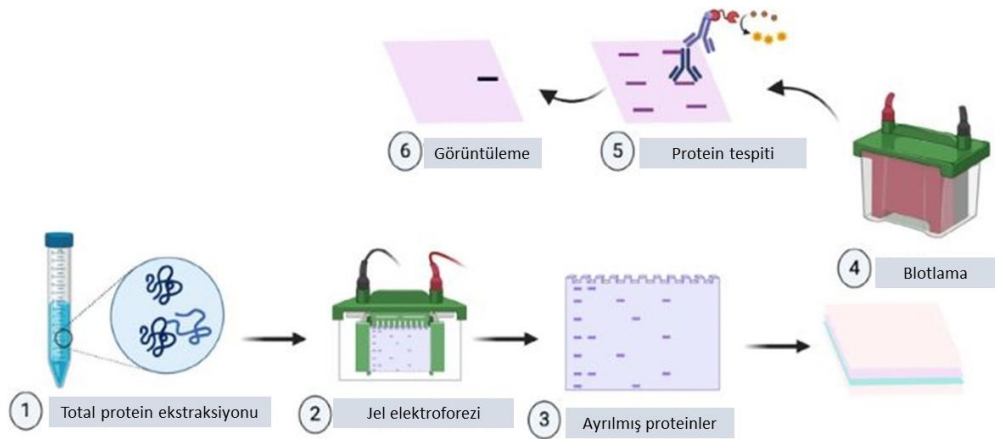
Akım sitometrisinin başlıca avantajları arasında çok parametreliliği (aynı anda farklı hücresel olayların korelasyonu), tek hücre analizi (toplu analizden önlenmesi) ve hızlı analiz süresi (saniyede bin hücre) olasılığı yer alır. Böylece akım sitometrisi, florimetri, spektrofotometri veya jel teknikleri (örn. Western blot) gibi geleneksel toplu tekniklerin hassasiyet sorunlarının üstesinden gelir (106).

Moleküler yöntemlerle değerlendirme ve Western blot

Son yıllarda moleküler biyoloji ve biyoteknolojideki gelişmelerle yapılan çalışmalarda moleküler yöntemlerle değerlendirme hız kazanmıştır. Şu anda kullanımda olan moleküler yöntemler, hedeflenen patojenin nükleik asidinin hedef amplifikasyonu (çoğaltma), sinyal amplifikasyonu ve amplifikasyonsuz yöntemler olmak üzere bu prosedürlerden biri ile saptanmasına dayanmaktadır (119). Geliştirilen ilk amplifikasyon tekniği polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) olup hala en çok üzerinde araştırma yapılan ve çalışılan yöntemdir. İnsan Genom Projesi ile farklı kullanım alanları artarak devam eden teknik gerçek zamanlı kantitatif PCR'dır. Gerçek zamanlı kantitatif PCR, PCR reaksiyonunu gerçek zamanlı olarak izlemek için kullanılan bir tekniktir (120, 121). Gerçek zamanlı kantitatif PCR, genel olarak amacına bağlı olarak mutlak ve bağıl kantifikasyon olmak üzere iki türe ayrılır. Mutlak kantifikasyon, mikrobiyoloji, gıda teknolojisi ve biyoteknoloji gibi çok çeşitli alanlarda mikrobiyolojik yükü ya da katkı maddelerini ölçmek için kullanılır. Bağıl kantifikasyon, biyolojik deneylerde gen ekspresyonu analizini gerçekleştirmek için genomik ve fonksiyonel transkriptomik alanda kullanılır (120). PCR için temel bileşenler kalıp DNA, primer, polimeraz enzimleri, deoksitribozül-trifosfat (dNTP) karışımı, denatürasyon, bağlanma ve uzamadır (122).

Biz bu tez çalışmasında apoptotik yolda etkin olan cleaved PARP ve PARP seviyelerini western blot yöntemiyle değerlendirdik. Western blot, bir numune karışımındaki spesifik proteinleri ayırmak ve tanımlamak için kullanılan biyokimyasal bir tekniktir. Proteinlerin yarı kantitatif analizlerini sağlamak için elektroforetik analizi immünolojik testle birleştirir. İlk kez 1979'da tanımlanmış ve biyokimyasal araştırmalarda vazgeçilmez bir hale gelmiştir. Bu yöntem, hem ayırma hem de

immünolojik test kullanılarak sağlanan yüksek seçicilik nedeniyle temel araştırmalar için ve klinik analizlerde düzenleyici ve doğrulayıcı bir test olarak rutin olarak uygulanır. Klinikte bu analiz, HIV, Lyme hastalığı ve Hepatit B gibi çeşitli hastalıklar için teşhis aracı olarak kullanılır. Bu yöntemde proteinler, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılarak boyutlarına göre ayrılır ve daha sonra elektroblotlama yoluyla bir membrana aktarılır. Membran daha sonra bloke edici solüsyonla işlenir ve ardından hedef proteini tespit etmek için sırayla birincil ve ikincil antikolarla yüklenir (123). Bu teknikte bir protein karışımı, jel elektroforezi yoluyla moleküler ağırlığa ve dolayısıyla türe göre ayrılır. Bu sonuçlar daha sonra her protein için bir bant üreten bir membrana aktarılır. Takiben membran, ilgilenilen proteine özgü spesifik antikolarla inkübe edilir. Bu yöntem, kullanıcının protein ekspresyonunu da ölçmesine olanak tanıdığı için protein tespiti için çok yararlı olan bir tekniktir (124). Western blot tekniğinin akış şeması Şekil 2.8.'de verilmiştir.



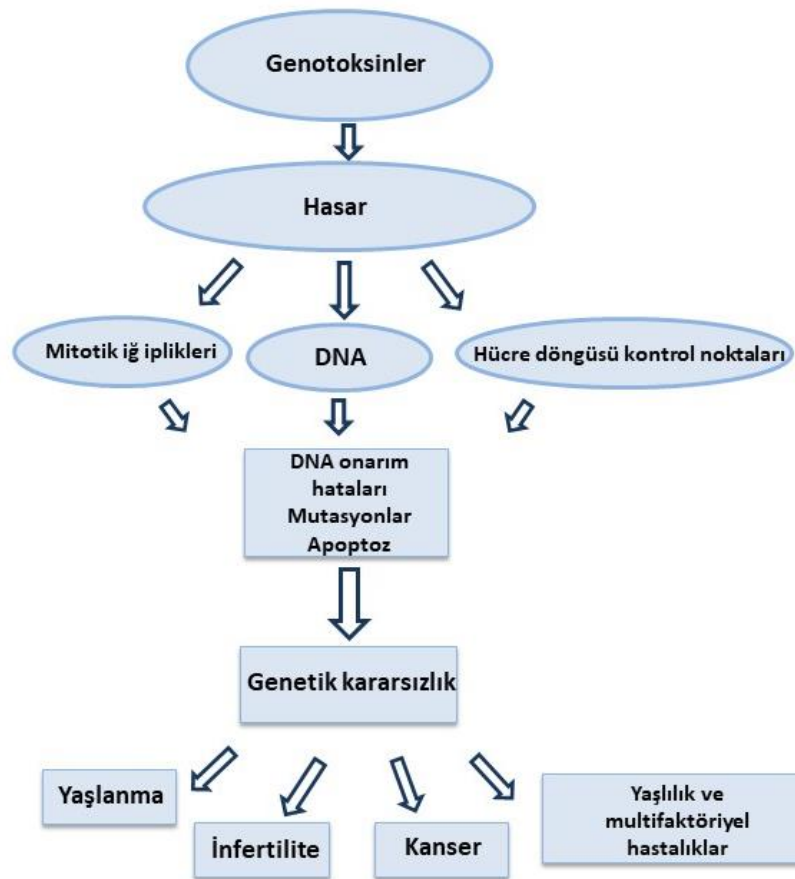
Şekil 2.8. Western blot tekniğinin akış şeması (125).

Western blot geliştirildiğinden beri biyoloji laboratuvarları tarafından benimsenmiş araştırma ve klinik uygulamalarda en önemli tekniklerden biri haline gelmiştir. Performans ve hassasiyetle ilgili bazı teknik sınırlamalara rağmen, yapılacak daha fazla çalışmayla western blotun hassasiyetini ve tekrarlanabilirliğini geliştirebilir.

Araştırma alanında oldukça tercih edilen bir teknik olan western blotın klinik uygulamalarda da daha yaygın şekilde kullanımı hedeflenmektedir (125).

2.6.3. Genotoksisitenin Değerlendirilmesi

Genetik toksisite testi, ilaç güvenliği değerlendirmesinin önemli bir parçasıdır; çünkü DNA hasarı, kansere yol açabilecek mutasyonlar ve kromozom hasarı da dahil olmak üzere genetik değişikliklere yol açabilir. Genotoksinlerin DNA üzerindeki etkileri Şekil 2.9.'da verilmiştir.



Şekil 2.9. Genotoksinlerin DNA üzerindeki etkileri (126).

Günümüzde yaklaşık 20 adet *in vitro* veya *in vivo* genotoksisite testi kullanılmaktadır. *In vitro* analizler, yeni ilaçların ve diğer tıbbi malzemelerin, günlük kullanım ürünlerinin, kimyasal ve fiziksel faktörlerin ve zehirlerin vb. potansiyel genotoksik etkisini araştırmak için kullanılır. *In vivo* testler, yukarıda belirtilen uygulamalara rağmen, çevresel faktörlerin insanlar veya biyota üzerindeki etkisinin, zararlı çalışma ortamının insan sağlığı üzerindeki etkisinin veya çeşitli hastalıkların gelişimi ile ilişkili erken genetik değişikliklerin araştırılmasına olanak sağlamaktadır (127). Uluslararası Uyum Konseyi'nin belirlediği ilaç endüstrisindeki standart test dizisi Ames testi ve mikroçekirdek testi gibi bir *in vitro* memeli testi ve devamında bir *in vivo* kemirgen testiyle devam eder (128). Bunların dışında kromozom anormallikleri testi, kardeş kromatit değişimi testi ve Comet testi de yaygın olarak kullanılan testlerdir (126).

Ames testi, patojenik bakterilerdeki mutajeniteyi tespit etmek için yaygın olarak kullanılan bir bakteriyel testtir. Ames testinde mutajeniteyi değerlendirmek için histidin sentezini gerektiren çeşitli *Salmonella typhimurium* suşu kullanılır. Histidin operonunda her test suşu farklı bir mutasyon içerir. Histidin mutasyonuna ek olarak, *Salmonella typhimurium*'un standart test suşu, mutasyonları tespit etmesini büyük ölçüde artıran başka mutasyonlar da içerir. Mutasyonlardan biri, bakterinin yüzeyini kaplayan lipopolisakkarit bariyerinin kısmi kaybına neden olur ve benzo[a]piren gibi büyük moleküllerin geçirgenliğini artırarak normal hücre duvarına nüfuz etmesini engeller. Test edilen numunelerde bulunan mutajenler, minimal bir ortamda indüklenmiş geri dönüşlere yol açar. Ayrıca daha önce mutasyona uğramış suşlardaki (histidinsiz bir ortamda büyüemeyen) geri dönenleri gözlemlemek için de kullanılırlar. Diğer mutasyon, DNA eksizyon onarım sistemini kodlayan bir genin silinmesinin, birçok mutajenin tespitinde giderek artan hassasiyete neden olduğu bir silme mutasyonudur (129).

Mikroçekirdek testi, genotoksik ajanlara maruziyette moleküler epidemiyoloji ve sitogenetik hasarlarda yaygın olarak kullanılan önemli bir *in vivo* ve *in vitro* biyobelirteçtir. Howell-Jolly cisimcikleri olarak da bilinen mikroçekirdek terimi, 1951'de anafazın geç evrelerinde ana çekirdekten atılan asentrik fragmanlarla tanınmıştır. Mikroçekirdekler iki mekanizma yoluyla oluşturulabilir: kromozomal kırılmalar (klastogenez) veya mitotik aparatın bozulması (anöjeniz). Dolayısıyla anti-

kinetokor antikorunu kullanılarak belirli bir ilacın klastojenez veya anöjeniz yoluyla mikroçekirdek oluşumunu indükleyip indüklediğini doğrulamak mümkündür. Mikroçekirdeklerde kinetokorun yokluğu klastojenik etkiyi, varlığı ise anöjenik etkiyi gösterir. Kinetokor bölgesi, kromozomun sentromeri içerisinde yer alan özelleşmiş bölgedir (105).

Genotoksik ajanlara maruz kalmanın bir göstergesi olarak DNA hasarının tespit edilmesinde Comet testi yaygın olarak kullanılır. Bu yöntem, neredeyse tüm hücre tiplerinde DNA hasarının araştırılmasına izin verir. Comet testi, insan, çevre ve ekotoksikolojik çalışmalarda kullanılan bir yöntemdir ve genotoksisite testlerinde biyositler, kimyasal ürünler, zirai ilaçlar, ilaçlar ve gıda katkı maddelerinin olası genotoksik etkisini tespit etmek için kullanılır (76).

Mikroçekirdek testi ile Comet testinin karşılaştırmalı özellikleri aşağıdaki gibi sıralanabilir (105):

- Mikroçekirdek testi, yalnızca mitotik hücrelerdeki genetik hasarları dikkate alırken, Comet testi hem fazlar arası hem de mitotik hücrelerdeki DNA hasarlarını tespit eder.
- Mikroçekirdek testi, Comet testine göre daha çok hücreyi analiz ettiğinden daha büyük bir istatistiksel güce sahiptir.
- Mikroçekirdek testinin kromozomal aberasyon testi ve Comet testine göre avantajları olmasına rağmen genotoksisite alanında yapılan çalışmalar birden fazla mutajenik testin gerekliliğini göstermektedir. Dolayısıyla mikroçekirdek testi ve Comet testinin birlikte uygulanması mutajenik testler arasında altın standart olarak kabul edilebilir; çünkü bu testler yüksek duyarlılığa ve istatistiksel güce sahiptir, basittir, çok yönlüdür, düşük maliyet gerektirir.

Sonuç olarak, genotoksisite testleri için mevcut stratejiler daha güvenilir sonuçlar elde etmek için performanslarını artıracak yönde araştırılmalı ve ayrıca toksikogenomik, epigenomik ve tek hücre yaklaşımları gibi yeni tekniklerle bu testlere entegre edilmelidir. Omik tekniklerle keşfedilen yeni biyobelirteçler, kanser riskini azaltmada güçlü avantajlar sağlayacaktır (130).

Bu tez çalışmasında pitavastatinin HeLa hücreleri üzerindeki genotoksisitesi Comet ve fpg-Comet testleriyle değerlendirilmiştir.

Comet testi

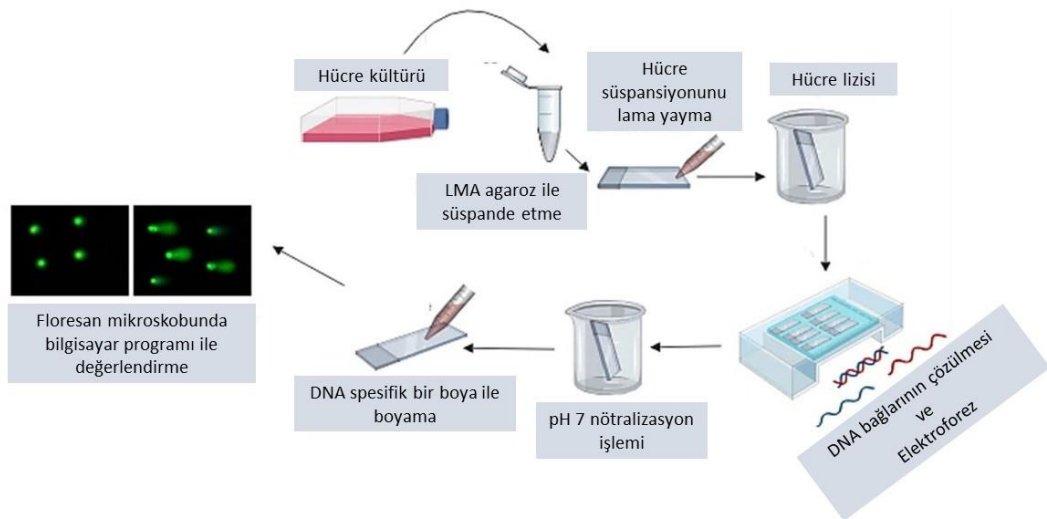
Tek hücre jel elektroforezi olarak da adlandırılan Comet testi, genotoksisite testlerinden biri olup çeşitli kimyasal veya fiziksel etkenlerin neden olabileceği DNA hasarını tespit eden bir yöntemdir. Bu yöntem endüstriyel kimyasalların, biyositlerin, zirai kimyasalların ve farmasötiklerin genotoksisitesini araştırmak için kullanılabilir. Aynı zamanda olası insan mutajenlerini ve kanserojenlerini tanımlamak ve kanser hastalarında DNA onarımını belirlemek için de kullanılabilir (131). Apoptoz analizinde kullanımı konusunda ise farklı görüşler yer almaktadır. Aşırı DNA migrasyonu olan hücrelere standart Comet testinde 'kirpi' (hedgehog) adı verilir. Güncel literatür verilerine göre kirpi yüzdesi apoptoz için güvenilir bir gösterge değildir (132, 133). Yaygın olarak kullanılan Comet testi basit, duyarlı, hızlı ve çok yönlü bir test olup ökaryotik hücrelerde hemen hemen her hücre tipi için kullanılabilir (134).

İlk geliştirilen Comet yönteminde, agaroz gömülü hücrelerin deterjan ve yüksek NaCl ile nötre yakın pH'da parçalanmasını gerektiriyordu (135). Testin alkali versiyonu ise birkaç yıl sonra geliştirildi ve günümüzde de en sık kullanılan versiyon halini aldı. Bu yöntemde daha yüksek pH nedeniyle, DNA zincir kırıklarına ek olarak apurinik/apirimidinik alanlar gibi alkaliye duyarlı alanlar da tespit edilebilir. Ayrıca pH>13 alkali ortam, DNA tek zincir kırıklarını, alkali-kararsız bölgeleri, DNA-DNA/DNA-protein çapraz bağlanmasını ve tamamlanmamış eksizyon onarım bölgeleriyle ilişkili tek zincir kırıklarını belirleme kapasitesine sahiptir (136, 137). Comet testinin temel prensibi, DNA'nın elektroforetik koşullar altında agaroz matrisinde göç etmesidir. Bu testte ilk olarak hücre süspansiyonu hazırlanır. Sonraki temel aşamalar:

- Agaroz içindeki hücrelerle mikroskop lamalarının hazırlanması
- DNA'yı serbest bırakmak için hücrelerin lizise uğraması
- Tek sarmallı DNA elde etmek
- Alkali-kararsız bölgeleri tek zincir kırıkları olarak ifade etmek için alkaliye (pH>13) maruz bırakmak
- Alkali koşullar altında elektroforez
- Nötralizyon

- DNA boyama
- Görselleştirme ve Comet puanlama olarak sıralanabilir (131).

Son senelerde Comet yönteminde yapılan çeşitli değişikliklerle duyarlılık artırılabilir. Bu, pH değişimi ya da elektroforez aşamalarında yapılacak farklılıklarla (süre, amper, voltaj vb.) sağlanabilir (138). Alkali Comet testi akış şeması Şekil 2.10.'da verilmiştir.



Şekil 2.10. Alkali Comet testi akış şeması (139).

(LMA: düşük erime noktalı agaroz)

Comet görüntülerinin skorlaması floresan mikroskobu ile görsel olarak veya genellikle bilgisayar programları aracılığıyla yapılır. (136). Comet puanlaması yapılırken iki çeşit skorlama yönteminden sıkça faydalanılmaktadır. Bunlardan ilki görsel puanlamadır. Bu yöntem ile Cometler, kuyruklu yıldızın kuyruğunun algılanan yoğunluğuna göre beş sınıfa ayrılır. Hasar sınıfına göre 0-4 arası puan verilir ve 100 Comet için genel puan, 0 ile 400 birim arasında olacaktır. Diğer yöntem ise her bir Comet için kuyruktaki DNA yüzdesi değerini veren bilgisayar tabanlı görüntü analizidir. Görüntü analizi, yarı otomatik veya operatörün Comet seçiminde herhangi bir yetkisi olmadan otomatikleştirilmiş olabilir. Otomatik şekilde görüntü almak daha objektif bir yaklaşımdır. Ancak görüntü analizinde de belli başlı sorunlar

yaşanabilmektedir. Örneğin, üst üste binen Cometler görüntü analiziyle puanlanamaz ancak görsel olarak yorumlanabilir. Yapılan çalışmalarla her iki yaklaşımdan da elde edilen sonuçların güvenilir ve büyük ölçüde birbirinin yerine kullanılabilir olarak kabul edilebileceği şeklindedir (140).

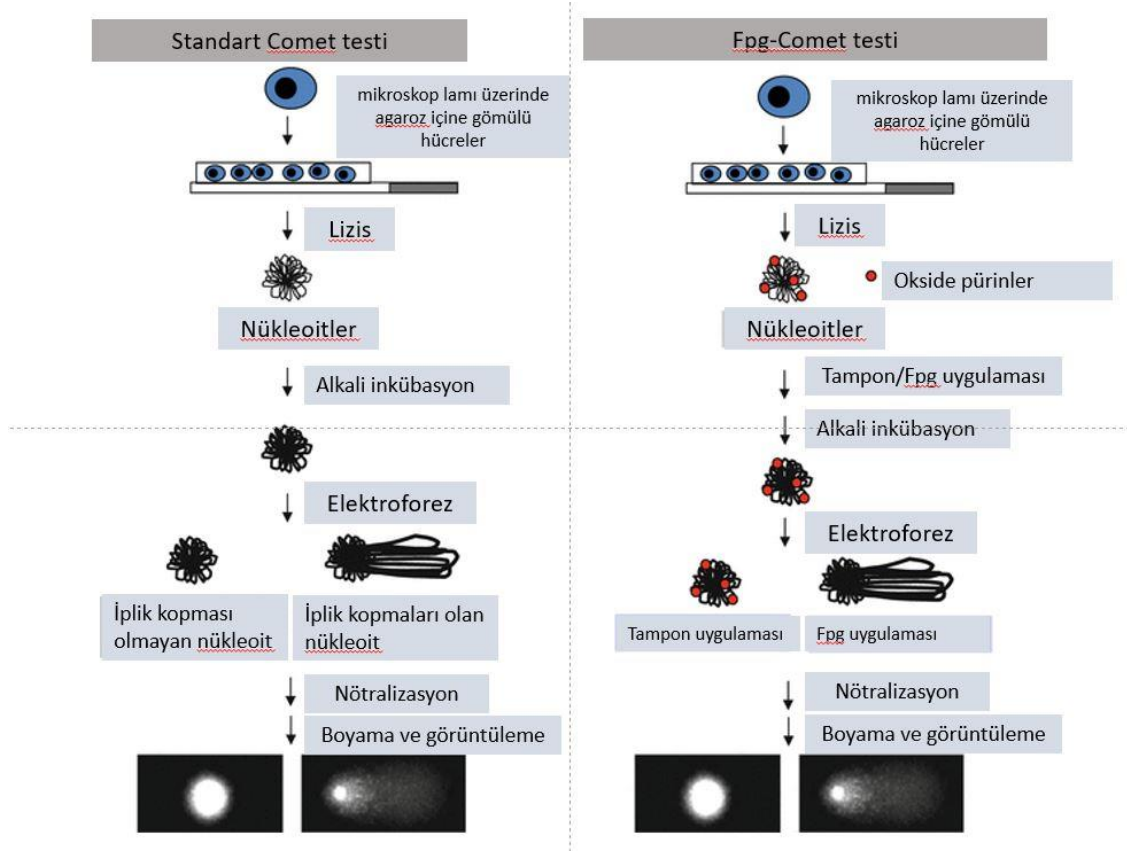
Ayrıca Comet testi, nükleoidlerin (parçalanmadan hemen sonra) bakteriyel onarım enzimleriyle inkübasyonunu sağlayarak bunları tespit edecek şekilde modifiye edilmiştir. Enzimler, spesifik bir glikosilaz aktivitesini birleştirerek hasarlı bazı çıkarır ve bir apürinik/apirimidinik (AP) bölge ve AP bölgesini kırılmaya dönüştüren bir AP liyazı oluşturur. Enzimler ticari olarak temin edilebilir veya bakteri suşlarından izole edilebilir. Tek başına tamponla inkübasyona kıyasla, enzimle inkübasyondan sonra % kuyruk DNA'sındaki artış, oksitlenmiş bazların varlığını gösterir (73).

Farklı DNA lezyonlarını ölçmek için Comet testinde kullanılan enzimler aşağıdaki gibi sıralanabilir

- Endonükleaz III (EndoIII),
- Formamidopirimidin DNA glikosilaz (Fpg),
- T4 endonükleaz V
- Urasil DNA glikosilaz,
- Ekzonükleaz III,
- 3-metiladenin DNA glikosilaz II,
- 8-oksoguanin DNA-glikozilaz (hOGG1),
- Endonükleaz IV,
- Endonükleaz III benzeri protein 1,
- 3-metiladenin,
- DNA glikosilaz,
- Alkiladenin DNA glikosilaz (141).

Genel olarak DNA oksidasyon hasarının düzeyini ölçmek için en sık kullanılan enzimler Fpg ve EndoIII'dür. Fpg enziminin kullanıldığı modifiye Comet testi oksidatif stres tarafından indüklenen oksitlenmiş pürinleri belirlemek için kullanılır. Ayrıca fpg enzimi kullanılarak oksidatif hasarın bir ölçüsü olarak DNA'daki 8-oksoguanin seviyelerinin niceliksel değerlendirilmesine izin veren kabul edilmiş bir modifikasyondur (142). Bu yöntem DNA hasarını tespit etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (134, 136, 141, 143).

Standart Comet testi ile fpg-Comet karşılaştırmalı iş akışı Şekil 2.11.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.11. Standart Comet testi ile fpg-Comet testinin karşılaştırmalı iş akışı (142).

Fpg enzimi dışında sıkça kullanılan bir diğer enzim ise Endo III'tür. Fpg esas olarak 8-oksoGua ve alkilenmiş bazları tespit ederken, EndoIII oksitlenmiş pirimidinleri tespit eder. Endo III, Comet testi ile birlikte kullanılan ilk enzim olmasına rağmen, Fpg açık ara en çok kullanılanıdır (141, 144). Literatür bilgileri ışığında, hem okside pürinleri hem de pirimidinleri tespit etmek için fpg ve EndoIII enzim karışımının kullanıldığı, ancak her birinin göreceli oranlarının belirlenemediği bildirilmiştir (144).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Accutase Solution	Capricorn
Antikor - Cleaved PARP XP® Rabbit mAb	Cell Signaling Technology
Antikor - PARP Rabbit mAb	Cell Signaling Technology
Anti-rabbit IgG (sekonder antikor)	Cell Signaling Technology
Beta-Actin Rabbit mAb	Cell Signaling Technology
Bisakrilamid	AppliChem
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Wisent Multicell
1.0g/L glucose, without L-glutamine & phenol red	
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Biowest
Low Glucose w/ Stable Glutamine w/ Sodium Pyruvate	
Etil Alkol	Sigma-Aldrich
Fetal Sığır Serumu (FBS)	Sigma-Aldrich
Akım Sitometrisi Annexin V Apoptoz Tayin Kiti	BD Pharmingen
Florometrik Hücre içi ROS kiti	Abcam
Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (PBS) tablet	Sigma-Aldrich
Fosfataz İnhibitör Kokteyli	Sigma-Aldrich
Glasiyel asetik asit	Merck
Glisin (Elektforez için, ≥%99)	Sigma-Aldrich
HeLa Hücre Hattı	Americal Type Culture Collection (ATCC® CCL-2™)
Hidroklorik Asit (%37)	Sigma
Kaspaz 3/8/9 Deney Kiti	Abcam
Metanol	Merck
N,N,N,N'-Tetrametil-etilendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Penisilin-Streptomisin	Biological Industries
Pitavastatin Kalsiyum	Santa Cruz Biotechnology
Proteaz inhibitör kokteyl	Sigma-Aldrich
Protein Miktar Tayini kiti (BCA kiti)	Sigma-Aldrich
RNAzol	Sigma-Aldrich
Sisplatin	Koçak Farma®
Sodyum Dodesil Sülfat	Sigma-Aldrich
Spectra multicolor broad range protein ladder	Thermoscientific
Süper Signal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermoscientific
Tripan Mavisi	Sigma-Aldrich
Tripsin-EDTA	Sigma-Aldrich
Triton™ X-100 for molecular biology	Sigma-Aldrich
Trizma® base	Sigma-Aldrich
Tween 20	Merck Millipore
Yağsız süt tozu	Serva

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Akım sitometri cihazı	(Beckman Coulter EPICS XLMCL)
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
Görüntüleme cihazı	Bio Rad (Chemi Doc MP)
Histogram yazılım programı	Multicycle yazılım programı (Phoenix system)
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
Immun-Blot® PVDF Membran	BIO-RAD
İnkübatör (CO ₂ 'li)	Heraeus Instruments
Kalın blot kağıdı	BIO-RAD
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
Neubauer Camı (Hücre sayım camı)	Confort
Otoklav	Marienfeld
Pipet ucu, (0,5-10, 10-200, 100-1000 µL'lik)	Rodwell Monarch MP 24
Santrifüj	Eppendorf
Spektrofotometre	Heraeus, Hettich
Steril enjektör (2 mL)	SpektraMax M2
Su Banyosu	Beybi
Terazi	Termal® Laboratory Tools
Ultrasonik Banyo	Schimadzu Libror
Vorteks	Transsonic 460/H
Yatay çalkalayıcı	Heidolph Reax 2000
	Edmund Bühler

3.3. Hazırlanan Çözeltiler

3.3.1. Yapılan Analizlerde Kullanılan Pitavastatin Çözeltileri

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

Sisplatin Çözeltisi

10 mg/20 mL konsantrasyonundaki enjeksiyonluk sisplatin preparatından 600,6 μ L alındı, son hacim besiyeri ile 1 mL'ye tamamlandı. Elde edilen 1 mM'lık çözeltiden 10 μ M ve 20 μ M sisplatin çözeltileri hazırlandı.

Hücre Siklusu Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Propidyum iyodür (PI) hazırlanması

50 mg PI 100 mL distile su içinde magnetik karıştırıcıda 8-9 saat karıştırılarak çözüldü. Şişe, öncesinde alimünyum folyo ile ışıktan korunması için iyice sarıldı. Daha sonra filtreden süzülen çözelti +4 C°'de saklandı.

RNaz Hazırlanması

100 mg RNaz 100 mL distile su içinde karıştırılarak çözüldü. Enzim olduğu için küçük miktardaki 1,5 mL'lik ependorf tüplere bölünerek -20 C° 'de saklandı.

3.3.2. Apoptoz Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

FITC Annexin V

Kit içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

Propidyum İyodür

Kit içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

1X Annexin V Bağlayıcı Tampon

Kit içerisinde hazır olarak bulunan 10X Annexin Bağlayıcı Tampon 1:9 oranında distile su ile seyreltilerek hazırlandı.

3.3.3. ROB Tayininde Kullanılan Çözeltiler

ROB Analiz Tamponu

Kit içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

1X ROB İndükleyici Çözelti

Kit içerisinde hazır olarak bulunan 37 °C'ye ısıtılmış 10X ROB Analiz Tamponu ile 1X çalışma konsantrasyonuna distile su ile seyreltilerek hazırlandı.

2',7' – Diklorofloresein Diasetat (DCFDA)

20 mM DCFDA çözeltisi kit içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

1X Supplemented Buffer

494 µL 1X ROB Analiz Tamponu ile 55 µL FBS hazırlandı.

100 µM Tersiyer Bütil Hidrojen Peroksit Çözeltisi (TBHP)

55 mM TBHP stok çözeltisinden 1X Supplemented Buffer ile dilüe edilerek hazırlandı.

3.3.4. Comet ve fpg-Comet Yöntemi ile Genotoksisite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

200 mM Disodyum Etilendiamin Tetraasetik Asit (Na₂EDTA) Çözeltisi

14,89 g Na₂EDTA 200 mL distile suda çözüldü ve pH 10'a ayarlandı. Hazırlanmış olan çözelti oda sıcaklığında saklandı.

Düşük Erime Noktalı Agar (LMPA) Çözeltisi

312,5 mg LMPA 25 mL fosfat tamponlu serum fizyolojik çözeltisi (PBS) içerisinde çözüldü. Hazırlanan çözelti küçük porsiyonlar halinde buzdolabında saklandı.

Elektroforez Tampon Çözeltisi

52,8 mL 10 N NaOH ve 8,8 mL 200 mM EDTA 1705 mL soğuk distile su içerisinde çözülerek deney günü taze şekilde hazırlandı.

Etanol Çözeltisi (%50 h/h)

%99,8'lik absöü etanol çözeltisinden 150,3 mL alınarak son hacim 300 mL'ye distile suyla tamamlandı.

Etanol Çözeltisi (%75 h/h)

%99,8'lik mutlak etanol çözeltisinden distile suyla 225,5 mL alınarak son hacim 300 mL'ye tamamlandı.

Etidiyum Bromür (EtBr) Çözeltisi

200 µg/mL'lik stok EtBr çözeltisi 10 mg EtBr 50 mL distile suda çözülerek hazırlandı. Bu stok çözeltiden 1 mL alınıp, distile suyla 10 mL'ye tamamlanarak 20 µg/mL'lik EtBr çözeltisi boyama sırasında hazırlandı. Elde edilen bu çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

PBS Çözeltisi

1 PBS tableti 200 mL distile suda çözüldü. 4 °C'de saklandı.

Fpg Tampon Çözeltisi

1,21 g Tris HCl, 2,92 g NaCl ve 0,185 g Na₂EDTA 500 mL distile suda çözülerek NaOH ile pH 7,5'a ayarlandı.

Fpg Çözeltisi

1 örnek 2 lam için kullanıldı ve 10 lam için 2,5 mg sığır serum albümin, bovine serum albumine (BSA) 5 mL fpg tamponunda çözüldü. Sonrasında her lama 7 µL fpg ekstraktı (>20.000 unite/mg protein) eklendi.

Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Çözeltisi

%30 (h/h)'luk H₂O₂ çözeltisinden 11,3 µL alındı, 988,7 µl distile su ile 1 mL'ye tamamlanarak 0,1 M H₂O₂ çözeltisi elde edildi. Hazırlanan bu çözelti 1 hafta süresince 4 °C'de saklanabilmektedir. 0,1 M H₂O₂ çözeltisinden deney günü 20 µL alınıp 1.980 µL PBS ilave edilerek 1 mM H₂O₂ çözeltisi hazırlandı. 15 µM H₂O₂ çözeltisi daha sonra 15 µL 1 mM H₂O₂ üzerine 985 µL PBS ilave edilerek hazırlandı.

10 N NaOH

200 g NaOH 500 mL distile suda çözüldü. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Normal Erime Noktalı Agar (NMPA) Çözeltisi

625 mg NMPA 50 mL PBS'te sıcak su banyosu kullanılarak çözüldü. Hazırlanan çözelti küçük hacimler halinde 4 °C'de saklandı.

Nötralizasyon Tampon Çözeltisi

48,5 mg Tris 750 mL distile suda çözüldü, derişik HCl ile pH'sı 7,5'a ayarlandı ve distile suyla 1000 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Stok Lizis Çözeltisi

146,1 g NaCl, 37,2 g Na₂EDTA ve 1,2 g Tris 500 mL distile su içerisinde çözelti haline getirildi. Bu çözeltiye 10 g NaOH eklenip pH'sı 10'a ayarlandı. Daha sonra 10 g N-lauril sarkosinat sodyum tuzu ilave edilerek hacmi distile su ile 890 mL'ye tamamlandı. Homojen karışım elde edinceye kadar karıştırılarak stok lizis çözeltisi hazırlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

Lizis Çözeltisi

178 mL stok lizis çözeltisi 2 mL Triton X-100 ve 20 mL DMSO ile hazırlandı. 4 °C’de saklandı.

6-Etil-o-Toluidin (MEA) Çözeltisi

0,75 g agaroz orta elektroendozmoz, middle electroendosmosis (MEEO) 100 mL PBS içinde hazırlanarak küçük porsiyonlar halinde ependorflara bölündü.

3.3.5. Western Blot Analizinde Kullanılan Çözeltiler

Yığılma jeli çözeltisi: 6,06 g Tris baz, distile 70 ml suda çözüldü HCl ile pH 6,8’ e ayarlandı ve 2 mL sodyum dodesil sülfat (SDS) (%20) eklendi ve daha sonra distile su ile 100 mL’ ye tamamlandı.

Ayırma jeli çözeltisi: 18,2 g Tris baz, 70 ml suda çözüldü HCl ile pH 8,8’ e ayarlandı ve üzerine 2 ml SDS (%20) eklendi. Distile su ile 100 mL’ ye tamamlandı.

SDS çözeltisi (%20 h/h): 1 g SDS 5 mL distile suda çözüldü.

Bisakrilamid çözeltisi (%30 h/h): 29 g akrilamid, 1 g bisakrilamid bir miktar distile suda çözülüp 100 mL’ ye tamamlandı.

Amonyum persülfat (APS) çözeltisi: 100 mg APS tartılarak 5 mL distile su içinde çözüldü. Porsiyonlanıp -20 °C’ye kaldırıldı.

Yükleme Tamponu Çözeltisi (4X): 50 mg bromfenol suda çözüldü, 3,125 mL 1M Tris (pH 6,8) eklendi. 5 mL gliserol ve 1 g SDS eklendi, karıştırıldı. Çözüldükten sonra 1 mL β-merkaptetanol eklendi.

Elektroforez Çözeltisi (5X): 15,15 g Tris baz, 72 g glisin ve 5 g SDS distile su ile çözüldü ve hacim distile su ile 1 L’ye tamamlandı.

Transfer Tampon Çözeltisi (X): 7,57 g Tris ve 36 g glisin 1,5 L distile suda ve 500 mL metanolde çözüldü ve distile su ile 2,5 L’ye tamamlandı.

Tris Tamponlu Salin (TBS) Çözeltisi (10X): 30,28 g Tris ve 43,83 g NaCl yaklaşık 450 mL suda çözüldü ve HCl ile pH 7,4’e ayarlandı. Distile su ile 500 mL’ye tamamlandı.

%0,1 Tween® 20 Deterjan (TBST) Çözeltisi (X): 100 mL TBS çözeltisine (10X) 900 mL distile su eklendi ve 1.000 µL tween 20 eklenip vorteks ile karıştırılarak hazırlandı.

Bloklama Çözeltisi: 5 g süt tozu 100 mL TBST'de çözüldü.

3.3.6. Kaspaz 3/8/9 Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Analiz Tamponu

Kit içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

200X Kaspaz 3, 8, 9 substratları

1:200 oranında analiz tamponu ile seyreltilerek hazırlandı.

3.4. Yöntemler

3.4.1. Pitavastatinin Hücre Siklusu Üzerindeki Etkilerinin HeLa Hücrelerinde 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 kabini içinde 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 aktarılarak 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.
- Hücre kültür ortamında deney koşullarındaki inkübasyon sonrası $1,5 \times 10^6/ml$ hücre üzerine 1 ml PBS ilave edildi, daha sonra hücreler 2 mL %99 absolü alkol ile fikse edildi.
- En az bir gecelik inkübasyon sonrasında hücreler iki kez PBS ile yıkandı, daha sonra hücrelerin üzerine 70 µL RNaz ve 100 µL PI ilave edildi.
- Yarım saat karanlıkta inkübe edildikten sonra akım sitometri cihazında (Beckman Coulter EPICS XLMCL, USA) geç apoptoz ve hücre siklusu analizi yapıldı. Hücre siklusu analizi ise Go/G1, Sentez ve G2/M oranları iki değişkenli histogramlardan Multicycle yazılım programı (Phoenix system, USA) kullanılarak hesaplandı.
- Çalışmalar üçer kez tekrarlandı.

3.4.2. Pitavastatinin Erken Apoptotik Etkilerin HeLa Hücrelerinde Belirlenmesi

- HeLa hücrelerinin kültürü yapıldı, madde çözeltileri kuyucuklara eklendi.
- Hücreler 37°C’de, 24 saat süreyle %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda madde çözeltileri atıldı.
- Apoptoz tayini için “FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I” protokolü takip edildi. Çalışmada pitavastatin 0,1-100 µM konsantrasyon aralığında tek başına ve 20 µM sisplatinle olan kombinasyonları halinde değerlendirildi.
- Pitavastatin ve sisplatinin tek başlarına ve kombinasyon halinde olan gruplarının belirlenen maruziyet süresi kadar inkübasyonundan sonra Accutase enzimi ile toplanan hücreler PBS ile yıkandı, hücreler soğuk Biolegend’s Cell Staining Buffer ile iki kez yıkanarak Annexin V Binding Buffer ile süspande edildi (0,25 - 1x10⁷ hücre/ml).
- Süspansiyonun 100 µl’si 5 ml’lik tüpe alındı. 5 µL APC Annexin V ve 10 µL propidyum iyodür solüsyonu (PI) eklendi.
- Vorteksle karıştırıldıktan sonra 15 dk 25 °C’de (karanlık ortamda) inkübe edildi. Takiben tüplere 400 µL Annexin V Binding Buffer eklendi ve akım sitometri (flow cytometry) ile incelendi.
- Çalışmalar üçer kez tekrarlandı.

3.4.3. Pitavastatinin ROB Oluşumu Üzerine Olan Etkilerinin HeLa Hücrelerinde Belirlenmesi

- ROB oluşumu “ROS Detection Assay Kit” protokolü ile izlendi.
- Her kuyucukta 2,5 X 10⁴ hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plağa ekilen hücreler,1 gece plağa tutunma süresince beklendikten sonra besiyeri uzaklaştırıldı, 100 µL ROS Assay Buffer ve 1 kez PBS ile yıkandı.
- PBS çözeltisi de uzaklaştırıldıktan sonra her kuyucuğa 100 µL ROS Assay Buffer ile dilüe edilmiş 1X ROS Label ilave edildi ve 45 dk 37 °C’de karanlık ortamda inkübe edildi.

- ROS Label uzaklaştırılarak 100 µL %10 FBS içeren ROS Assay Buffer veya 100 µl fenol kırmızısı içermeyen kültür besiyeri ortamındaki pitavastatin ve sisplatinin tek başlarına ve kombinasyon gruplarının belirlenen maruziyet süresi kadar inkübasyonundan sonra Ex/Em:495/529'da floresans okundu.

3.4.4. Pitavastatinin Genotoksik Etkilerinin HeLa Hücrelerinde Belirlenmesi

Sitotoksisite testlerinden elde ettiğimiz bilgiler ışığında belirlenen konsantrasyonlarda; Tek hücre jel elektroforez (Comet) yöntemi – modifiye edilmiş Comet yöntemi (fpg-Comet) uygulandı.

- HeLa hücreleri genotoksisite çalışması için büyütülüp çoğaltıldı.
- Hücre süspansiyonları aynı şekilde hemasitometre üzerinde ışık mikroskobu altında sayıldı.
- Canlı hücre konsantrasyonu hesaplandıktan sonra hücre süspansiyonu, yeterli miktarda besiyeri ile seyreltildi ve her bir kuyucukta 30.000 hücre olacak şekilde 1 mL hacim içerisinde 12 kuyucuklu plaklara hücre ekimi yapıldı.
- Hücrelerin yaklaşık 24 saat inkübasyon süresince kuyucuklar içinde tutunarak ortama alışmaları ve çoğalmaları sağlandı.
- Steril şartlarda besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 2-200 µM konsantrasyon aralığında (sitotoksisite sonuçları ve ilacın farmakokinetik özellikleri göz önüne alınarak seçilen dozlar) pitavastatin içeren besiyeri ile, negatif kontrol için saf besiyeri ve %1 etanol içeren besiyeri ile, pozitif kontrol için sonradan H₂O₂ ile muamele edilmek suretiyle saf besiyeri ile 48 saat inkübe edildi ve ikili olarak çalışıldı.
- Maruziyet süresi sonrasında plaktaki besiyeri atıldı (pozitif kontrol kuyucukları hariç), 500 µL PBS ile yıkama işleminden geçirilip 400 µL tripsin eklenerek 3-5 dakika inkübatörde bekletildi, hücrelerin tutundukları plak zemininden uzaklaşmaları sağlandıktan sonra her bir kuyucuğa 600 µL besiyeri ilave edilip hücre süspansiyonu plak tabanı yıkanarak steril ependorflara aktarıldı.
- Pozitif kontrol dozlaması için; besiyerleri atılarak son konsantrasyon 50 µM olacak şekilde H₂O₂ ile hücrelere muamele edildi. Bunun için kuyucuklara 950 µL PBS ve 50 µL H₂O₂ (1 mM) ilave edildi ve -20 °C'de 5 dk inkübe edildi.

İnkübasyonu biten pozitif kontrol grupları da diğer gruplar gibi aynı işlemlerden geçirilerek steril ependorflara aktarıldı.

- Ependorflar 1.200 devir/dk hızda 5 dk santrifüj edildi ve dipte yaklaşık 50 µL besiyeri bırakacak şekilde üst fazlar dikkatlice aspire edildi.
- 37±0,5 °C’de eritilmiş yaklaşık 100 µL LMPA (%1,25’lik), 50 µL hücre süspansiyonu ile karıştırıldıktan sonra, önceden NMPA (%1,25’lik) çözeltisine daldırılıp agar ile kaplanmış lamlara yayıldı ve üzerlerine lamel kapatıldı.
- Lamalar buzlu yüzey üzerinde 5 dakika bekletilerek agarın katılaşması sağlandı. Agarın katılaşmasının ardından lam üzerindeki lamel zedelenmeden alındı.
- Lamalar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizis çözeltisine daldırılıp en az 1 saat buzdolabında bekletildi. H₂O₂ uygulanan gruplar ve normal doz grupları ayrı ayrı şalelerde en az 1 saat lizise bırakıldı.
- Lizis işleminin ardından lamelleri alınmış lamalar aralık kalmayacak, agar yayılan kısımları üste gelecek ve hepsi aynı yöne bakacak şekilde elektroforez tankının içinden çıkarılan tepsiye yerleştirildi.
- Elektroforez işlemi için tank soğuk elektroforez çözeltisi ile dolduruldu.
- Fpg- geliştirilmiş Comet metodu için bu aşamada; lizis işleminin ardından lamalar metal taşıyıcıya dizildi. Lam kutusuna fpg tampon çözeltisi eklendi ve burada 15 dk bekletildi. Sonrasında lamalar taşıyıcıya dizildi ve dört köşesine MEA uygulandı ve lamaların orta bölgesine 200 µL fpg çözeltisi yayıldı ve 30 dk inkübatörde bekletildi. Bu işlem dışında standart Comet yöntemi ile birebir aynı adımlarla çalışıldı.
- Lamalar aralık kalmayacak ve agar yayılan kısımları üste gelecek şekilde elektroforez tankının içine yerleştirildi.
- Elektroforez tankının içerisinde lamalar akım uygulamadan 20 dk bekletildi.
- Ardından 25 V ve 300 mA akım uygulayarak 20 dk elektroforez uygulandı.
- Elektroforez işlemi bittikten sonra lamalar tanktan çıkarılıp 5 dk distile suda, daha sonra 15 dk nötralizasyon tampon çözeltisinde bekletildi.
- 15 dk sonunda lamalar sırasıyla 5’er dakika %50’lik, %75’lik ve %99’luk etanol çözeltisinde bekletildi ve okuma öncesinde kurumaları için en az 1 gün bekletildi.

- Okuma sırasında lamaların üzerine 60 µL EtBr çözeltisi (20 µg/mL) ilave edildi ve lamel ile kapatıldı.
- Her lamda 100 hücre, floresan mikroskopunda bilgisayar programı yardımıyla değerlendirilerek DNA hasar derecesi kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti olarak değerlendirildi.
- Tüm bu işlemler DNA hasarını önlemek üzere karanlıkta yapıldı.
- 48 saatlik maruziyet belirlendi. Her bir tekrar ikili olarak çalışıldı ve deney üç kez tekrarlandı.

3.4.5. Pitavastatin Uygulanmış HeLa Hücrelerinde Western Blotting ile Protein Tayini

Protein İzolasyonu: Kuyucuk başına 1 mL besi yeri içine hücre ekilerek inkübasyona bırakıldı, inkübasyondan sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri dikkatlice çekilip etkin madde çözeltisi hücelere uygulandı. Protein izolasyonu tamamlandıktan sonra BCA kiti ile total protein konsantrasyonları hesaplandı. Jel hazırlanması, proteinlerin jele yüklenmesi ve yürütülmesi proteinlerin jelden membrana transferi ve bloklama işlemleri sırasıyla yapıldı. Primer ve sekonder antikor ekleme işlemlerinin tamamlanmasından sonra görüntüleme ve analiz gerçekleştirildi. Kemilüminesans madde ile muamele edilen membranda protein bantları Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi'nde Bio-Rad (Chemi Doc MP) görüntüleme cihazı ile görüntülendi, protein bantlarının dansitometrisi ImageJ yazılımı ile analiz edildi.

3.4.6. Pitavastatin Uygulanmış HeLa Hücrelerinde Kaspaz 3/8/9 Düzeylerinin Ölçümü

- 96 kuyucuklu siyah plaklara kit protokolü gereğince 2×10^4 hücre /90 µL besiyeri olacak şekilde ekilen hücreler 1 gece inkübe edildi.
- Plaklar 800 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Besiyeri değiştirildi.
- 100 µL fenol kırmızısı içermeyen besiyeri içinde pitavastatin (0,1 – 2 µM) ve sisplatin (10 µM), bu maddelerin ikili kombinasyonları ile 24 saat inkübe edildi.
- Her bir kuyucuğa kaspaz 3, 8 ve 9 substratı içeren analiz tamponunu içeren çözeltisinden 100'er µL eklendi.

- Plaklar oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
- Spesifik dalga boylarında kapsaz 3 için Ex/Em: 535/620 nm, kaspaz 8 için Ex/Em: 490/525 nm ve kaspaz 9 için Ex/Em: 370/450 nm de ölçüm yapıldı.

3.5. İstatistiksel Yöntemler

İstatistikler analizler için " Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 10.5 for Windows" programı kullanıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testiyle değerlendirildi. Grup farklılıkları tek yönlü varyans analizi (ANOVA), Least Significant Differences (LSD) test ile belirlendi. İstatistiksel anlam değerleri $p<0,05$, $p<0,01$ ve $p<0,001$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Pitavastatinin HeLa Hücrelerinde Hücre Döngüsü Üzerine Etkileri ve Geç Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

Doktora öğrencisinin daha önce tamamladığı yüksek lisans tez projesinde (6), pitavastatinin sitotoksik etkileri, çeşitli dozlarda tek başına ve sisplatin ile kombine halde HeLa hücreleri ile 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetin ardından, hücre canlılığını ve membran bütünlüğünü test eden yöntemlerle *in vitro* olarak belirlenmiştir.

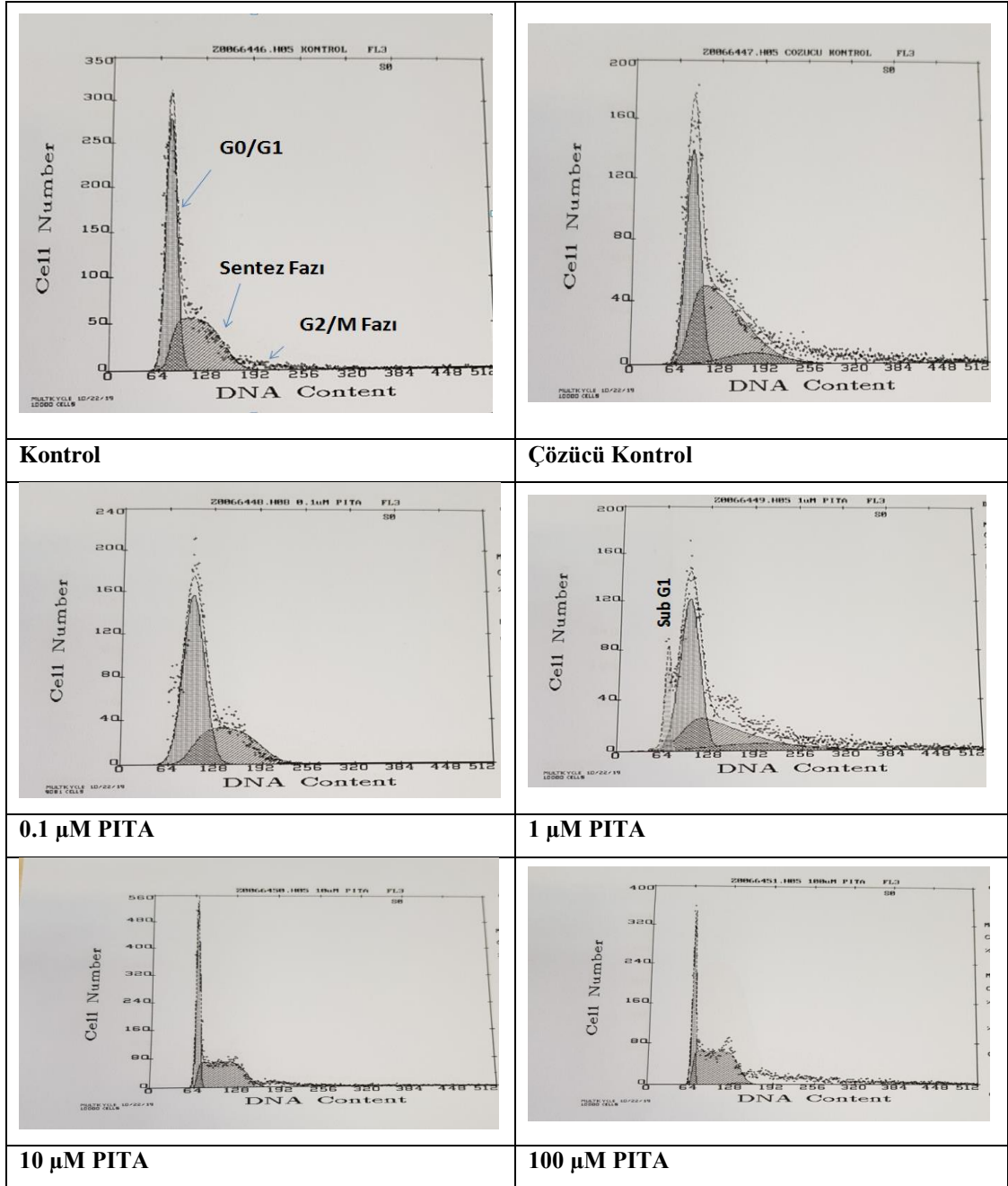
Bu bilgiler ışığında;

- Pitavastatinin 0,1-100 μM arası derişimlerinin HeLa hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkileri ve geç apoptotik etkileri değerlendirilmiştir (Tablo 4.1). Akım sitometri histogramları Şekil 4.1’de gösterilmiştir.
- Geç apoptoz için DNA fragmantasyonunu gösteren SubG1 piki değerlendirilmiş, yalnızca 1 μM konsantrasyonunda ve 1 μM ile sisplatin 20 μM kombinasyonunda apoptoz görülmüştür. Konsantrasyon yükseldikçe hücrelerin nekroza uğradığı görülmüştür.
- Kombinasyonlarda sisplatin etkisi görülmüş ve S fazının hücre yüzdesinin arttığı saptanmıştır.
- Pitavastatinin 10 μM ve 100 μM konsantrasyonlarında hücre yüzdesinin sisplatin gibi S evresinde arttığı gözlenmiştir.

Tablo 4.1. Pitavastatinin HeLa Hücrelerinde Geç Apoptotik Etkileri ve Hücre Döngüsü Analizleri.

HeLa Hücreleri	G0/G1	Sentez	G2/M	SubG1
Kontrol	56	44	0	
Çözücü Kontrol	41	51	8	
0,1 μM PITA	65	35		
1 μM PITA	53	35	12	7
10 μM PITA	40	60		
100 μM PITA	29	70	1	
0,1 μM PITA + CIS20	13	85	2	
1 μM PITA + CIS 20	73	27	0	21
10 μM PITA + CIS20	14	80	6	
100 μM PITA +CIS20	5	95		
CIS (20 μM)	90	10		

Değerler % olarak ifade verilmiştir. (PITA: Pitavastatin, CIS20: Sisplatin (20 μM))

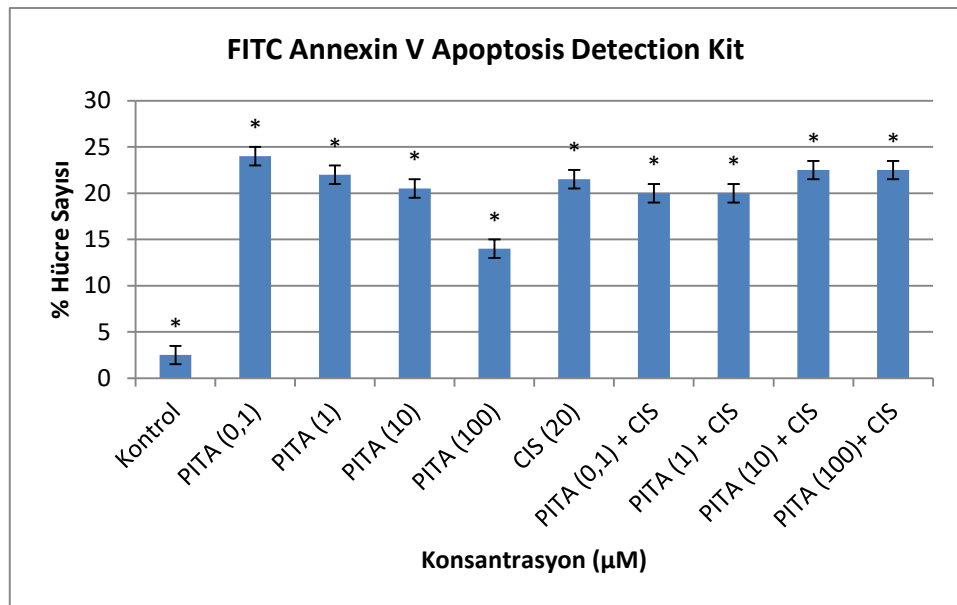


Şekil 4.1. HeLa hücresinde pitavastatinin ve sispilatin kombinasyonlarının hücre döngüsü dağılımını gösteren akım sitometri histogramları.

(PITA: Pitavastatin, CIS: Sispilatin)

4.2. Pitavastatinin HeLa Hücrelerinde Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

Erken apoptoz tayini için “FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I” protokolü takip edilmiştir. Çalışmada pitavastatin 0,1-100 μM konsantrasyon aralığında tek başına ve 20 μM sisplatinle olan kombinasyonları 48 saat maruziyet süresinde değerlendirilmiştir (Şekil 4.2). Pitavastatinin tüm konsantrasyonlarında erken apoptoz görülmüş olup 0,1 μM konsantrasyonda erken apoptoz yüzdesi en yüksek olarak bulunmuştur (Şekil 4.2). Ayrıca, 10 ve 100 μM pitavastatin sisplatin ile kombine edildiğinde diğer kombinasyon gruplarına göre erken apoptozu daha çok indüklediği belirlenmiştir. Erken apoptoz tayini ile elde edilen akım sitometri histogramları Şekil 4.3’te gösterilmiştir.

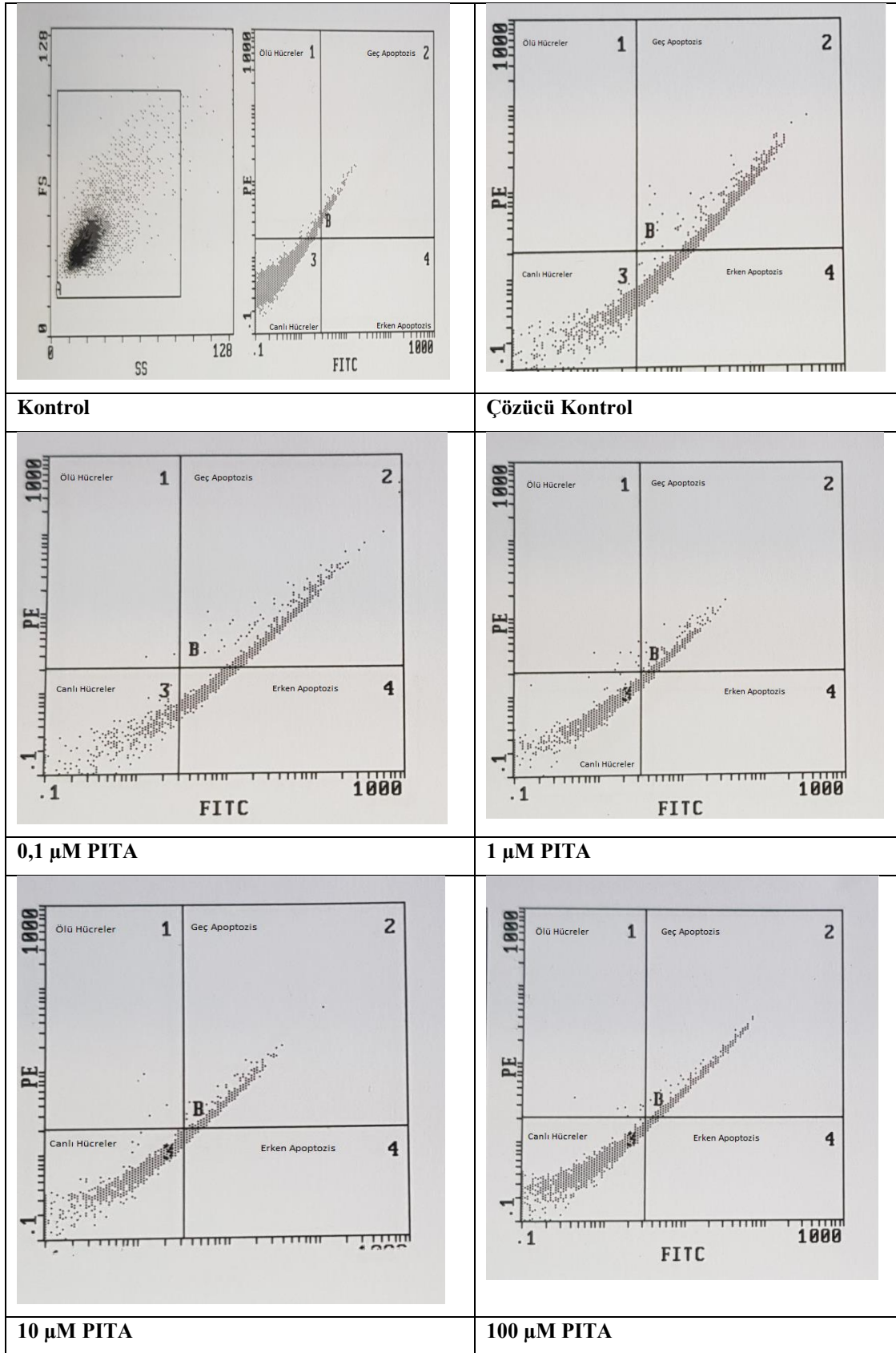


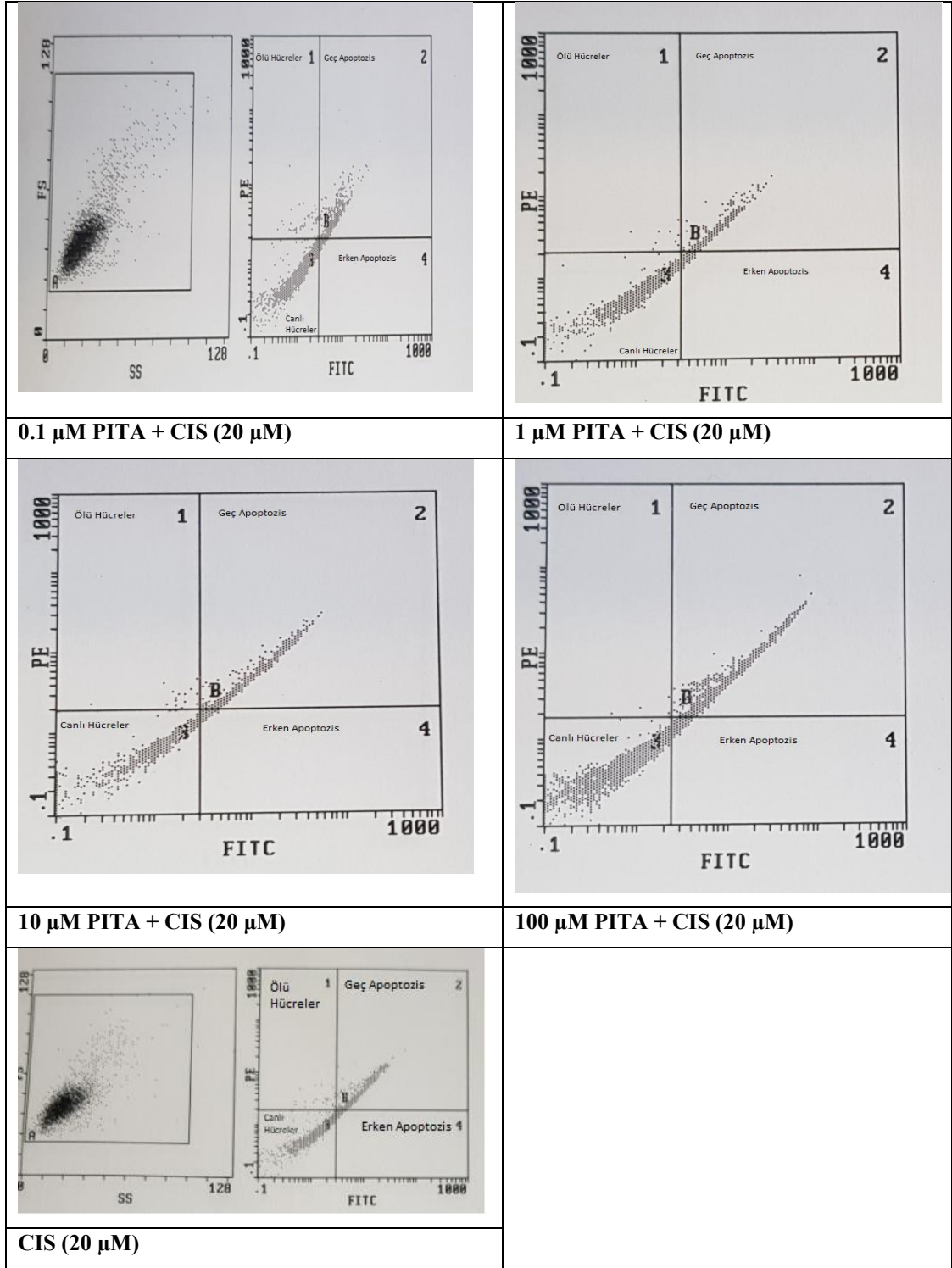
Şekil 1.2. Pitavastatinin HeLa Hücrelerindeki Erken Apoptotik Etkileri.

Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması olarak ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir.

Anlamlılık $*p \leq 0,001$ şeklinde hesaplanmıştır.

(PITA: Pitavastatin, CIS: Sisplatin)



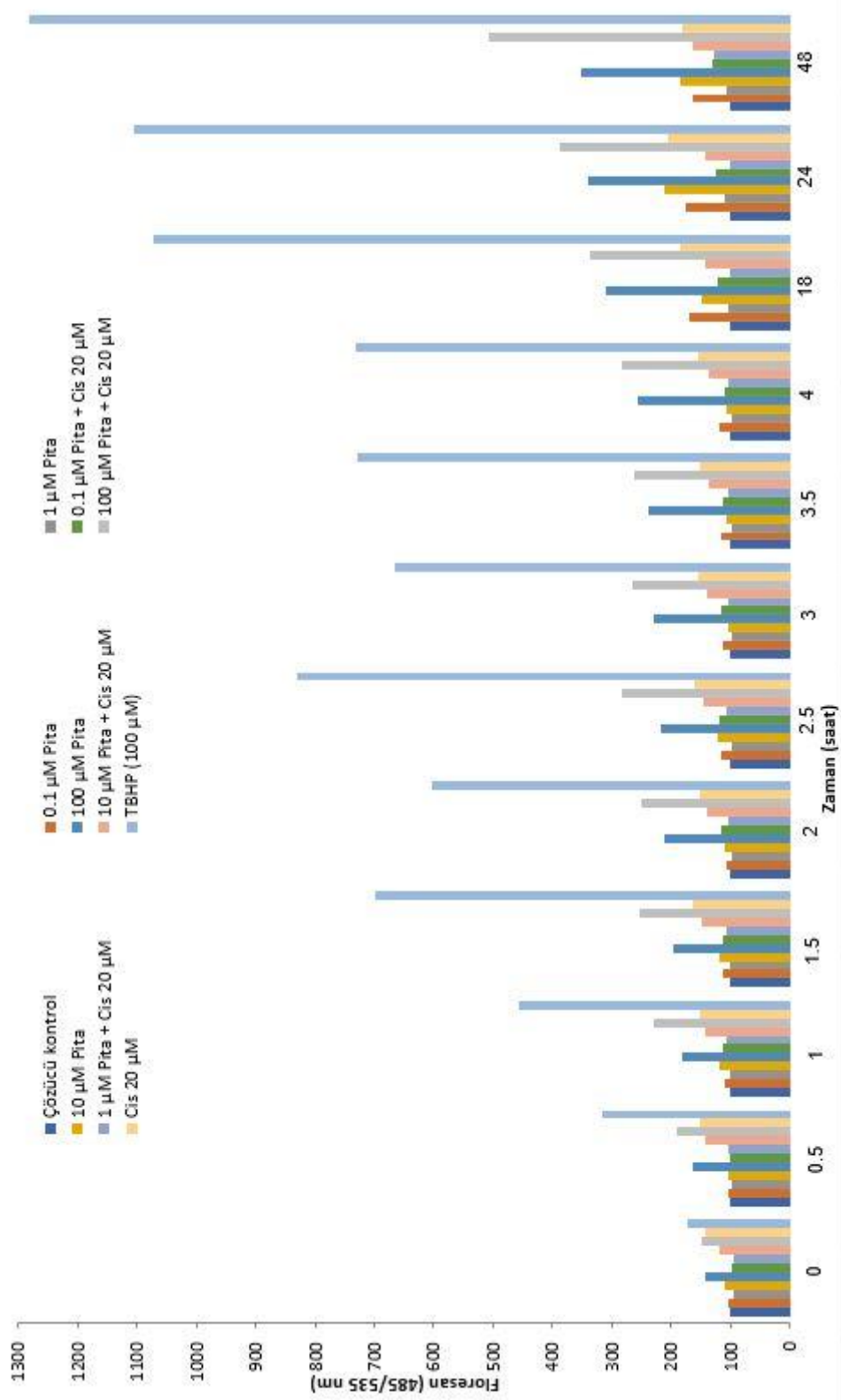


Şekil 4.3. Erken apoptoz tayini ile elde edilen akım sitometri histogramları.

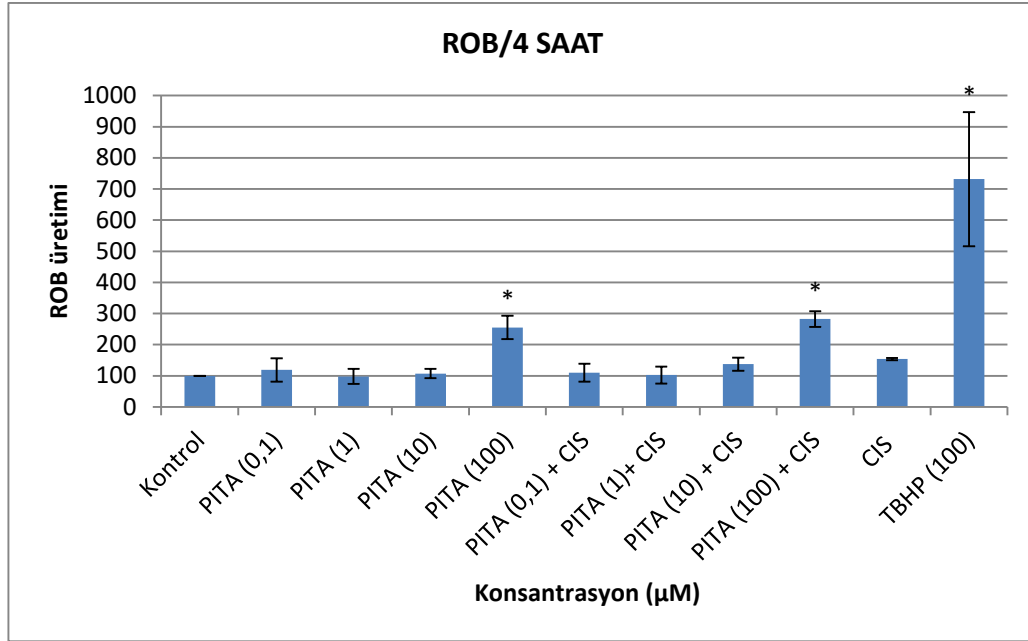
(PITA: Pitavastatin, CIS: Sisplatin)

4.3. Pitavastatinin Hela Hücrelerinde ROB Oluşumu Üzerine Olan Etkilerinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

Çalışmada pitavastatin 0,1-100 μM konsantrasyon aralığında tek başına ve pitavastatinin 20 μM sisplatinle olan kombinasyonlarının ROB oluşumuna etkileri değerlendirilmiştir. 0 ve 30 dk ile 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 18, 24 ve 48 saatlerde ölçüm yapılmıştır (Şekil 4.4). ROB düzeyinin genel olarak uygulanan konsantrasyon ve zamanla doğru orantılı olarak arttığı belirlenmiştir. 100 μM pitavastatin ile 100 μM pitavastatin ve sisplatin kombinasyonunun pozitif kontrole kıyasla anlamlı şekilde ROB düzeyini arttırdığı görülmüştür (Şekil 4.5). Pozitif kontrol olarak tert-bütül hidroperoksit (TBHP) kullanılmıştır. Pitavastatin (100 μM) uygulanan HeLa hücrelerinin zamana bağlı floresan seviyeleri zamana bağlı olarak ROB seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttırdığı görülmüştür (Şekil 4.6).

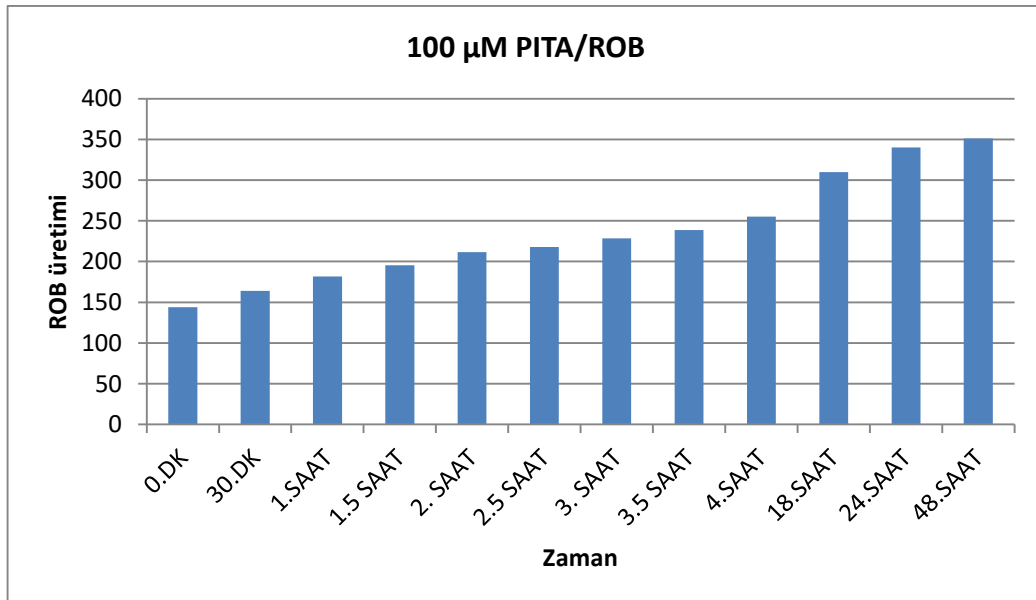


Şekil 4.4. Pitavastatin uygulanan HeLa hücrelerinin zamana bağlı ROB düzeyini gösteren floresan seviyeleri. (PITA: Pitavastatin, CIS: Sisplatin)



Şekil 4.5. Pitavastatin uygulanan HeLa hücrelerinin 4. saatteki floresan seviyeleri.

Veriler, kontrole göre kat değişimi olarak verildi.
(PITA: Pitavastatin, CIS: Sisplatin, tert-bütül hidroperoksit=TBHP)
* $p < 0,05$, ROB analizi için kontrol (%1 etanol) ile kıyaslama,
Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması olarak ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir.



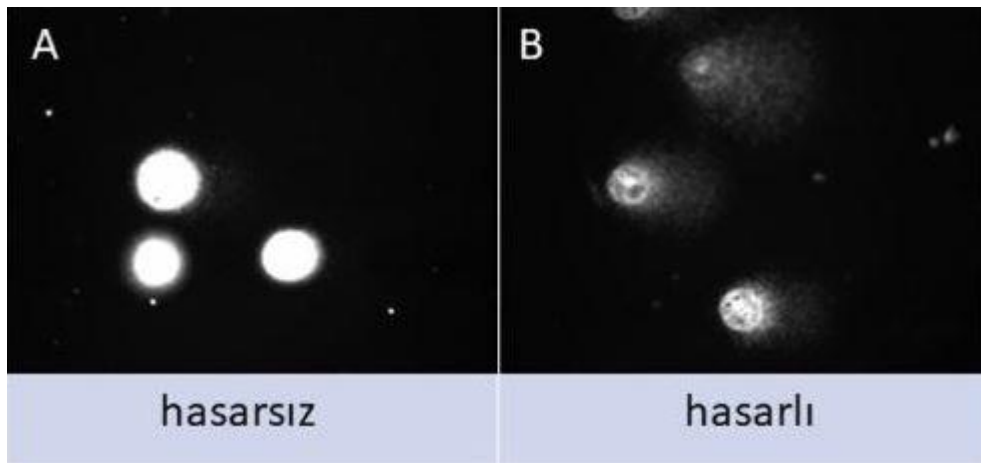
Şekil 4.6. Pitavastatin (100 μM) uygulanan HeLa hücrelerinin zamana bağlı floresan seviyeleri.

(PITA:Pitavastatin) Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması olarak ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir.

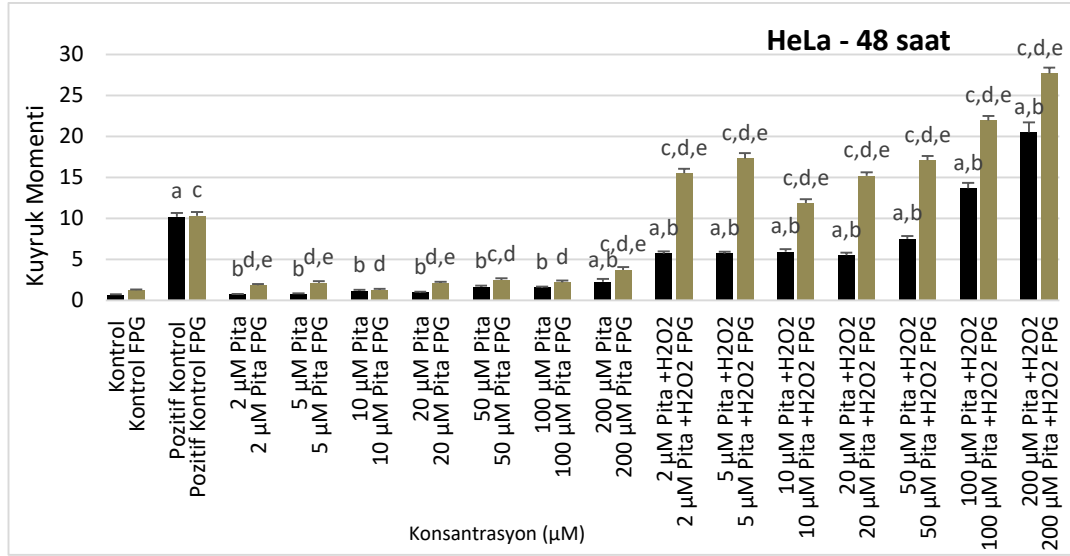
4.4. Pitavastatinin HeLa Hücrelerinde DNA Hasarı Üzerindeki Etkilerinin Comet ve fpg-comet Yöntemi ile Belirlenmesine İlişkin Bulgular

Pitavastatinin 2-200 μM konsantrasyon aralığında, HeLa hücrelerinde DNA hasarı üzerine etkileri 48 saat inkübasyon süresi sonunda standart Comet yöntemi ve fpg enziminin kullanıldığı geliştirilmiş Comet yöntemi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca, pitavastatinin 50 μM H_2O_2 'in neden olduğu oksidatif strese karşı 2-200 μM konsantrasyon aralığında koruyuculuğunun değerlendirilmesi amacıyla standart ve fpg enziminin kullanıldığı geliştirilmiş Comet yöntemi kullanılmıştır. Pitavastatin uygulanan HeLa hücrelerin Comet görüntüleri Şekil 4.7.'de gösterilmiştir. Ayrıca, elde edilen bulgular kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu olarak Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da ifade edilmiştir.

Fpg enziminin kullanıldığı geliştirilmiş Comet yönteminde DNA hasarının, 20 μM pitavastatin konsantrasyonunun üzerindeki konsantrasyonlarda negatif kontrole kıyasla önemli ölçüde arttığı ve H_2O_2 ile indüklenen DNA hasarının da kontrole kıyasla ve konsantrasyonla doğru orantılı olarak tüm konsantrasyonlarda (2-200 μM) arttığı görülmüştür. Standart Comet yönteminde, DNA hasarı 200 μM pitavastatin konsantrasyonunda önemli ölçüde artmıştır. Pitavastatin, H_2O_2 kaynaklı DNA hasarını 2-50 μM konsantrasyon aralığında azaltırken, 100 ve 200 μM konsantrasyonlarında arttırmıştır.



Şekil 4.7. Pitavastatin uygulanan HeLa hücrelerin Comet görüntüleri (40X).



Şekil 4.8. Pitavastatinin HeLa hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki DNA hasarı üzerine etkileri.

DNA hasarı; DNA kuyruk momentini olarak verilmiştir.

^a $p < 0.05$, standart Comet analizi için kontrol (%1 etanol) ile kıyaslama,

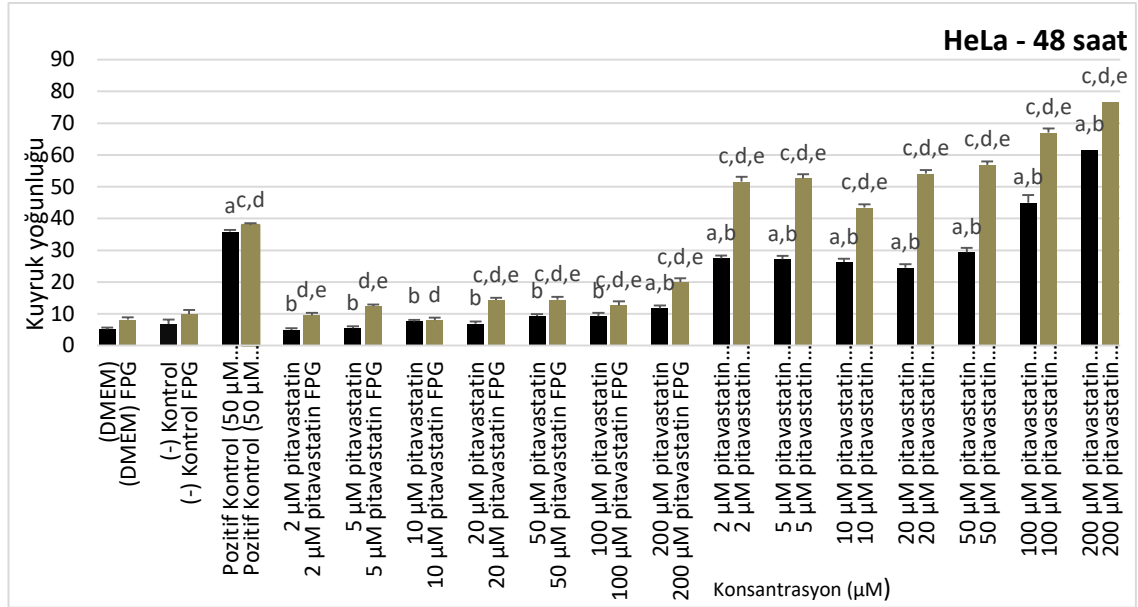
^b $p < 0.05$, standart Comet analizi için pozitif kontrol ile kıyaslama,

^c $p < 0.05$, fpg enzimin kullanıldığı geliştirilmiş Comet analizi için kontrol (% 1 etanol) ile kıyaslama,

^d $p < 0.05$, fpg enzimin kullanıldığı geliştirilmiş Comet analizi için pozitif kontrol ile kıyaslama,

^e $p < 0.05$, standart comet analizi sonuçları ile fpg enziminin kullanıldığı Comet analizi sonuçlarının karşılaştırılması yapılarak elde edilen verileri ifade etmektedir.

Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması olarak ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir



Şekil 4.9. Pitavastatinin HeLa hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki DNA hasarı üzerine etkileri.

DNA hasarı; DNA kuyruk yoğunluğu olarak verilmiştir.

^a $p < 0.05$, standart Comet analizi için negatif kontrol (%1 etanol) ile kıyaslama,

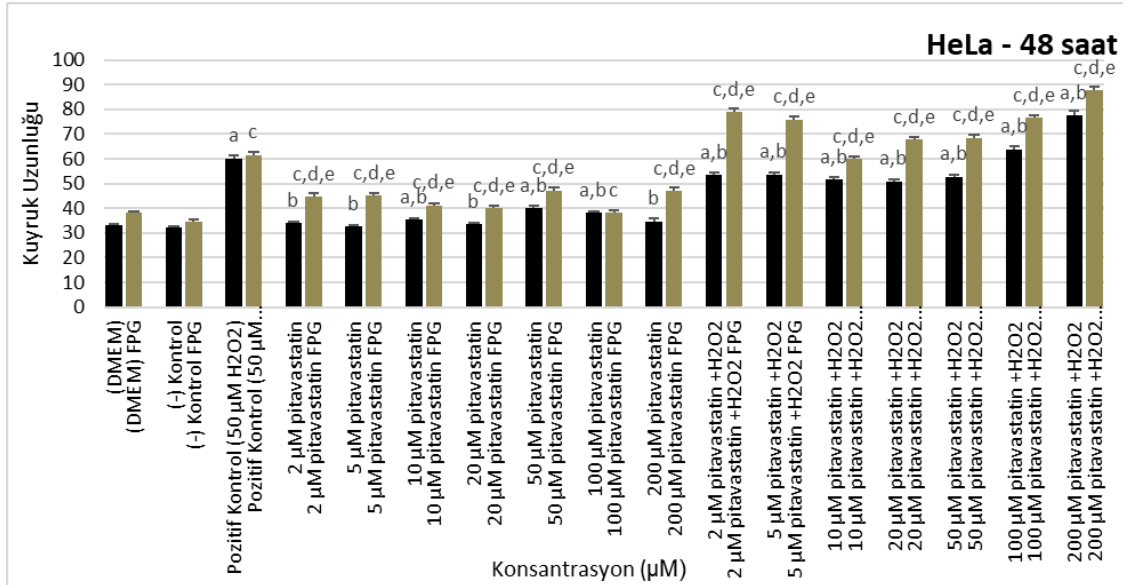
^b $p < 0.05$, standart Comet analizi için pozitif kontrol ile kıyaslama,

^c $p < 0.05$, fpg enzimin kullanıldığı geliştirilmiş Comet analizi için negatif kontrol (% 1 etanol) ile kıyaslama,

^d $p < 0.05$, fpg enzimin kullanıldığı geliştirilmiş Comet analizi için pozitif kontrol ile kıyaslama,

^e $p < 0.05$, standart Comet analizi sonuçları ile fpg enziminin kullanıldığı Comet analizi sonuçlarının karşılaştırılması yapılarak elde edilen verileri ifade etmektedir.

Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması olarak ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir.



Şekil 4.10. Pitavastatinin HeLa hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki DNA hasarı üzerine etkileri.

DNA hasarı; DNA kuyruk uzunluğu olarak verilmiştir.

^a $p < 0.05$, standart Comet analizi için negatif kontrol (%1 etanol) ile kıyaslama,

^b $p < 0.05$, standart Comet analizi için pozitif kontrol ile kıyaslama,

^c $p < 0.05$, fpg enzimin kullanıldığı geliştirilmiş Comet analizi için negatif kontrol (% 1 etanol) ile kıyaslama,

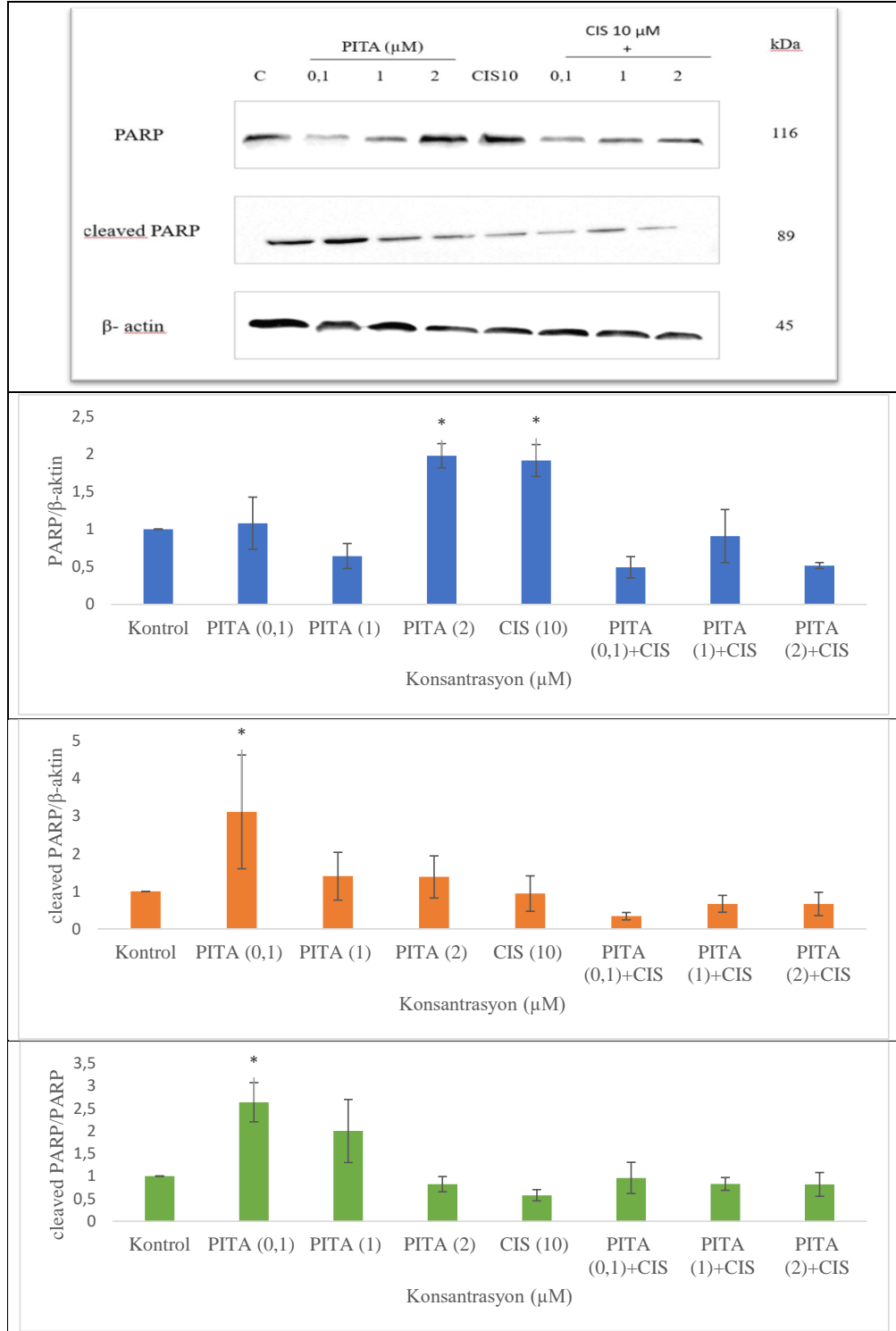
^d $p < 0.05$, fpg enzimin kullanıldığı geliştirilmiş Comet analizi için pozitif kontrol ile kıyaslama,

^e $p < 0.05$, standart comet analizi sonuçları ile fpg enziminin kullanıldığı Comet analizi sonuçlarının karşılaştırılması yapılarak elde edilen verileri ifade etmektedir.

Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması olarak ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir.

4.5. Pitavastatinin HeLa Hücrelerinde Apoptotik Yolak Üzerine Olan Etkilerinin Western Blotting Yöntemiyle Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

Çalışmada pitavastatinin 0,1, 1 ve 2 µM konsantrasyonları tek başına ve pitavastatinin 10 µM sisplatinle olan kombinasyonları değerlendirilmiştir. Western blotting ile 24 saatteki apoptoz yolağında etkin olan *cleaved* PARP ve PARP düzeyleri incelenmiştir. Tayin edilmiş olan proteinlerin normalizasyonu Image J programında bant kalınlıklarının yoğunluğuna göre β-aktine göre normalize edildi. Bulgular, aynı zamanda erken apoptozun başladığı konsantrasyon olan 0,1 µM pitavastatin uygulamasından sonra kontrole göre anlamlı olarak ($p < 0,05$) *cleaved* PARP protein seviyelerinin arttığını göstermektedir. Şekil 4.11'de görüldüğü gibi, 2 µM pitavastatin ve 10 µM sisplatin uygulamaları da PARP protein seviyelerinin kontrole göre anlamlı ($p < 0,05$) artışına neden olmuştur.



Şekil 4.11. Western blotting deneyi sonucunda apoptotik yolaktaki ilgili proteinlerin ekspresyonları.

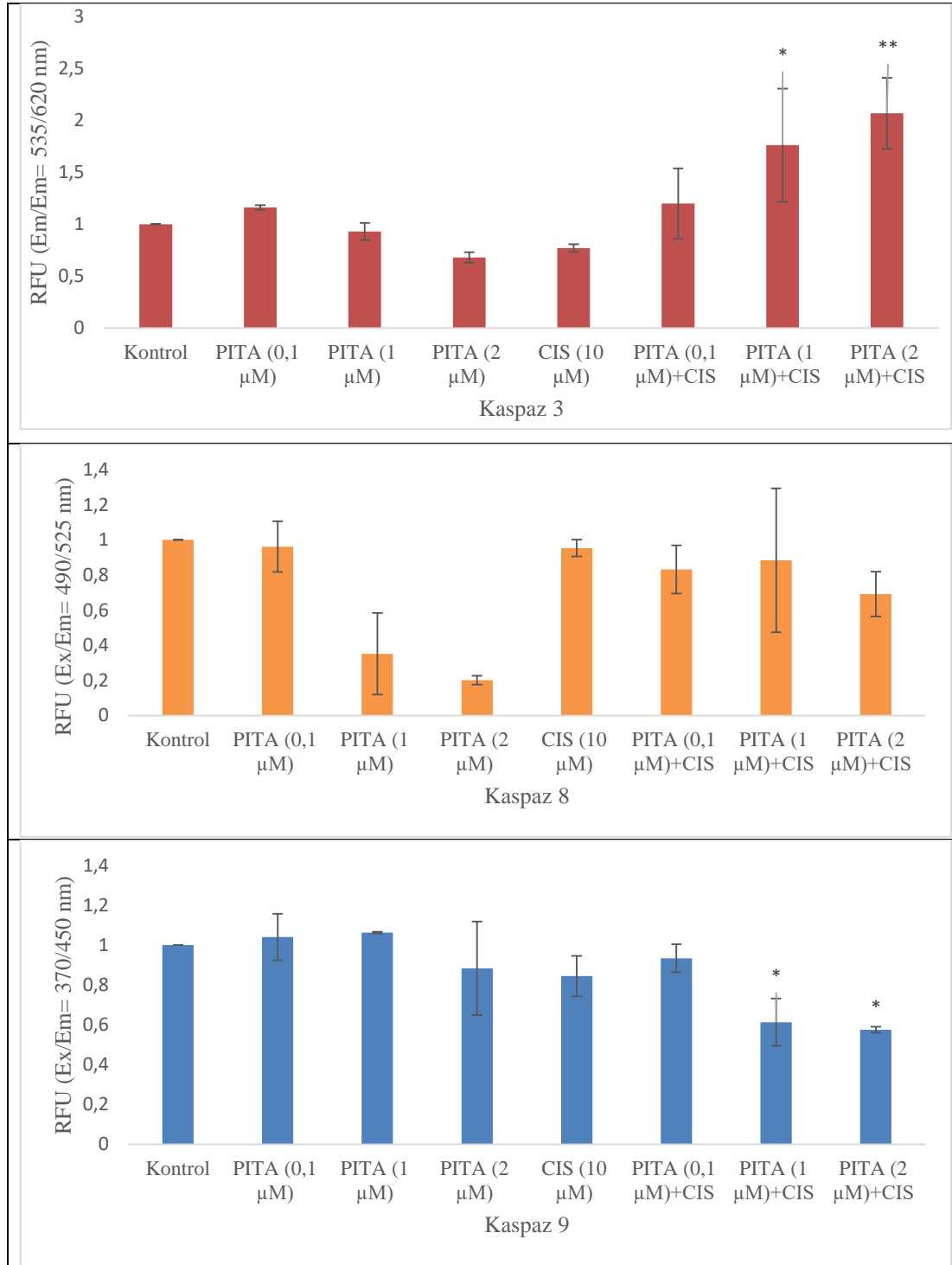
(PITA: Pitavastatin, CIS: Sisplatin) Veriler, kontrole göre kat değişimi olarak verildi.

* $p < 0,05$, Dunnett testinin ardından tek yönlü ANOVA ile kontrol grubuyla karşılaştırıldı.

Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması olarak ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir.

4.6. Pitavastatinin HeLa Hücrelerinde Kaspaz 3/8/9 Seviyelerinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

Pitavastatinin 0,1, 1 ve 2 μ M konsantrasyonları tek başına ve pitavastatinin 10 μ M sisplatinle olan kombinasyonları 24 saat maruziyet süresince değerlendirilmiştir. Şekil 4.12'de gösterildiği gibi; pitavastatin 0,1 μ M tek başına ve kombine grubu, kontrole kıyasla önemli ölçüde artmış kaspaz 3 aktivitesi gösterdi ($p<0,05$). Kaspaz 8 aktivitesinin tüm gruplarda kontrole göre anlamlı olmasa da azaldığı gözlemlendi. Pitavastatin 0,1 μ M ve 1 μ M gruplarında kontrole göre kaspaz 9 aktivitesi arttı ($p<0,05$). 1 ve 2 μ M gruplarının kombinasyonları, kaspaz 8 aktivitesini önemli ölçüde azalttı.



Şekil 4.12. Pitavastatin uygulanan HeLa hücrelerinin 24 saat maruziyet süresinde kaspaz 3/8/9 seviyeleri.

Veriler, kontrole göre kat değişimi olarak verildi. * $p < 0,05$, kontrol ile kıyaslama yapılarak elde edilen verileri ifade etmektedir. Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması olarak ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir. (PITA: Pitavastatin, CIS: Sisplatin)

5. TARTIŞMA

Serviks kanseri, üreme çağındaki kadınları etkileyen ölümcül bir jinekolojik neoplazmdır ve görülme sıklığı son yıllarda artmıştır. Ülkemizde yıllık yeni vaka sayısı 1.800 olup serviks kanseri insidansı 4/100.000'dir (18). Bu kanser türü, dünya genelinde kadınlar arasında ikinci en yaygın kanserdir (13, 145). Günümüzde kemoterapi, radyoterapi ve hormonal tedavi yöntemleri kullanılmakta olup bu yöntemlerle beklenen yaşam süresi uzatmaktadır (146). Serviks kanserinde konvansiyonel tedavilerin uygulanması birçok doku ve organda toksisiteye neden olmuş ve ilaçlara karşı direnç gelişimine yol açmıştır. Bu durum da serviks kanseri için yeni tedavilerin geliştirilmesi acil bir ihtiyaçtır (147).

Sunulan bu doktora tez çalışmasında, pitavastatinin HeLa hücreleri üzerine olan etkileri in vitro olarak değerlendirildi. Bu amaçla, pitavastatinin tek ve sisplatinle kombine haldeki olası erken ya da geç apoptoz indüksiyonu, antioksidan kapasitesi, olası genotoksik etkileri ve oksidatif hasara karşı olası önleyici etkileri değerlendirildi.

Farklı etki mekanizmalarına sahip iki veya daha fazla bileşiğin kombine kullanımının kanser tedavisinde başarı oranını artırabileceği bilgisinden yola çıkarak, bu tez çalışmasında farklı etkilere sahip iki bileşiğin çalışılması hedeflendi. Bu amaçla ilk olarak serviks kanseri tedavisinde yıllardır kullanılan klasik bir kemoterapötik olan sisplatin ile kanser çalışmalarında umut vaat eden pitavastatinin HeLa hücrelerindeki kombine etkisi incelendi. Sisplatin, serviks kanseri de dahil olmak üzere birçok neoplazmın tedavisinde uygulanan çapraz bağlayıcı bir ajandır. Bu kemoterapötik bileşik, platin kompleksleri oluşturarak DNA yapısında değişikliklere neden olur. Bu değişiklik, DNA moleküllerinin zincirler arası ve zincir içi çapraz bağlanmasından kaynaklanır ve DNA sentezini inhibe ederek hücre ölümüne neden olur (148). Pitavastatinin antikanser etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte onlarca yıldır yapılan araştırmalar, statinlerin antikanser aktivitelerini açıklayan bir mekanizmadan daha fazlası olduğunu göstermiştir. Hücre döngüsünün durmasına, apoptozun indüklenmesine veya moleküler yollardaki değişikliklere yol açan mekanizmalar, kullanılan statin tipine, kanser hücrelerinin tipine, statinin dozuna ve statine maruz kalma süresine bağlıdır (52). Statinlerin antikanser ilaçlar olarak veya klasik kemoterapötik ilaçlarla kombine adjuvanlar olarak kullanılabilmesi iki şekilde kanıtlanmıştır. Bunlardan ilki bu hipolipidemik ilaçların membran bütünlüğü için

gerekli olan kolesterol olan sterollerin üretimini engellemesi, diğeri ise proliferasyonu, migrasyonu, invazyonu, hücre döngüsünü, hücre çoğalmasını ve hücre çoğalmasını düzenleyen temel onkoproteinlerin izoprenilasyonunu bloke etmesidir. Mevalonat yolunun inhibisyonu, statinlerin uyguladığı antitümör etkilerinin çoğunun altında yatan temel moleküler mekanizmadır (62). Hücre ölümü, önemli biyolojik makromoleküllerde ciddi toksik hasara, hücre DNA hasarına neden olan, belirli makromolekülleri oksitleyen ve bazı enzimleri ve bunların kofaktörlerini etkisiz hale getiren reaktif oksijen bileşiklerinin aşırı üretimi ile ilişkilidir (55, 149). Kombine etki mekanizmasının, membran bütünlüğünü ve hücre kaderini etkileyen temel mekanizmaların inhibisyonu, ayrıca reaktif oksijen türlerinin aşırı oluşumu ve hücre ölümüne yol açan DNA hasarı olduğu tahmin edilmektedir.

Geleneksel sitotoksik ajanlar hem normal hem de tümör hücrelerini etkileyerek hastanın yaşam kalitesini etkiler. Daha spesifik olarak tümör hücrelerini hedef alan yeni tedavi yaklaşımlarına ve bu yönde kullanılacak ajanlara acilen ihtiyaç duyulmaktadır. Kanser hücrelerinin sürekli büyümesi ve hayatta kalması için kolesterolün varlığı gereklidir. Bu nedenle, kolesterol biyosentezinin inhibisyon yoluyla azaltılması umut verici bir antikanser stratejisi gibi görünmektedir. Ayrıca birçok malignitede kolesterol metabolizmasının düzenlenmediği bilinmektedir. Kanser hücrelerinin genel olarak yapısal olarak yüksek düzeyde HMG CoA redüktaz ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör aktivitesi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. HMG-CoA redüktaz, kolesterol sentezinde önemli bir öncü olan mevalonatın üretiminde rol oynar. Kanser hücreleri, kolesterol ihtiyaçlarını karşılamak için onları, bu yolu tüketen statinlerin etkilerine karşı normal hücrelere göre daha duyarlı hale getirebilir. Kanser hücrelerinin hızla çoğalması nedeniyle hücre zarı sentezini sağlamak için kolesterole olan talep önemli ölçüde artar. Kolesterolün plazma düzeyi düşürülerek kanser hücreleri tarafından kullanımının azaltılması amaçlanabilir. Ayrıca HMG-CoA redüktazın statinler tarafından doğrudan inhibisyonu, izoprenoidlerin tümör içi rezervlerini tüketir. İzoprenoidlerin kanser hücresi çoğalmasının ve metastazının ana düzenleyicileri olduğu bilinmektedir. Farklı tümör modellerine karşı *in vivo* ve *in vitro* potansiyel antikanser aktivitede tümör hücresi proliferasyonunun inhibisyonu ve mevalonat yolunun inhibisyonu yoluyla apoptozun indüklenmesi, statinlerin en çok rapor edilen etkileridir. Statinlerin antitümör etkileri esas olarak Rho

ve Ras gibi onkoproteinlerin aktif formunun ve hücre döngüsünü düzenleyen proteinlerin inhibisyonuna bağlanabilir. Hücresel kolesterol düzeyleri ile kanser arasındaki bu ilişki uzun zaman önce rapor edilmiştir ve tümörlerdeki kolesterol düzeylerinin normal dokulardan daha yüksek olduğunu gösteren uzun süredir devam eden çalışmalar bulunmaktadır. Bu nedenle kanser hücreleri, tümör teşvik edici hücre sinyal proteinlerine olan ihtiyaç nedeniyle artan kolesterol ihtiyacı için normal hücrelere göre daha fazla lipit içerir. Kısacası statinlerin normal hücrelere kıyasla kanserli hücre dizilerini hedef aldığı bildirilmiştir (62, 74, 150-154).

İncelenen çalışmalar arasında; erken metastatik kanserlerde, özellikle de prelinik modellerde statinlerin bir sitotoksik ajanla kombinasyon halinde verildiğinde sinerjistik etki ile daha etkili olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Bunlardan biri, tez çalışmasında kullandığımız kanser hücre dizisi olan insan serviks kanser hücrelerinde doksorubisinin tek başına ve simvastatin ile kombinasyon halinde sitotoksik etkileri farklı inkübasyon sürelerinde değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve tripan mavisi yöntemleriyle incelenmiş olup simvastatinin belirtilen hücre hattında sitotoksik etkisi gösterilmiştir (155). Bu çalışmayı destekler nitelikte yapmış olduğumuz ön çalışmada simvastatin ile aynı statin ailesinde yer alan pitavastatinin sitotoksik etkisinin HeLa hücrelerinde MTT ve nötral kırmızı alım (NKA) yöntemleriyle konsantrasyon artışıyla birlikte artış gösterdiği 24, 48 ve 72 saat maruziyet sürelerinde saptanmıştır. IC₅₀ değerleri NKA ve MTT yöntemleri için 72 saat maruziyet süresinde sırasıyla 11,20 µM ve 115,65 µM olarak bulunmuştur. Ayrıca, yapmış olduğumuz ön çalışmayı destekler şekilde statinlerin çeşitli sağlıklı ve kanser hücrelerinde hücre siklusunu belirli evrelerde durdurduğu ve hücre ölümünü uyardığına dair veriler yer almaktadır. Hücre ölümü, proteinler, lipitler ve nükleik asitler gibi önemli biyolojik makromoleküllere ciddi hasar veren oksidatif stres ve ROB oluşumu ile ilişkilidir. Oksidatif stres ve oluşan ROB'lerin, hücre DNA'sına zarar verebildiği, belirli makromolekülleri oksitleyebildiği ve bazı enzimleri ve bunların kofaktörlerini etkisiz hale getirebildiği bilinmektedir. Oksidasyon, biyolojik özelliklerinin kaybına ve sonuçta hücre ölümüne yol açar (55, 149).

Bu ön çalışmadan elde edilen veriler ışığında konsantrasyon aralığı oluşturulmuş ve pitavastatinin HeLa hücrelerindeki geç apoptotik etkilerinin ve hücre

döngüsü üzerine etkilerinin belirlenmesine ilişkin bulgulara bakıldığında geç apoptoz göstergesi olarak SubG1 piki değerlendirilmiş, yalnızca 1 μM konsantrasyonunda %7 oranında ve 1 μM pitavastatin ile 20 μM sisplatin kombinasyonunda apoptoz görülmüştür. Bu durum düşük dozda ve düşük doz pitavastatin kombinasyonunda hücrelerin apoptoza uğradığını göstermektedir. Konsantrasyon yükseldikçe hücrelerin nekroza uğradığı görülmüştür. Hücre döngüsü üzerine olan etkiyi genel olarak değerlendirdiğimizde kombinasyon gruplarında sisplatin etkisi görülmüş ve S fazının hücre yüzdesinin arttığı saptanmıştır. 10 μM ve 100 μM konsantrasyonlarda pitavastatin ile sisplatinle olana benzer şekilde S evresinde hücre yüzdesinin arttığı gözlenmiştir. Pitavastatinin HeLa hücrelerindeki erken apoptotik etkilerinin belirlenmesine ilişkin bulgular değerlendirildiğinde ise çalışılan tüm konsantrasyonlarda erken apoptoz gözlenmiştir. Öngörülen konsantrasyonlardan kaynaklı olduğu düşünülerek hücrelerin büyük kısmının nekroza uğradığı belirlenmiştir. Jiang ve ark., (2014) pitavastatinin oral kullanım dozunda glioblastoma hücre hattında antikanser etkisi olup olmadığını incelenmiştir. Tümör hücrelerinde statinlerin hücre döngüsü üzerindeki etkileri analiz edilmiş olup, glioblastoma ve meme kanseri hücre dizilerinde G1/S fazında büyümeyi durdurdukları gösterilmiştir. Pitavastatinin, hücre siklusunu tedaviden 12 saat sonra tetiklediği gösterilmiş, S fazındaki tümör hücreleri önemli ölçüde azalırken, G0/G1 fazındaki hücre popülasyonunun arttığı kaydedilmiştir. Ayrıca, çalışmanın devamında tümürlü farelerde oral gavaj kullanıldığında yüksek pitavastatin dozu glioblastoma hücre hattında tümör büyümesini önemli ölçüde engellememiştir. Bu durum antikanser tedavi için statin kullanımında formülasyonun modifikasyonu ve dozunun optimize edilmesi gerekliliğini göstermektedir (65). Bir başka lipofilik statin olan fluvastatinin üç hepatoselüler kanser hücre hattında olası antikanser etkisi değerlendirilmiştir. 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 potansini önemli ölçüde düşürdüğü ortaya konmuştur (156).

Florimetrik analizle ROB düzeylerindeki değişiklikler HeLa hücrelerinde değerlendirilmiştir. 0 ve 30 dk ile 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 18, 24 ve 48 saatte floresan yoğunlukları ölçülmüştür. 100 μM TBHP (pozitif kontrol olarak) ile muamelenin,

çözücü kontrolüne kıyasla hücre içi ROB seviyesini önemli ölçüde artırdığı görülmüştür. Pitavastatinin doza ve süreye bağlı şekilde hücre içi ROB seviyesini arttırdığı görülmektedir. İstatistiksel değerlendirme ve ROB seviyelerinin karşılaştırılması için 4. saatteki floresan ölçümleri seçilmiştir. Ayrıca istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilen pitavastatinin 100 µM konsantrasyonu için zamana karşı ROB oluşumu değerlendirilmiştir. Pitavastatinin 100 µM konsantrasyonu ile sisplatinin kombinasyonu olan grup da ROB seviyelerindeki artış çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Çeşitli kanser hücrelerinde yapılan çalışmaların sonucu olarak bu hücrelerde ROB'un azaldığı belirtilirken diğer taraftan çalışmaların büyük kısmında kanser hücrelerinin metabolik ROB üretiminde normal hücrelerden daha aktif olduğu ve oksidatif stres altında daha kararlı olduğu öne sürülmektedir (157). Bu durum bizlere pitavastatinin hücre içi ROB seviyesini arttırmasıyla sitotoksik etkisinin oksidatif stres aracılığıyla olduğunu düşündürmüştür. Araştırma grubumuzla benzer parametreleri değerlendiren başka bir çalışma grubu, statinlerin MCF-7 hücre hattında hücre ölümü, ROB üretimi ve mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkilerini araştırmışlar ve fluvastatin, simvastatin ve atorvastatinin hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Antiproliferasyonun DNA sentezindeki azalma, hücre döngüsünün G1 ve G2/M fazlarında durdurulması ile ilişkili olduğu ve fluvastatinin mitokondriyal membran potansiyelinde azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir. Statinler tarafından indüklenen sitotoksikite ve oksidatif stresin apoptotik veya nekrotik hücre ölümüne sekonder olup olmadığını belirlemek için, karboksiflorescein apoptoz tespiti ile kaspazların aktivasyonu değerlendirilmiştir. Kontrole göre hem erken hem de geç apoptoza uğramış hücrelerin yüzdesinde artış görülmüştür. Statinlerin, apoptotik hücre ölümünü de indüklediği, böylece statinlerin, hem apoptotik hem de nekrotik hücre ölümünü indükleyebileceği gösterilmiştir. Statinlerin neden olduğu hücre ölümünün oksidatif strese bağlı olup olmadığını belirlemek adına meme kanseri hücreleri güçlü bir antioksidan olan N-asetil sistein ve statinler ile inkübe edilmiş ve sonucunda N-asetil sisteinin statinler tarafından indüklenen hücre ölümünü güçlü bir şekilde inhibe edebildiği gösterilmiştir. Araştırmacılar, elde ettiğimiz değerlendirmelere paralel şekilde MCF-7 hücrelerindeki statinlerin neden olduğu sitotoksitenin önemli ölçüde oksidatif stres kaynaklı olduğunu kaydetmişlerdir. Statinlerin tek başına veya doksorubisin ya da sisplatin gibi

antineoplastik ajanlarla kombinasyon halinde oral kullanımının meme kanserinin tedavisinde yeni, güvenli ve etkili bir yardımcı tedavi olabileceği vurgulanmıştır (55). Standart comet testinde uygulanan konsantrasyonlar sitotoksisite sonuçları ve ilacın farmakokinetik özellikleri göz önüne alınarak 2-200 µM konsantrasyon aralığında belirlenmiş olup hücreler farklı konsantrasyonlarda pitavastatin içeren besiyeri ile, kontrol ve pozitif kontrol için sonradan H₂O₂ ile muamele edilmek suretiyle saf besiyeri ile 48 saat inkübe edilmiş ve ikili olarak çalışılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, DNA hasarının pitavastatinin 200 µM konsantrasyonunda önemli ölçüde arttığı bulunmuştur. Pitavastatinin, H₂O₂ kaynaklı DNA hasarını 2-50 µM konsantrasyon aralığında azalttığı, ancak 100 ve 200 µM konsantrasyonlarında artırdığı gözlenmiştir. Fpg-geliştirilmiş comet testinde DNA hasarının, 20 µM konsantrasyonlarının üzerinde önemli ölçüde arttığı ve H₂O₂ ile indüklenen DNA hasarının, kontrole kıyasla doza bağlı bir şekilde tüm konsantrasyonlarda (2-200 µM) arttığı görülmüştür. Fpg proteini, oksidatif DNA bazı hasarının tespiti için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, 8-OH-guanin ve diğer oksidatif olarak hasar görmüş pürinleri tespit etmek için yüksek hassasiyetinin yanı sıra, fpg enzimi ayrıca abazik bölgeler ve halka açılmış N-7 guanin katım ürünleri gibi alkilasyon hasarını da tespit eder (158). Standart comet testi ile fpg enzimi kullanılarak geliştirilmiş comet testi sonuçları karşılaştırıldığında, pitavastatinin bahsedilen fpg'ye duyarlı bölgeleri arttırdığı sonucuna varılmıştır. Bu bulgu pitavastatine bağlı DNA hasarına oksidatif stresin aracılık ettiğini göstermektedir. Benzer sonuca ulaşan bir başka çalışmada ise atorvastatinin insan lenfositlerinde *in vitro* genotoksik etkilerinin incelenmiş, 6, 24 ve 48 saat maruziyetten sonra bazal DNA hasarının değerlendirilmesinde comet yöntemi ve ROB tarafından üretilen muhtemel oksidatif DNA hasarının araştırılması için fpg enziminin kullanıldığı geliştirilmiş comet yöntemi ve mikronükleus testi kullanılmıştır. Fpg enziminin varlığında ve yokluğunda comet parametreleri arasındaki fark, atorvastatinin neden olduğu DNA hasarının oksidatif stres aracılığıyla olduğunu düşündürmüştür (159). Statinlerin olası genotoksik etkilerini değerlendiren çalışmalar arasında; atorvastatinin insan lenfositleri üzerindeki genotoksik potansiyeli araştırılmış genotoksisite yöntemlerinden comet yöntemi, kromozom hasarı ve kardeş kromatit değişimi testleri kullanılmıştır. Comet yöntemi için hücreler 24, 48 ve 72 saat atorvastatine maruz bırakılırken kromozom hasar testi için 48 saat ve kardeş kromatit

değişim testinde ise 72 saat maruziyet süresinde çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında, üç yöntem için de atorvastatine maruz kalan insan lenfositlerinde kontrole göre genotoksik hasar görüldüğü, istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildiği kaydedilmiştir. Atorvastatine maruz bırakılan insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarının Comet yöntemiyle değerlendirildiği çalışmada kuyruk uzunluğunun 24, 48 ve 72 saat maruziyet sürelerinin tamamında ve kuyruk momentinin ise 72 saat maruziyet süresinde kontrol hücrelerine göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (160). Lovastatinin over kanser hücre hattında etkileri tek başına ve sisplatin ve doksorubisinle kombine halde uygulamasının ardından in vitro şartlarda foksiyonel, moleküler ve farmakolojik yaklaşımlarla incelenmiştir. Lovastatinin, over kanseri hücrelerinin apoptozunu p53'ten bağımsız bir şekilde indüklediği ve tekrarlayan over kanser vakalarının tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ajan olan doksorubisin ile sinerjistik etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Lovastatinin hücre ölümünü iki mekanizma ile harekete geçirdiği, bunlardan ilkinin HMG-CoA redüktaz aktivitesini bloke ederek ve ikincisinin ise ilaca dirençli hücreleri doksorubisine duyarlı hale getirerek olduğu belirtilmiştir. Genotoksik etki comet yöntemi ile incelenmiş, 10 µM lovastatinin tek başına ve 7 µM doksorubisin ile 24 saat maruziyet süresinde etkisine bakılmıştır. Doksorubisinin tek başına DNA hasarı oluşturduğu, lovastatinle uygulandığında ise oluşan DNA hasarının istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde 3 kat arttığı kaydedilmiştir. Bu araştırmanın sonuçları, statinlerin, over karsinomunun tedavisinde potansiyel antikanser ajanlar olarak değerlendirilmesini öngören klinik öncesi veriler sağlamaktadır. Birçok statinin, antikanser ajan olarak kullanılmak üzere hemen temin edilebilen ucuz, patent dışı jenerik ilaçlar olduğu ve lovastatinin over kanseri hücrelerinin apoptozunu tetiklediği belirtilmiştir. Ayrıca, tekrarlayan vakalarda reçete edilen doksorubisin ile lovastatinin sinerjistik etkisi de gösterilmektedir (161). Görüldüğü üzere statinlerin genotoksik profilini farklı hücre hatlarında değerlendiren çalışmalar mevcut olmakla birlikte elde edilen sonuçların tamamının paralellik göstermediği düşünülmektedir. Alanyazında statinlerin çeşitli kanser türlerinde antitümöral etkilere sahip olduğuna dair çalışmalar arasında pitavastatinin serviks kanseri üzerindeki etkisi hakkında sınırlı bilgiye sahip olduğundan sunulan bu tez çalışmasının bilime katkı sağlayacağı açıktır (162).

Apoptoz yolağında önemli olan PARP ve bölünmüş PARP düzeyleri ile kaspaz 3/8/9 seviyeleri belirlenerek pitavastatinin apoptoz yolağındaki etkisi incelenmek istenmiştir. Bilindiği üzere statinlerin kardiyovasküler alandaki yararlı etkileri iyi bilinmesine rağmen, olası antikanser özellikleri son zamanlarda önem kazanmıştır (69). Statinlerin kanser, hücre döngüsü regülasyonu ve apoptoz indüksiyonu üzerindeki *in vitro* etkileri gösterilmiş ve kanser hücresi proliferasyonunu baskıladığı doğrulanmıştır (163). Statin kaynaklı apoptoz mekanizmaları arasında statinlerin Bcl-2 protein ekspresyonunu azaltarak çeşitli mekanizmalar yoluyla farklı kaspazları aktive ettiği ve aktive edilmiş kaspaz-8, kaspaz-10 ve pro-kaspaz-3'ün kaspaz-3'e dönüşümünü desteklediği görülmüştür. Böylece bölünmüş PARP-1 seviyelerini arttırdığı düşünülmektedir (43). PARP, apoptoz sırasında kaspaz-3 tarafından bölünür ve PARP'ın bölünmesinin apoptoz sırasında DNA onarımını önlediği bilinmektedir (164). Bazal koşullar altında, PARP-1'in birincil işlevi DNA hasarını tespit etmek ve onarmaktır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda PARP-1'in aynı zamanda hücrenin hayatta kalmasından çeşitli hücre ölüm biçimlerine kadar çeşitli fizyolojik ve patolojik işlevlere katıldığı ve gen transkripsiyonu, öğrenme, hafıza, anjiyogenez ve yaşlanma ile ilişkili olduğu değerlendirilmektedir. Apoptoz mekanizmasında PARP-1, kaspazların bilinen birkaç hücrel substratından biridir. PARP-1'in kaspazlar tarafından bölünmesi, apoptozun ayırt edici özelliği olarak kabul edilir (165). Statinlerin lenfoma hücreleri üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmada, üç farklı statin olan atorvastatin, fluvastatin ve simvastatin uygulandığında, kaspaz-3, PARP ve Bax gibi proapoptotik üyelerin DNA fragmentasyonunu ve aktivasyonunu artırdığı, ancak anti-apoptotik molekül Bcl-2'nin aktivasyonunu baskıladığı görülmüştür. Bu hücrelerde 12 saatlik maruziyet sürelerinde 0-10 μM arasında değişen konsantrasyonlarda fluvastatin ile yapılan muamelede apoptozun iyi bilinen özellikleri olan bölünmüş kaspaz-3 ve bölünmüş PARP ekspresyonlarının, doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde arttığı belirtilmiştir (166). Bu çalışmayı destekler nitelikte western blot çalışmamızdaki bulgular ise; 0,1 μM pitavastatinin bölünmüş PARP protein seviyelerinin artışına sebep olduğu şeklindedir. Ayrıca 2 μM pitavastatin ve 10 μM sisplatin uygulamalarında sonra PARP protein seviyelerinin arttığı görülmüştür.

Pitavastatin, HeLa hücrelerinin apoptozu indüklemiş ve bölünmüş PARP/PARP'ın protein ekspresyon oranlarında artışa sebep olmuştur. Bu,

pitavastatinin apoptozun intrinsik yolağına aracılık edebileceğı anlamına gelebilir. Literatürde statinlerin lenfoma hücreleri, pankreas kanseri hücreleri ve glioblastoma hücre dizileri gibi çok farklı hücre dizilerinde apoptozu indükleyerek hücre ölümüne neden olduğu bildirilmektedir (167). Sonuçlarımıza benzer şekilde simvastatinin de intrinsik yolak yoluyla apoptozu indüklediğı rapor edilmiştir (168). Statinlerin lenfoma hücreleri üzerindeki etkilerini inceleyen bir çalışmada, atorvastatin, fluvastatin ve simvastatin olmak üzere üç farklı statin uygulandığında DNA fragmentasyonunu ve Bax, kaspaz-3 ve proapoptotik üyelerin aktivasyonunu arttırdığı gözlenmiştir. PARP ve Bax, ancak azalmış, anti-apoptotik molekül Bcl-2'nin aktivasyonunu baskılamıştır. Bu hücrelerde, bölünmüş kaspaz-3 ve bölünmüş PARP'nin ekspresyonunun, 12 saatlik maruz kalma sürelerinde 0-10 µM arasında değişen konsantrasyonlarda fluvastatin ile tedaviden sonra doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (166). Pitavastatinin apoptozu indüklediğini gösteren çalışmaların yanı sıra apoptoz üzerindeki etkisinin oldukça dolaylı olduğunu belirten araştırmacılar da bulunmaktadır (167, 169). Bu kapsamda yapılması gereken çalışmaların gerekliliğı açıktır.

Apoptoz yolağında etkin olan kaspaz 3/8/9 seviyelerini değerlendirdiğimizde ise; 0,1 µM pitavastatinin ve tüm kombinasyonların, kontrole kıyasla önemli ölçüde artmış kaspaz 3 aktivitesi göstermiştir. Kaspaz 8 aktivitesinin tüm gruplarda kontrole göre anlamlı olmasa da azaldığı gözlemlendi. Kaspaz 9 seviyeleri ise 0,1 µM pitavastatinin ve 1 µM gruplarında kontrole göre artış göstermesine karşın 1 ve 2 µM gruplarının kombinasyon grupları kaspaz 8 aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır. Çalışmamızla tutarlı olarak, Piktel ve arkadaşları, pitavastatinin vinkristine dirençli akut lenfoblastik lösemi hücre hattı üzerindeki etkisini inceleyerek, western blot yöntemiyle bölünmüş PARP seviyelerinde artış olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada, 48 saatlik maruziyet süresi boyunca vinkristine dirençli tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği, ayrıca kaspaz seviyeleri incelendiğinde kaspaz-3 ve -7 aktivitesini arttırdığı görülmüştür. Bu verilerle, pitavastatinin bu hücre hattında apoptozu indüklediğı düşünülmektedir (170). Bu çalışmayla uyumlu olarak 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 getirildiğı üzerine

birçok çalışma bulunmaktadır. Statinlerin melanom, kolon ve akciğer karsinomunda doksorubisinin antitümör aktivitesini arttırdığı da gösterilmiştir (171). Sunulan doktora tez çalışması da bu durumu destekler niteliktedir ve statinlerin adjuvan tedavide kombine halinde ümit verici antikanser ilaçlar olarak kabul edilmesi gerektiğini düşündürmektedir (52).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, ilk kez, HeLa'da pitavastatin ve sispaltinin tek başına ve birlikte uygulanmasının hücre proliferasyonunu daha etkili bir şekilde azaltabileceğini, hücre döngüsünün durmasını destekleyebileceğini, düşük konsantrasyonlarda apoptozu indükleyebileceği, yüksek konsantrasyonlarda ise genotoksik olabileceği ve oksidatif stres aracılığıyla hücre ölümüne neden olabileceği bu doktora tez çalışmasıyla gösterilmiştir. Tez projesi kapsamında elde edilen bu sonuçların, kanser tedavisinde önemli bir rolü olabileceğini düşündürmüştür ve alanyazındaki benzer çalışmalarla da uyumlu olduğu görülmüştür. Bu nedenle, pitavastatinin serviks kanseri tedavi araştırmalarında yer almak için potansiyel bir aday olabilecek gibi durmaktadır. Bununla beraber, pitavastatinin HeLa hücrelerinde antikanser etkilerinin altında yatan mekanizmaların tam olarak aydınlatılması için daha ileri bilimsel çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır. Ayrıca bu konudaki araştırmaların kapsamı genişletilmeli ve *in vivo*, *in vitro* ve klinik çalışmalarla desteklenmelidir.

7. KAYNAKLAR

1. IARC. Cervical cancer [İnternet]. 2023 Erişim Tarihi [14 Kasım 2023]. Erişim adresi: <https://www.iarc.who.int/cancer-type/cervical-cancer/>.
2. National Cancer Institute. Cervical Cancer Treatment [İnternet]. 2023 [Erişim Tarihi 10 Ekim 2023]. Erişim adresi: <https://www.cancer.gov/types/cervical/treatment>
3. Thigpen T. The role of chemotherapy in the management of carcinoma of the cervix. *The Cancer Journal*. 2003;9(5):425-32.
4. Kwon M, Nam G-H, Jung H, Kim SA, Kim S, Choi Y, et al. Statin in combination with cisplatin makes favorable tumor-immune microenvironment for immunotherapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer letters*. 2021;522:198-210.
5. Lee N, Tiliya Pun N, Jang WJ, Bae JW, Jeong CH. Pitavastatin induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma through activation of FOXO3a. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2020;24(12):7055-66.
6. Ökçesiz A. Pitavastatin Sitotoksitesinin Serviks Kanseri Hücre (HeLa) Hattında Değerlendirilmesi [Yüksek Lisans]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2018.
7. Devine C, Viswanathan C, Faria S, Marcal L, Sagebiel TL, editors. *Imaging and staging of cervical cancer. Seminars in Ultrasound, CT and MRI*; 2019: Elsevier.
8. Giovannetti O, Tomalty D, Velikonja L, Jurkus C, Adams MA. The human cervix: Comprehensive review of innervation and clinical significance. *Clinical Anatomy*. 2023;36(1):118-27.
9. Tantengco OAG, Vink JY, Menon R. Trends, gaps, and future directions of research in cervical remodeling during pregnancy: A bibliometric analysis. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2022;35(25):8355-63.
10. Nalbantoğlu HG, Arslan P. Servikal kanser: Genel bakış. *Karatekin University Journal of Science*. 2023;2(1):43-50.
11. Wang X, Gu Y, Zhang L, Ma J, Xia Y, Wang X, editors. *Long noncoding RNAs regulate intrauterine adhesion and cervical cancer development and progression. Seminars in Cell & Developmental Biology*; 2023: Elsevier.
12. Bedell SL, Goldstein LS, Goldstein AR, Goldstein AT. Cervical cancer screening: past, present, and future. *Sexual medicine reviews*. 2020;8(1):28-37.
13. Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. Cervical cancer. *The Lancet*. 2019;393(10167):169-82.
14. National Cancer Institute. Cervical Cancer Causes, Risk Factors, and Prevention [İnternet]. 2023 [Erişim Tarihi 15 Aralık 2023]. Erişim adresi: <https://www.cancer.gov/types/cervical/causes-risk-prevention>.

15. Ferrall L, Lin KY, Roden RB, Hung C-F, Wu T-C. Cervical cancer immunotherapy: facts and hopes. *Clinical Cancer Research*. 2021;27(18):4953-73.
16. Büyük M, BİLGİN NÇ. HPV Enfeksiyonuna Güncel Bir Bakış: Nedenleri, Etkileri ve Korunma. *Abant Sağlık Bilimleri ve Teknolojileri Dergisi*. 2023;3(1):1-9.
17. Board PATE. Cervical Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version. PDQ cancer information summaries [internet]. 2002.
18. Selçuk İ, Üstün YE. Gelecekte Nonavalent 9-valent HPV Aşısının Türkiye İçin Kullanılabilirliği. *Jinekoloji-Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi*. 2019;16(1):41-4.
19. Rahangdale L, Mungo C, O'Connor S, Chibwesa CJ, Brewer NT. Human papillomavirus vaccination and cervical cancer risk. *bmj*. 2022;379.
20. Jin Y, Xie S, Sheng B, Chen M, Zhu X. The effect of propofol on chemosensitivity of paclitaxel in cervical cancer cells. *Cancer Medicine*. 2023.
21. Feyza K, AKŞİT S, KURUGÖL Z, KOTUROĞLU G, HALICIOĞLU O, ASLAN A. Serviks Kanseri Hakkında Hekimlerin Bilgi Düzeyleri. *Journal of Clinical Obstetrics & Gynecology*. 2010;20(5):281-6.
22. Bhatla N, Aoki D, Sharma DN, Sankaranarayanan R. Cancer of the cervix uteri: 2021 update. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2021;155:28-44.
23. WHO. A practical manual on visual screening for cervical neoplasia [Internet]. 2023 [Erişim Tarihi 4 Kasım 2023]. Erişim adresi: <https://screening.iarc.fr/viavili.php>.
24. Zhang C, Xu C, Gao X, Yao Q. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. *Theranostics* 12 (5): 2115-2132. 2022.
25. Florea A-M, Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*. 2011;3(1):1351-71.
26. Kazak F, Deveci MZY, Akçakavak G. Eucalyptol alleviates cisplatin-induced kidney damage in rats. *Drug and Chemical Toxicology*. 2022:1-8.
27. Tang C, Livingston MJ, Safirstein R, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: new insights and therapeutic implications. *Nature Reviews Nephrology*. 2023;19(1):53-72.
28. Saleh DO, Mansour DF, Mostafa RE. Rosuvastatin and simvastatin attenuate cisplatin-induced cardiotoxicity via disruption of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptotic death in rats: targeting ER-Chaperone GRP78 and Calpain-1 pathways. *Toxicology Reports*. 2020;7:1178-86.
29. Bhat A, Verma S, Chander G, Jamwal RS, Sharma B, Bhat A, et al. Cisplatin-based combination therapy for cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2023.

30. Crona DJ, Faso A, Nishijima TF, McGraw KA, Galsky MD, Milowsky MI. A systematic review of strategies to prevent cisplatin-induced nephrotoxicity. *The oncologist*. 2017;22(5):609-19.
31. Qi L, Luo Q, Zhang Y, Jia F, Zhao Y, Wang F. Advances in toxicological research of the anticancer drug cisplatin. *Chemical research in toxicology*. 2019;32(8):1469-86.
32. Xu J, Zhang B, Chu Z, Jiang F, Han J. Wogonin alleviates cisplatin-induced cardiotoxicity in mice via inhibiting gasdermin D-mediated pyroptosis. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2021;78(4):597.
33. Yildirim C, Cangi S, Orkmez M, Yilmaz SG, Bozdayı MA, Yamaner H, et al. Sinapic acid attenuated cisplatin-induced cardiotoxicity by inhibiting oxidative stress and inflammation with GPX4-mediated NF-kB modulation. *Cardiovascular Toxicology*. 2023;23(1):10-22.
34. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic chemistry*. 2019;88:102925.
35. Liu A, Wu Q, Guo J, Ares I, Rodríguez J-L, Martínez-Larrañaga M-R, et al. Statins: Adverse reactions, oxidative stress and metabolic interactions. *Pharmacology & therapeutics*. 2019;195:54-84.
36. Rossini E, Biscetti F, Rando MM, Nardella E, Cecchini AL, Nicolazzi MA, et al. Statins in High Cardiovascular Risk Patients: Do Comorbidities and Characteristics Matter? *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(16):9326.
37. Okcesiz A, Bucurgat UU. Evaluation of toxic effects of statins and their possible role in treatment of cancer. *Journal of the Faculty of Pharmacy of Istanbul University*. 2021;51(1):154-61.
38. Di Bello E, Zwergel C, Mai A, Valente S. The innovative potential of statins in cancer: New targets for new therapies. *Front Chem*. 2020; 8: 516. 2020.
39. Korani S, Korani M, Bahrami S, Johnston TP, Butler AE, Banach M, et al. Application of nanotechnology to improve the therapeutic benefits of statins. *Drug discovery today*. 2019;24(2):567-74.
40. Sirtori CR. The pharmacology of statins. *Pharmacological research*. 2014;88:3-11.
41. Ward NC, Watts GF, Eckel RH. Statin toxicity: mechanistic insights and clinical implications. *Circulation research*. 2019;124(2):328-50.
42. Mancini GJ, Tashakkor AY, Baker S, Bergeron J, Fitchett D, Frohlich J, et al. Diagnosis, prevention, and management of statin adverse effects and intolerance: Canadian Working Group Consensus update. *Canadian Journal of Cardiology*. 2013;29(12):1553-68.
43. Ahmadi M, Amiri S, Pecic S, Machaj F, Rosik J, Łos MJ, et al. Pleiotropic effects of statins: A focus on cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2020;1866(12):165968.

44. Choudhary A, Rawat U, Kumar P, Mittal P. Pleotropic effects of statins: the dilemma of wider utilization of statin. *The Egyptian Heart Journal*. 2023;75(1):1-10.
45. Dağdeviren T. Programlı hücre ölümü; Apoptoz. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2021;13(3):120-35.
46. Schafer K. The cell cycle: a review. *Veterinary pathology*. 1998;35(6):461-78.
47. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*. 2003;36(3):131-49.
48. Almalki SG. The pathophysiology of the cell cycle in cancer and treatment strategies using various cell cycle checkpoint inhibitors. *Pathology-Research and Practice*. 2023:154854.
49. Foster I. Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*. 2008;14(2):144-9.
50. Fan Y, Sanyal S, Bruzzone R. Breaking bad: how viruses subvert the cell cycle. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2018;8:396.
51. Bakır E. Flurbiprofenin Sitotoksik, Genotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi [Doktora Tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2018.
52. Matuszewicz L, Meissner J, Toporkiewicz M, Sikorski AF. The effect of statins on cancer cells. *Tumor Biology*. 2015;36:4889-904.
53. Campos-Lara M, Mendoza-Espinoza JA. Cytotoxic evaluation of fluvastatin and rosuvastatin and effect of fluvastatin in the hela cell cycle. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011;5(2):189-93.
54. Gauthaman K, Richards M, Wong J, Bongso A. Comparative evaluation of the effects of statins on human stem and cancer cells in vitro. *Reproductive biomedicine online*. 2007;15(5):566-81.
55. Sánchez CA, Rodriguez E, Varela E, Zapata E, Paez A, Massó FA, et al. Statin-induced inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation is related to cell cycle arrest and apoptotic and necrotic cell death mediated by an enhanced oxidative stress. *Cancer investigation*. 2008;26(7):698-707.
56. Robinson JP, Ostafe R, Iyengar SN, Rajwa B, Fischer R. Flow Cytometry: The Next Revolution. *Cells*. 2023;12(14):1875.
57. Baykara O. Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2016;5(3):154-65.
58. Jawad MJ, Richardson A. Ivermectin Augments the Anti-Cancer Activity of Pitavastatin in Ovarian Cancer Cells. *Diseases*. 2023;11(1):49.
59. 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.
60. Sheikholeslami K, Ali Sher A, Lockman S, Kroft D, Ganjibakhsh M, Nejati-Koshki K, et al. Simvastatin induces apoptosis in medulloblastoma brain tumor cells via mevalonate cascade prenylation substrates. *Cancers*. 2019;11(7):994.

61. Pradelli D, Soranna D, Scotti L, Zambon A, Catapano A, Mancina G, et al. Statins and primary liver cancer: a meta-analysis of observational studies. *European journal of cancer prevention*. 2013;22(3):229-34.
62. Pisanti S, Picardi P, Ciaglia E, D'Alessandro A, Bifulco M. Novel prospects of statins as therapeutic agents in cancer. *Pharmacological research*. 2014;88:84-98.
63. 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.
64. Davignon J. Pleiotropic effects of pitavastatin. *British journal of clinical pharmacology*. 2012;73(4):518-35.
65. 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):1562-71.
66. Li LZ, Zhao ZM, Zhang L, He J, Zhang TF, Guo JB, et al. Atorvastatin induces mitochondrial dysfunction and cell apoptosis in HepG2 cells via inhibition of the Nrf2 pathway. *Journal of Applied Toxicology*. 2019;39(10):1394-404.
67. Gu L, Saha ST, Thomas J, Kaur M. Targeting cellular cholesterol for anticancer therapy. *The FEBS journal*. 2019;286(21):4192-208.
68. Berber AA, Celik M, Aksoy H. Genotoxicity evaluation of HMG CoA reductase inhibitor rosuvastatin. *Drug and chemical toxicology*. 2014;37(3):316-21.
69. Chan KK, Oza AM, Siu LL. The statins as anticancer agents. *Clinical cancer research*. 2003;9(1):10-9.
70. Alupeu MC, Licarete E, Cristian FB, Banciu M. Cytotoxicity of lipophilic statins depends on their combined actions on HIF-1 α expression and redox status in B16. F10 melanoma cells. *Anti-cancer drugs*. 2014;25(4):393-405.
71. Chae YK, Yousaf M, Malecek M-K, Carneiro B, Chandra S, Kaplan J, et al. Statins as anti-cancer therapy; Can we translate preclinical and epidemiologic data into clinical benefit? *Discovery medicine*. 2015;20(112):413-27.
72. Schupp N, Schmid U, Heidland A, Stopper H. Rosuvastatin protects against oxidative stress and DNA damage in vitro via upregulation of glutathione synthesis. *Atherosclerosis*. 2008;199(2):278-87.
73. Collins AR. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2014;1840(2):794-800.
74. Abdoli N, Azarmi Y, Eghbal M. Mitigation of statins-induced cytotoxicity and mitochondrial dysfunction by L-carnitine in freshly-isolated rat hepatocytes. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2015;10(2):143.
75. Qi X-F, Kim D-H, Yoon Y-S, Kim S-K, Cai D-Q, Teng Y-C, et al. Involvement of oxidative stress in simvastatin-induced apoptosis of murine CT26 colon carcinoma cells. *Toxicology letters*. 2010;199(3):277-87.

76. Gharsalli T. Comet assay on toxicogenetics; several studies in recent years on several genotoxicological agents. *J Environ Anal Toxicol*. 2016;6:418.
77. Damrot J, Nübel T, Epe B, Roos W, Kaina B, Fritz G. Lovastatin protects human endothelial cells from the genotoxic and cytotoxic effects of the anticancer drugs doxorubicin and etoposide. *British journal of pharmacology*. 2006;149(8):988-97.
78. Dinçel GÇ, Oguz K. Patolojik apoptozis ve tanı yöntemleri. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2016;5(1):86-108.
79. Madeo F, Fröhlich E, Fröhlich K-U. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *The Journal of cell biology*. 1997;139(3):729-34.
80. Suraweera CD, Banjara S, Hinds MG, Kvensakul M. Metazoans and intrinsic apoptosis: an evolutionary analysis of the Bcl-2 family. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(7):3691.
81. Wood WG, Igbavboa U, Muller WE, Eckert GP. Statins, Bcl-2, and apoptosis: cell death or cell protection? *Molecular neurobiology*. 2013;48:308-14.
82. Agena R, de Jesús Cortés-Sánchez A, Hernández-Sánchez H, Jaramillo-Flores ME. Pro-apoptotic activity of bioactive compounds from seaweeds: promising sources for developing novel anticancer drugs. *Marine Drugs*. 2023;21(3):182.
83. Hwang K-E, Kwon S-J, Kim Y-S, Park D-S, Kim B-R, Yoon K-H, et al. Effect of simvastatin on the resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in a non-small cell lung cancer with the T790M mutation of EGFR. *Experimental cell research*. 2014;323(2):288-96.
84. Mahib MR, Hosojima S, Kushiyaama H, Kinoshita T, Shiroishi T, Suda T, et al. Caspase-7 mediates caspase-1-induced apoptosis independently of Bid. *Microbiology and Immunology*. 2020;64(2):143-52.
85. Chota A, George BP, Abrahamse H. Interactions of multidomain pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins in cancer cell death. *Oncotarget*. 2021;12(16):1615.
86. Zheng M, Karki R, Vogel P, Kanneganti T-D. Caspase-6 is a key regulator of innate immunity, inflammasome activation, and host defense. *Cell*. 2020;181(3):674-87. e13.
87. Lamkanfi M, Kanneganti T-D. Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2010;42(1):21-4.
88. Shoshan-Barmatz V, Arif T, Shteinfer-Kuzmine A. Apoptotic proteins with non-apoptotic activity: expression and function in cancer. *Apoptosis*. 2023;28(5-6):730-53.
89. Chan P, Shao L, Tomlinson B, Zhang Y, Liu Z-M. An evaluation of pitavastatin for the treatment of hypercholesterolemia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2019;20(1):103-13.
90. Yee LL, Wright EA. Pitavastatin calcium: clinical review of a new antihyperlipidemic medication. *Clinical therapeutics*. 2011;33(8):1023-42.

91. Hayashi T, Yokote K, Saito Y, Iguchi A. Pitavastatin: efficacy and safety in intensive lipid lowering. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2007;8(14):2315-27.
92. Santa Cruz Biotechnology. Pitavastatin Calcium (CAS 147526-32-7) [Internet]. 2023 [Erişim Tarihi 18 Ekim 2023]. Erişim adresi: <https://www.scbt.com/p/pitavastatin-calcium-147526-32-7>.
93. Sahebkar A, Kiaie N, Gorabi AM, Mannarino MR, Bianconi V, Jamialahmadi T, et al. A comprehensive review on the lipid and pleiotropic effects of pitavastatin. *Progress in Lipid Research*. 2021;84:101127.
94. Tiliya Pun N, Lee N, Song S-H, Jeong C-H. Pitavastatin Induces Cancer Cell Apoptosis by Blocking Autophagy Flux. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13:854506.
95. Bhatti H, Tadi P. Pitavastatin. 2020.
96. Saito Y. Pitavastatin: an overview. *Atherosclerosis Supplements*. 2011;12(3):271-6.
97. 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.
98. 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.
99. da Silva PM. Are all statins the same? Focus on the efficacy and tolerability of pitavastatin. *American Journal of Cardiovascular Drugs*. 2011;11:93-107.
100. Nagayama D, Saiki A, Shirai K. The Anti-Cancer Effect of Pitavastatin May Be a Drug-Specific Effect: Subgroup Analysis of the TOHO-LIP Study. *Vascular health and risk management*. 2021:169-73.
101. Chen Y-H, Chen Y-C, Lin C-C, Hsieh Y-P, Hsu C-S, Hsieh M-C. Synergistic anticancer effects of gemcitabine with pitavastatin on pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2 in vitro and in vivo. *Cancer management and research*. 2020:4645-65.
102. Hu T, Shen H, Huang H, Yang Z, Zhou Y, Zhao G. Cholesterol-lowering drug pitavastatin targets lung cancer and angiogenesis via suppressing prenylation-dependent Ras/Raf/MEK and PI3K/Akt/mTOR signaling. *Anti-Cancer Drugs*. 2020;31(4):377-84.
103. Landry JJ, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stütz AM, et al. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2013;3(8):1213-24.
104. ATCC. HeLa [Internet]. 2022 [Erişim Tarihi 10 Eylül 2023]. Erişim adresi: <https://www.atcc.org/products/ccl-2>.
105. Araldi RP, de Melo TC, Mendes TB, de Sá Júnior PL, Nozima BHN, Ito ET, et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2015;72:74-82.

106. Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Flow cytometry-based apoptosis detection. *Apoptosis: methods and protocols*, Second Edition. 2009:19-32.
107. Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2011;20(3):145-58.
108. Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E, editors. *Apoptosis and necrosis: different execution of the same death*. Biochemical Society Symposia; 1999: Portland Press Limited.
109. Oancea M, Mazumder S, Crosby ME, Almasan A. Apoptosis assays. *Cardiovascular Disease: Methods and Protocols Volume 2: Molecular Medicine*. 2007:279-90.
110. Güleş Ö, Ülker E. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2008;19(2):73-8.
111. Worsley CM, Veale RB, Mayne ES. Inducing apoptosis using chemical treatment and acidic pH, and detecting it using the Annexin V flow cytometric assay. *Plos one*. 2022;17(6):e0270599.
112. Leite M, Quinta-Costa M, Leite PS, Guimarães JE. Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death—study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL60. *Analytical Cellular Pathology*. 1999;19:139-51.
113. Wu Y, Zhao D, Zhuang J, Zhang F, Xu C. Caspase-8 and caspase-9 functioned differently at different stages of the cyclic stretch-induced apoptosis in human periodontal ligament cells. *PLoS One*. 2016;11(12):e0168268.
114. Mirzayans R, Murray D. Do TUNEL and other apoptosis assays detect cell death in preclinical studies? *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(23):9090.
115. Yazıcı M, Yardımcı RE. Akım Sitometri ve Su Ürünleri Uygulamaları. *Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research* 2015;2(4):159-75.
116. Robinson JP. Flow cytometry: past and future. *BioTechniques*. 2022;72(4):159-69.
117. Sewell WA, Smith SA. Polychromatic flow cytometry in the clinical laboratory. *Pathology*. 2011;43(6):580-91.
118. Nolan JP, Condello D. Spectral flow cytometry. *Current protocols in cytometry*. 2013;63(1):1.27. 1-1.. 13.
119. Das S, Shibib DR, Vernon MO. The new frontier of diagnostics: molecular assays and their role in infection prevention and control. *American journal of infection control*. 2017;45(2):158-69.
120. Harshitha R, Arunraj DR. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2021;49(5):800-12.
121. Okutucu B, Pehlivan S. Reverz-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2003;12(2).

122. Çetinkaya E, Ayhan K. Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler. *Karaelmas Fen Ve Mühendislik Dergisi*. 2012;2(1):53-62.
123. Jin S, Kennedy RT. New developments in Western blot technology. *Chinese Chemical Letters*. 2015;26(4):416-8.
124. Mahmood T, Yang P-C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*. 2012;4(9):429.
125. Meftahi GH, Bahari Z, Zarei Mahmoudabadi A, Iman M, Jangravi Z. Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2021;49(4):509-17.
126. Şekeroğlu ZA, Şekeroğlu V. Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi*. 2011;4(3):221-9.
127. Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M. Micronucleus assay: The state of art, and future directions. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(4):1534.
128. David R. The promise of toxicogenomics for genetic toxicology: past, present and future. *Mutagenesis*. 2020;35(2):153-9.
129. Vijay U, Gupta S, Mathur P, Suravajhala P, Bhatnagar P. Microbial mutagenicity assay: Ames test. *Bio-protocol*. 2018;8(6):e2763-e.
130. Turkez H, Arslan ME, Ozdemir O. Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2017;13(10):1089-98.
131. Şekeroğlu ZA, Şekeroğlu V, Kolören Z. The in vitro alkaline comet assay in genetic toxicology. *Journal of Applied Biological Sciences*. 2011;5(1):49-54.
132. Kašuba V, Tariba Lovaković B, Lucić Vrdoljak A, Katić A, Kopjar N, Micek V, et al. Evaluation of toxic effects induced by sub-acute exposure to low doses of α -cypermethrin in adult male rats. *Toxics*. 2022;10(12):717.
133. Lorenzo Y, Costa S, Collins AR, Azqueta A. The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis*. 2013;28(4):427-32.
134. Collins A, Dušinská M, Franklin M, Somorovská M, Petrovská H, Duthie S, et al. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and molecular mutagenesis*. 1997;30(2):139-46.
135. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1984;123(1):291-8.
136. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*. 1988;175(1):184-91.
137. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2000;35(3):206-21.

138. Durmaz A, Dikmen N, Gündüz C. DNA Hasar Analizinde Tek Hücre Jel Elektroforezi (Komet Yöntemi). *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2010;19(4):236-43.
139. Tutty MA, Vella G, Vennemann A, Wiemann M, Prina-Mello A. Evaluating nanobiomaterial-induced DNA strand breaks using the alkaline comet assay. *Drug Delivery and Translational Research*. 2022;12(9):2243-58.
140. Azqueta A, Meier S, Priestley C, Gutzkow KB, Brunborg G, Sallette J, et al. The influence of scoring method on variability in results obtained with the comet assay. *Mutagenesis*. 2011;26(3):393-9.
141. Muruzabal D, Collins A, Azqueta A. The enzyme-modified comet assay: Past, present and future. *Food and Chemical Toxicology*. 2021;147:111865.
142. Azqueta A, Collins AR. The comet assay: High throughput use of FPG. *Genotoxicity and DNA Repair: A Practical Approach*. 2014:199-217.
143. Hannon-Fletcher MP, Moffitt T, Garrett PJ. Oxidative DNA Damage Is Reduced Following a Novel 3-Month Supplementation Intervention in Hemodialysis Patients. *Journal of Biomedical Science and Research*. 2021;3(2):1-5.
144. Collins A, Vettorazzi A, Azqueta A. The role of the enzyme-modified comet assay in in vivo studies. *Toxicology Letters*. 2020;327:58-68.
145. Basu P, Mittal S, Vale DB, Kharaji YC. Secondary prevention of cervical cancer. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2018;47:73-85.
146. Sidhu H, Capalash N. Synergistic anti-cancer action of salicylic acid and cisplatin on HeLa cells elucidated by network pharmacology and in vitro analysis. *Life Sciences*. 2021;282:119802.
147. 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.
148. Nunes M, Duarte D, Vale N, Ricardo S. The Antineoplastic Effect of Carboplatin Is Potentiated by Combination with Pitavastatin or Metformin in a Chemoresistant High-Grade Serous Carcinoma Cell Line. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;24(1):97.
149. Tong L, Chuang C-C, Wu S, Zuo L. Reactive oxygen species in redox cancer therapy. *Cancer letters*. 2015;367(1):18-25.
150. Altwairgi AK. Statins are potential anticancerous agents. *Oncology reports*. 2015;33(3):1019-39.
151. Borgquist S, Bjarnadottir O, Kimbung S, Ahern T. Statins: a role in breast cancer therapy? *Journal of internal medicine*. 2018;284(4):346-57.
152. Jiang W, Hu J-W, He X-R, Jin W-L, He X-Y. Statins: A repurposed drug to fight cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2021;40(1):1-33.

153. Li YC, Park MJ, Ye S-K, Kim C-W, Kim Y-N. Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *The American journal of pathology*. 2006;168(4):1107-18.
154. 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):508-19.
155. Sadeghi-Aliabadi H, Minaiyan M, Dabestan A. Cytotoxic evaluation of doxorubicin in combination with simvastatin against human cancer cells. *Research in pharmaceutical sciences*. 2010;5(2):127.
156. 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. 2010.
157. Şencan S, Onaran İ, Demirtaş H. Warfarin'in Sitotoksik Etkisinin K562 Lösemik Hücre Soyunda Çalışılması. *Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2007;16(1):11-7.
158. Ündeğer Ü, Başaran A, Degen G, Başaran N. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food and chemical toxicology*. 2009;47(8):2037-43.
159. Gajski G, Garaj-Vrhovac V, Oreščanin V. Cytogenetic status and oxidative DNA-damage induced by atorvastatin in human peripheral blood lymphocytes: standard and Fpg-modified comet assay. *Toxicology and applied pharmacology*. 2008;231(1):85-93.
160. Gajski G, Garaj-Vrhovac V. Application of cytogenetic endpoints and comet assay on human lymphocytes treated with atorvastatin in vitro. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 2007;43(1):78-85.
161. Martirosyan A, Clendening JW, Goard CA, Penn LZ. Lovastatin induces apoptosis of ovarian cancer cells and synergizes with doxorubicin: potential therapeutic relevance. *BMC cancer*. 2010;10:1-13.
162. 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.
163. Kamigaki M, Sasaki T, Serikawa M, Inoue M, Kobayashi K, Itsuki H, et al. Statins induce apoptosis and inhibit proliferation in cholangiocarcinoma cells. *International journal of oncology*. 2011;39(3):561-8.
164. Khin PP, Po WW, Thein W, Sohn UD. Apoptotic effect of fluoxetine through the endoplasmic reticulum stress pathway in the human gastric cancer cell line AGS. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2020;393(4):537-49.

165. Chaitanya GV, Alexander JS, Babu PP. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling*. 2010;8:1-11.
166. Qi X, Zheng L, Lee K, Kim D, Kim C, Cai D, et al. HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis of lymphoma cells by promoting ROS generation and regulating Akt, Erk and p38 signals via suppression of mevalonate pathway. *Cell death & disease*. 2013;4(2):e518-e.
167. Voss L, Guttek K, Reddig A, Reinhold A, Voss M, Simeoni L, et al. Pitavastatin is a highly potent inhibitor of T-cell proliferation. *Pharmaceuticals*. 2021;14(8):727.
168. Alizadeh J, Zeki AA, Mirzaei N, Tewary S, Rezaei Moghadam A, Glogowska A, et al. Mevalonate cascade inhibition by simvastatin induces the intrinsic apoptosis pathway via depletion of isoprenoids in tumor cells. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-14.
169. Kaushik S, Tomar A, Puthanmadhom Narayanan S, Nag TC, Arya DS, Bhatia J. Pitavastatin attenuates cisplatin-induced renal injury by targeting MAPK and apoptotic pathways. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2019;71(7):1072-81.
170. Piktel D, Moore JC, Nesbit S, Sprowls SA, Craig MD, Rellick SL, et al. Chemotherapeutic Activity of Pitavastatin in Vincristine Resistant B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers*. 2023;15(3):707.
171. Kabel AM. Statins: a new hope for cancer therapy. *J Cancer Res Treat*. 2013;2:36-8.

8. EKLER

EK-1.Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Aysun Okcesiz
Ödev başlığı: PİTAVASTATİNİN SİSPLATİN İLE BİRLİKTE ANTİKANSEROJEN E...
Gönderi Başlığı: PİTAVASTATİNİN SİSPLATİN İLE BİRLİKTE ANTİKANSEROJEN E...
Dosya adı: Aysun_K_ES_Z_HACISEY_TO_LU_turnitin.docx
Dosya boyutu: 4.62M
Sayfa sayısı: 100
Kelime sayısı: 18,488
Karakter sayısı: 131,863
Gönderim Tarihi: 15-Oca-2024 01:40ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2252336227



EK-2. Orjinallik Ekran Çıktısı

TEZİN TAM BAŞLIĞI: PİTAVASTATİNİN SİSPLATİN İLE BİRLİKTE
ANTİKANSEROJEN ETKİLERİNİN İNSAN SERVİKS KANSER
HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI
ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: AYSUN ÖKÇESİZ HACİSEYİTOĞLU
DOSYANIN TOPLAM SAYFASI: 100

PİTAVASTATİNİN SİSPLATİN İLE BİRLİKTE ANTİKANSEROJEN ETKİLERİNİN İNSAN SERVİKS KANSER HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLIK RAPORU

% 16	% 15	% 1	% 5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 7
2	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 2
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
4	discovery.researcher.life İnternet Kaynağı	<% 1
5	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<% 1
6	Submitted to Cumhuriyet University Öğrenci Ödevi	<% 1
7	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	Akay, Metin, Duong Nguyen, Yantao Fan, and Yasemin Akay. "Engineering a Three-Dimensional In Vitro Drug Testing Platform	<% 1

9. ÖZGEÇMİŞ