



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

**DOKTORA
TEZİ**

**FARE OVER KANSER HÜCRELERİNDE KARBOPLATİN
VE PAKLİTAKSEL'İN SİRKADİYEN RİTME BAĞLI
OLARAK *İN VİTRO* VE
İN VİVO ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

YAĞMUR SOYKAN

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

TEMMUZ 2025



**FARE OVER KANSER HÜCRELERİNDE KARBOPLATİN VE
PAKLİTAKSEL'İN SİRKADİYEN RİTME BAĞLI OLARAK *İN VİTRO* VE
İN VİVO ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Yağmur SOYKAN

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2025

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Yağmur SOYKAN

17/07/2025

FARE OVER KANSER HÜCRELERİNDE KARBOPLATİN VE PAKLİTAKSEL’İN
SİRKADİYEN RİTME BAĞLI OLARAK *İN VİTRO* VE
İN VİVO ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

(Doktora Tezi)

Yağmur SOYKAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2025

ÖZET

Over kanseri, kadınlarda jinekolojik kanserlere bağlı ölümlerin ikinci sık nedenidir. Sıklıkla geç dönemde belirti verdiği için hastaların %70-80’i ileri evrede yakalanmaktadır. Over kanseri tedavisinin temel bileşenleri sitoredüktif cerrahi ve adjuvan kemoterapidir. Cerrahi ve adjuvan kemoterapiye rağmen, erken evre hastalıklarda vakaların yaklaşık %25’inde, daha ileri evrelerde ise %80’den fazlasında nüks görülmektedir. Over kanseri kemoterapisi için birinci basamak tedavi platin ve taksan kombinasyonudur. Sirkadiyen ritim, bedensel işlevlerin 24 saatlik uyku uyanıklık döngü süreciyle uyumlu olduğu ve sirkadiyen saat proteini/geni tarafından kontrol edildiği doğal bir biyolojik süreçtir. Sirkadiyen ritim, beyinin ön hipotalamusunda bulunan suprakiazmatik çekirdek (SCN) tarafından kontrol edilen biyolojik saattir. Hücre döngüsü, DNA hasarına cevap ve tümör baskılanması gibi önemli biyolojik yollar sirkadiyen ritmin kontrolü altındadır. Kemoterapötik ajanlar, hem sağlıklı hem de kanser hücrelerinde DNA hasarına yol açarak, DNA onarım mekanizmalarının aktive olmasına neden olur. Kronoterapi ise bireyin sirkadiyen ritmine göre belirli zaman aralıklarında uygulanan bir terapi türüdür. Amaç en az yan etkiyle maksimum yanıt elde etmektir. Bu tez çalışmasında amacımız sirkadiyen ritme göre farklı zaman dilimlerinde karboplatin ve paklitaksel uygulamasının hücre ölümünü artırıcı etkisini fare over kanser hücrelerinde (ID8) *in vitro* ve fare ID8 hücreleriyle oluşturulacak olan deneysel over kanser modelinde *in vivo* şartlarda oluşup oluşmadığını belirlemektir. Sonuç olarak over kanseri tedavisinde karboplatin’in paklitaksel uygulamasına kıyasla daha etkin olduğu, bu etkinin sirkadiyen ritm gözetilerek yapılan uygulamada daha belirgin gözlemlendiği dikkati çekmiştir. Her iki ajanın birlikte uygulandığı gruplarda ise sirkadiyen ritm uygulamasının, göz ardı edilen gruba karşın çok etkili olmadığı, sirkadiyen ritm gözetilerek yapılan ikili tedavide paklitaksel baskın etkinin gözlemlendiği dikkati çekmiştir. Bu bulgular ışığında yapılan çalışmada en etkili uygulamanın sirkadiyen ritm gözetilerek karboplatin tedavisi olduğu kanısına varılmıştır. Bu nedenle sirkadiyen ritim, tedavi etkinliği artırmak ve istenmeyen yan etkileri azaltmak açısından dikkate alınmalıdır. Bu bulgular, kanser tedavisinde bireyselleştirilmiş ve zamanlama odaklı yaklaşımların geliştirilmesi için bir temel oluşturulabilir.

Bilim Kodu : 1091

Anahtar Kelimeler : Over Kanseri, Sirkadiyen Ritim, Karboplatin, Paklitaksel

Sayfa Adedi : 65

Danışman : Prof. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM

DETERMINATION OF IN VITRO AND IN VIVO EFFECTS OF CARBOPLATIN AND
PACLITAXEL IN MOUSE OVARIAN CANCER CELLS IN RELATION TO
CIRCADIAN RHYTHM

(Ph D. Thesis)

Yağmur SOYKAN

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

July 2025

ABSTRACT

Ovarian cancer is the second most common cause of death among gynecological cancers in women. Due to its asymptomatic nature in the early stages, 70-80% of patients are diagnosed at an advanced stage of the disease. The primary modalities for treating ovarian cancer include cytoreductive surgery and adjuvant chemotherapy. Notably, despite the implementation of surgical interventions and adjuvant chemotherapy, recurrence rates remain approximately 25% for early-stage cases and exceed 80% consisting of a combination of platinum-based agents and taxanes. Circadian rhythm is a natural biological process that synchronizes physiological functions with the 24-hour sleep-wake cycle, regulated by circadian clock proteins and genes. The circadian rhythm functions as a biological clock, governed by the suprachiasmatic nucleus (SCN), which is located in the anterior hypothalamus. Critical biological pathways such as the cell cycle, DNA damage response, and tumor suppression are regulated by circadian timing. Chemotherapeutic agents induce DNA damage in both healthy and cancerous cells, thereby triggering the activation of DNA repair mechanisms. Chronotherapy emerges as an innovative approach that involves administering treatment at specific intervals, aligned with an individual's circadian rhythm, to maximize therapeutic efficacy while minimizing adverse effects. In this thesis, our aim is to demonstrate the effect of carboplatin and paclitaxel administration at different time points according to the circadian rhythm to increase cell death in mouse ovarian cancer cells (ID8) *in vitro* and *in vivo* conditions in an experimental ovarian cancer model to be established with mouse ID8 cells. Results indicated that carboplatin was more effective than paclitaxel in the treatment of ovarian cancer, with this efficacy being further enhanced when the circadian rhythm was respected. In groups receiving both chemotherapeutic agents concurrently, the application of the circadian rhythm demonstrated limited effectiveness compared to groups where the circadian rhythm was not accounted for. Furthermore, paclitaxel exhibited a dominant effect in the dual treatment approach, considering the circadian rhythm. Based on these findings, it can be concluded that the most effective therapeutic strategy, within the context of this study, involved the administration of carboplatin while adhering the circadian rhythm. Therefore, it is imperative to consider circadian rhythms to enhance treatment efficacy and reduce adverse effects. These findings may inform the development of personalized and time-sensitive strategies in oncological treatment.

Science Code : 1091

Key Words : Ovarian Cancer, Circadian Rhythm, Carboplatin, Paclitaxel

Page Number : 65

Supervisor : Prof. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM

TEŞEKKÜR

Bu uzun ve meşakkatli doktora yolculuğumda, engin bilgi birikimi ve kıymetli tecrübeleriyle sadece yolumu aydınlatmakla kalmayıp, sabrı, anlayışı, teşvik edici yaklaşımı ve yapıcı eleştirileriyle her daim yanımda olan; bilimsel düşünme ve araştırma becerilerimin gelişmesinde, akademik kimliğimin şekillenmesinde ve bir araştırmacı olarak yetişmemde pusula görevi gören çok kıymetli danışmanım Sayın Prof. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM'a en derin saygı, sevgi ve minnetlerimi sunarım. Kendisinin sadece akademik rehberliği değil, aynı zamanda gösterdiği insani yakınlık ve destek, bu zorlu süreci başarıyla tamamlamamda en büyük etkenlerden biri olmuştur. Her bir katkısı için sonsuz teşekkürler.

Doktora eğitimim süresince bilgi, deneyim ve desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalımızın kıymetli öğretim üyelerine,

Gerek Kadın Hastalıkları ve Doğum uzmanlık eğitimim, gerekse Jinekolojik Onkoloji yan dal uzmanlık eğitimim sürecinde akademik rehberliği ve hekimlik vizyonu ile bana yol gösteren; her aşamada desteğini esirgemeyen değerli hocam Jinekolojik Onkoloji Bilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Mehmet Anıl ONAN'a,

Doktora yeterlilik sürecimde bilgi ve deneyimiyle bana yol gösteren, her zaman yapıcı yaklaşımı ve teşvik edici tutumuyla yanımda olan, akademik yolculuğumda bana kattıkları ve verdiği destek için Adli Tıp Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Taner AKAR'a,

Tezimin her aşamasında içtenlikle destek olan, tez sürecimi kolaylaştıran Dr. Öğr. Üyesi Duygu Deniz USTA'ya ve tez sürecim boyunca her zaman yanımda olan, teknik desteğini ve bilgisini hiçbir zaman esirgemeyen Öğr. Gör. Dr. Muhammed OCAK'a,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi, bu zorlu eğitim ve mesleki hayat maratonumda da varlıklarıyla bana güç veren, koşulsuz sevgi, destek ve sabırlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen, her daim en büyük dayanağım olan canım aileme yürekten teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, TDK-2021-7309 proje kodu ile Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından desteklenmiş olup, desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.2.1. FIGO evrelemesi 2014	5
2.3. Kemoterapi	7
2.3.1. Karboplatin.....	8
2.3.2. Paklitaksel	9
2.4. Sirkadiyen Ritim	9
2.5. Kronokemoterapi.....	11
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	15
3.1. Kullanılan Gereçler.....	15
3.1.1. Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler	15
3.1.2. Kullanılan kitler ve hücre hattı.....	16
3.1.3. Kullanılan kimyasallar	16
3.1.4. Kullanılan besiyeri ve çözeltilerin hazırlanışı.....	17
3.2. Metod ve Yöntemler	18

	Sayfa
3.2.1. <i>In vitro</i> deneyler	18
3.2.2. <i>In vivo</i> deneyler	20
4. BULGULAR	29
4.1. Karboplatin ve Paklitaksel'in Hücre Canlılığına Etkisi	29
4.2. Paklitaksel ve Karboplatin'in Sitotoksosite Üzerine Etkisi	30
4.3. Vücut Ağırlıkları ve Tümör Hacimlerinin Değerlendirilmesi	30
4.4. Tümör Dokularında Paklitaksel ve Karboplatin'in Kaspaz-3/7 Seviyelerine <i>In Vivo</i> Etkisi	33
4.5. Hematoksilen - Eozin Sonuçları.....	34
4.6. Paklitaksel ve Karboplatin'in Apoptoz ve Sirkadiyen Ritm ile İlişkili Genlerin <i>In vivo</i> mRNA Seviyelerine Etkisi	37
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	49
EKLER.....	59
EK-1. Etik Kurul Onayı	60
ÖZGEÇMİŞ	62

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Epitelyal over kanserleri histopatolojik tipleri ve görülme oranları.....	4
Çizelge 2.2. Farklı kanserlerde ifade düzeyleri bozulan sirkadiyen genler	10
Çizelge 3.1. 96 kuyulu kültür kabı için Kaspaz-3/7 substrast solüsyonu hazırlanması	24
Çizelge 3.2. Gen spesifik qPCR primer dizileri.....	26
Çizelge 3.3. Actb, Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bak, Casp3, Per1, Per2, Clock, Bmal1, Cry1 ve Cry2 gen ifade düzeylerinin belirlenmesi için Real-time PCR tepkime karışımı	27
Çizelge 3.4. PCR amplifikasyon programı	27

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. 5-100 μ M Karboplatin (a), 1-100 μ M Paklitaksel uygulanmış ID8 hücrelerinin (b) 24 ve 48 saatlerde hücre canlılığı. 24 ve 48. saatlerde Karboplatin ve Paklitaksel kombinasyonunun (c) seçilen konsantrasyonlarının ID8 hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	29
Şekil 4.2. Karboplatin ve/veya Paklitaksel'in ID8 hücrelerinde LDH salınımı ile belirlenen sitotoksisite üzerindeki etkisi.	30
Şekil 4.3. Paklitaksel ve/veya Karboplatin'in C57BL/6 farelerinde haftada bir kez ölçülen vücut ağırlıkları (A) ve tümör hacimleri (B) üzerindeki etkileri.	32
Şekil 4.4. Paklitaksel ve/veya Karboplatin'in tümör dokularındaki kaspaz-3/7 aktivite seviyeleri üzerindeki etkileri.	33
Şekil 4.5. Karboplatin ve/veya Paklitaksel 'in apoptoz ve sirkadiyen ritm ile ilişkili mRNA ifade düzeyleri üzerindeki etkileri.	38

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. ID8 hücrelerinin morfolojik görüntüsü	14
Resim 3.1. Sirkadiyen ritmi korunmuş ve sirkadiyen ritmi değiştirilmiş C57BL/6 farelerin deneysel barınma koşullarının fotoğrafları	21
Resim 4.1. ID8 hücresi taşıyan C57BL/6 farelerin temsili fotoğrafı	31
Resim 4.2. (A) Deneysel kanser modeli oluşturulan sham kontrol grubu.	34
Resim 4.3. (A) Deneysel kanser modelinde Paklitaksel uygulanan grup.	35
Resim 4.4. (A) Deneysel kanser modelinde Karboplatin uygulanan grup.	36
Resim 4.5. (A) Deneysel kanser modelinde paklitaksel ve karboplatinin birlikte uygulandığı grup	37

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
µm	Mikrometre
cm	Santimetre
CO ₂	Karbondiyoksit
dk	Dakika
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
°C	Santigrat
rpm	Dakikada Devir

Kısaltmalar	Açıklamalar
BCA	Bikinkoninik Asit
BSA	Bovine Serum Albumin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleozid Trifosfat
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FBS	Fetal Bovine Serum
FIGO	International Federation of Gynecologist and Obstetrics
GAPDH	Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz
HCL	Hidroklörik Asit
IC ₅₀	Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyonu
İ.P.	İntraperitoneal

Kısaltmalar**Açıklamalar****LDH**

Laktat Dehidrojenaz

MTT

3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür

PBS

Phosphate Buffer Saline

pH

Asitlik Bazlık Değeri

PMSF

Fenilmetilsülfonilflorid

RIPA

Radioimmunoprecipitation Assay

RNA

Ribonükleik Asit

1. GİRİŞ

Over kanseri, kadın üreme organı olan over dokusundaki hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasıyla ortaya çıkan malign bir hastalıktır. 5 yıllık sağkalım oranı %50 den az olup [1], bu yüksek mortalitenin nedeni etkin bir tarama yönteminin olmaması ve hastaların tanı anında %70-80 ileri evrede olmasıdır [2]. Over kanserinde primer tedavi sitoredüktif cerrahidir [3]. Erken evredeki bazı olgular hariç (evre 1a, grad1, grad2) tüm hastalara kemoterapi uygulanır [4]. Adjuvan ve neoadjuvan kemoterapide karboplatin ve paklitaksel kombinasyon tedavisi uygulanmaktadır. Kullanılan standart adjuvan kemoterapi rejimi 3-6 kür karboplatin+paklitaksel tedavisidir [5]. Kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan kemoterapi ilaçları, kanser hücrelerinin DNA'sına hasar vererek kanser hücrelerini yok etmeye çalışır ancak bu tip ilaçlar sağlıklı hücrelere de zarar verir [6].

Karboplatin, platin grubu bir kemoterapi ilacıdır. Alkilleyici kanser ilaçları sınıfındandır. DNA baz çiftlerinin alkil gruplarına tutunarak, DNA atomları arasında çapraz bağ oluşturarak ya da yanlış nükleotid eklenmesi sonucu mutasyonlara neden olarak DNA replikasyonunu engeller. Sisplatinden daha az toksisiteye sahiptir. Özellikle bulantı ve kusma gibi gastrointestinal yan etkiler görülmektedir. Nefrotoksisite, nörotoksisite ve ototoksisite ise belirgin olarak daha az görülmektedir. Kansere karşı oldukça etkili olan fakat yan etkileri nedeniyle kullanım sınırlılıkları bulunan karboplatin kemoterapisinin yan etkilerini düşürmeye yönelik stratejiler geliştirmeye yoğunlaşmaktadır.

Paklitaksel ise taksol grubu bir ilaçtır. Mikrotübülleri stabilize eder ve polimerizasyonunu artırırken, depolimerizasyonunu engeller. Bu durum mitozun düzgün bir şekilde ilerlemesini engeller ve hücrelerin bölünmesini durdurur. Major yan etkileri kemik iliği supresyonu, gastrointestinal sistem semptomları ve alopesidir.

Sirkadiyen ritim; 24 saatlik periyotta vücutta ritmik olarak meydana gelen tüm fizyolojik, kimyasal ve moleküler olayları kapsayan günlük biyolojik ritimdir [7]. Sirkadiyen zamanlama sistemi, hücre bölünme zamanını, DNA tamirini ve hücrenin intiharı ile ölümünü sağlayan apoptozu düzenlerken aynı zamanda kanser gelişiminde rol oynayan metabolik yollar ve işlevler üzerinde de etkilidir [8]. Uyku, yeme alışkanlıkları, kalp hızı, vücut ısısı ve hormon üretimi de dahil olmak üzere, zamana bağlı biyolojik fonksiyonlarımızı kontrol eden çeşitli özel "saat-ilişkili" gen vardır [9]. Çeşitli doku ve organlardaki normal hücrelerin

DNA tamirini en yüksek düzeyde nasıl ve ne zaman yaptıklarını bilmek, klinisyenlerin ilaçları uygulamak için en ideal zamanı seçmelerinde yardımcı olabilir.

Kronoterapi, ilaçlardan en üst düzeyde fayda görmek ve yan etkilerini en aza indirmek için tedavinin günün belli saatlerinde uygulanmasıdır [10]. İlaçların biyolojik saate göre hastaya verilmesi yani kronoterapi ile kemoterapinin etkinliğini de zamana göre düzenlenebilmektedir. Buna kronokemoterapi adı verilir. Buna göre hücrelerimizde DNA onarımının zirvede olduğu zaman aralığında hastalara kemoterapi verilmesinin daha yararlı olabileceği düşünülmektedir [11]. Böylece, toksik yan etkileri azaltırken kemoterapinin gücünü kullanmak mümkün olabilecektir. Bu durumda, kemoterapilerde maksimum etki gözlenirken, yan etkiler en aza indirilir [12]. Mayıs 2018'de Profesör Dr. Aziz Sancar ve ekibi tarafından yayınlanan çalışmaya göre, sağlıklı hücrelerde DNA tamir en yoğun olduğu zamanda sisplatin ilacının verilmesi, tedavi sonuçlarını iyileştirebilir; yani sirkadiyen ritme göre tedaviyi düzenlemek, kemoterapinin yan etkilerini azaltabilir [13].

Karboplatin ve paklitaksel kombinasyonunun günümüzde over kanser tedavisinde sirkadiyen ritme bağlı uygulamasına olan etkisini *in vitro* ve *in vivo* şartlarda araştıran bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Tez çalışmamız, kronoterapiyi genetik temeliyle birlikte açıklaması açısından önemlidir. Preklinik tez çalışmamızda öncelikli hedefimiz, sirkadiyen ritme göre farklı zaman dilimlerinde karboplatin ve paklitaksel uygulamasının hücre ölümünü arttırıcı etkisini fare over kanser hücrelerinde (ID8) *in vitro* olarak göstermektir. Bir diğer amacımız da, *in vitro* deneyler sonucu elde edilecek verilerin, fare ID8 hücreleriyle oluşturulacak olan deneysel over kanser modelinde *in vivo* şartlarda da oluşup oluşmadığını belirlemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, vücuttaki hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalması ve bölünmesi ile karakterize edilen, kompleks ve multifaktöriyel bir hastalık grubudur. Normal fizyolojik koşullarda hücre çoğalması, farklılaşması, yaşlanması ve ölümü sıkı bir şekilde genetik ve epigenetik mekanizmalarla düzenlenir [14]. Bu süreçlerin herhangi bir aşamasında meydana gelen bozukluklar, hücrelerin denetimsiz olarak çoğalmasına ve tümör oluşumuna yol açabilir. Tümörler benign (iyi huylu) veya malign (kötü huylu) olabilir; kanser terimi ise yalnızca malign tümörler için kullanılmaktadır. Kanser gelişimi çok aşamalı bir süreçtir ve genellikle hücre döngüsünü düzenleyen genlerde (örneğin, onkogenler ve tümör supresör genler) meydana gelen mutasyonlarla başlar [15]. Kanser hücrelerinde genellikle DNA onarım mekanizmaları bozulmuştur; bu durum, genetik instabiliteye ve yeni mutasyonların birikimine zemin hazırlar [16]. Ayrıca, kanser hücreleri apoptoz (programlı hücre ölümü) gibi hücre kontrol noktalarından kaçarak çoğalmaya devam edebilirler [17]. Kanser oluşumunda genetik faktörlerin yanı sıra, çevresel etmenler (kimyasallar, radyasyon, enfeksiyonlar) ve yaşam tarzı unsurları (sigara, alkol, beslenme, fiziksel aktivite eksikliği) da önemli rol oynar [18].

Klinik açıdan kanserler, bulundukları organa ve köken aldıkları dokuya göre sınıflandırılır. Tümörün yayılım derecesi (lokalize, bölgesel, uzak metastaz) ve histopatolojik özellikleri, hastalığın evrelemesi ve prognoz açısından belirleyicidir. Kanser hücrelerinin en önemli özelliklerinden biri de, metastaz yaparak primer tümör bölgesinden uzak organlara yayılabilesidir. Bu süreçte, tümör hücreleri kan, lenf ve vücut boşlukları yoluyla diğer doku ve organlara ulaşabilirler [19].

Kanser tedavisinde temel yaklaşımlar cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve hedefe yönelik tedavilerden oluşur [20]. Son yıllarda, bağışıklık sistemini güçlendirmeyi amaçlayan immünoterapi uygulamaları da öne çıkmaktadır. Tedavi stratejileri; tümörün tipi, evresi, hastanın genel durumu ve biyolojik özelliklerine göre bireyselleştirilir [21]. Kemoterapi, hızlı çoğalan kanser hücrelerini öldürmeyi hedeflerken, aynı zamanda sağlıklı hücreler üzerinde de toksik etki gösterebilir. Bu nedenle, tedavi etkinliğini artırmak ve yan etkileri azaltmak amacıyla zamanlama ve kişiselleştirilmiş yaklaşımlar giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Günümüzde kanser biyolojisi ve tedavisinde yaşanan ilerlemeler sayesinde,

tanı ve tedavi yöntemleri sürekli olarak gelişmekte ve hastaların yaşam süresi ile kalitesi artırılmaya çalışılmaktadır [22].

2.2. Over Kanseri

Kadın genital sistem kanserleri arasında ölüme en sık neden olan kanser türüdür [23]. Jinekolojik kanserlerin yaklaşık %22 si overyan kökenlidir. Histogenetik sınıflandırma, over kanserlerini çöломik epitelden, germ hücrelerinden ve mezenşimden kaynaklanmalarına göre sınıflandırır [24]. Over kanserinin %85-90 ı epitelyaldir (Çizelge 2.1) [25]. Over kanseri tanısı için rezeke edilen overin histopatolojik incelenmesi gereklidir [26]. Çoğu yüksek dereceli seröz over kanserlerinin overden ziyade fallop tüpünün fimbriyal ucundan kaynaklandığı gösterilmiştir [27]. Over kanserine yol açan faktörleri anlama konusundaki eksikliğimiz ve mortalitede önemli bir azalma sağlayamamamız nedeniyle araştırmalar hızla devam etmektedir.

Çizelge 2.1. Epitelyal over kanserleri histopatolojik tipleri ve görülme oranları

Histopatolojik Tip	Dağılım (%)
Seröz kistadenokarsinom	%42
Müsinöz kistadenokarsinom	%12
Endometrioid karsinom	%15
Berrak hücreli karsinom	%6
İndifferansiye karsinom	%17
Diğer	%8

Over kanserinin yayılımı 4 farklı şekilde olabilir.

a) Transçöломik (eksfoliasyon)

En sık ve en erken yayılım yolu transçöломik yayılımdır. Primer yayılım şeklidir ve eksfoliye olan hücrelerin intraperitoneal kavite yüzeylerine implantasyonu ile meydana gelir.

b) Lenfatik yayılım

İnfindibulopelvik ligament aracılığı ile paraaortik lenf nodlarına yayılım olabileceği gibi, parametrium ve ligamentum latum aracılığı ile laterale doğru eksternal iliak, obtrator ve internal iliak lenf nodlarına da yayılım olabilir. Pelvik ve paraaortik ve yayılım özellikle ileri evre hastalıkta ortaya çıkar. Nadiren round ligament yoluyla inguinal lenf nodlarına hatta

diyafragmanın ve retroperitoneal lenf nodlarının drenajı sonucunda diyafragma seviyesinin üzerinde, özellikle supraclavikular lenf nodlarına yayılım gösterebilir.

c) Direkt yayılım

Over kanserinin hızlı büyümesine bağlı olarak pelvik periton, uterus, rektosigmoid ve tubanın içerisinde yer aldığı komşu yapılara yayılım olabilmektedir. İleri evre tümörlerde asit birikebilir. Bu hem lenf kanallarının obstrüksiyonuna bağlı olarak hem de karsinomatöz sıvı üretimine bağlı olarak gerçekleşebilir. Asitin diyaframı geçmesi ile malign plevral effüzyon da görülebilmektedir.

d) Hematojen yayılım

Hematojen yayılım nadiren gözlenir. Genellikle karaciğer, akciğer, beyin ve böbrekte izlenmektedir. Malign asit, peritoneal karsinomatosis, abdomende metastatik hastalık ve retroperitoneal lenf nodu pozitifliği uzak metastazlar için risk faktörleridir.

Over tümörlerinin evrelemesi cerrahidir. Evrelemede şu anda FIGO 2014 over kanseri evreleme sistemi kullanılmaktadır [28].

2.2.1. FIGO evrelemesi 2014

EVRE I Over veya overlerde sınırlı tümör

IA Tek overde sınırlı tümör; Kapsül intakt, over yüzeyinde tümör yok, malign hücre içeren asit ve/veya yıkama sıvısı yok

IB Her iki overde sınırlı tümör; Kapsül intakt, over yüzeyinde tümör yok, malign hücre içeren asit ve/veya yıkama sıvısı yok

IC Tek veya iki overde sınırlı tümör ve aşağıdakilerden birinin eşlik etmesi

1C1: İntraoperatif cerrahi yayılım

1C2: Cerrahi öncesinde kapsül rüptürünün olması veya over yüzeyinde tümör bulunması

1C3: Asit sıvısında veya peritoneal yıkamalarda malign hücre varlığı

EVREII Pelvik yayılım gösteren tek veya her iki overi içeren tümör

IIA: Uterus ve/veya tubalara yayılım ve/veya implant gösteren tümör

IIB: Diğer pelvik intraperitoneal dokulara yayılım gösteren tümör

EVREIII Pelvis dışında peritoneal yayılımın sitolojik veya histolojik olarak gösterilmiş olduğu ve/veya retroperitoneal lenf nodlarına metastazın olduğu tek veya her iki overi içeren tümör

IIIA: Retroperitoneal lenf nodu metastazı ve/veya mikroskobik ekstrapelvik peritoneal tutulum

IIIA1: Sadece retroperitoneal lenf nodlarının pozitif olması (sitolojik veya histolojik kanıtlanmış)

IIIA1(i): Metastaz boyutu ≤ 10 mm

IIIA (ii): Metastaz boyutu > 10 mm

IIIA2: Retroperitoneal lenf nodu metastazı ile birlikte veya tek başına mikroskobik ekstrapelvik peritoneal tutulumu

IIIB: Retroperitoneal lenf nodu metastazı ile birlikte veya tek başına ≤ 2 cm boyutunda makroskobik ekstrapelvik peritoneal metastaz

IIIC: Retroperitoneal lenf nodu metastazı ile birlikte veya tek başına > 2 cm boyutunda makroskobik ekstrapelvik peritoneal metastaz (Karaciğer/dalak kapsül tutulumunu içerir)

EVRE IV: Peritoneal metastazlar dışındaki uzak metastazlar

IVA: Sitoloji pozitifliği olan plevral effüzyon

IVB: Abdominal kavite dışındaki lenf nodları ve inguinal lenf nodları tutulumu da dahil olmak üzere ekstraabdominal organ metastazları (Karaciğer/dalak parankim metastazını içerir).

Epitelyal over tümörlerinin tedavisi

İleri evre over kanseri tespit edilen ve medikal açıdan stabil olan hastalarda primer tümör ve ilişkili metastazın eksize edildiği cerrahiye debulking cerrahi (sitoredüktif cerrahi) denir [29]. Over kanserinde sitoredüktif cerrahi tipik olarak total abdominal histerektomi ve bilateral salpingooferektomi, total omentektomi, peritoneal yüzey ve bağırsaklardaki tüm metastatik lezyonların eksizyonunu kapsamaktadır [30]. Tüm metastazların cerrahi olarak çıkarılması mümkün değilse her tümör nodülünü optimal düzeye getirecek şekilde rezeke ederek tümör yükünü azaltmak hedeflenmektedir [31]. Sitoredüktif cerrahi, tümör perfüzyonu ve büyüme fraksiyonunun artması sayesinde kemoterapi ve radyoterapiye yanıtı artırmaktadır. Adjuvan veya neoadjuvan tedavide karboplatin+ paklitaksel kombine kemoterapi önerilmektedir [32]. Önemli medikal komorbiditesi olan hastalarda tek ajan karboplatin tercih edilebilir [33].

2.3. Kemoterapi

Kemoterapi, hücre bölünmesini engellemek ve DNA hasarını tetiklemek için spesifik olmayan sitotoksik hücre içi ajanlar kullanan ve apoptoz başlatıldığında hücre ölümüne yol açabilen bir tür kanser tedavisidir [34]. Kanser hücrelerinin bu ajanlara karşı duyarlılığı büyük ölçüde farklılık gösterir ve bu nedenle kanser histotipi ve biyolojisine bağlı olarak farklı ajanlar kullanılır. Over kanseri tedavisinde kemoterapi, sitoredüktif cerrahi sonrası uygulanan standart bir yaklaşımdır ve hastalığın prognozunu iyileştirmede temel rol oynamaktadır [35]. Klinik uygulamada, platin bazlı ajanlar (karboplatin veya sisplatin) ile taksan grubu ilaçların (paklitaksel veya dosetaksel) kombinasyonu, birinci basamak kemoterapinin temelini oluşturur [36]. Özellikle ileri evre hastalarda bu kombinasyon, progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalım oranlarını artırmakta olup, tekrarlayan vakalarda da platin duyarlılığı tedavi stratejilerinin belirlenmesinde önemli bir parametre olarak kabul edilmektedir.

Kemoterapi ajanlarının etki mekanizması, çoğunlukla hızlı bölünen hücrelerde DNA sentezinin ve hücre döngüsünün bozulması üzerine kuruludur. Platin türevleri, DNA'ya çapraz bağlar oluşturarak hücre döngüsünü durdurmakta ve apoptozu tetiklemektedir [34]. Paklitaksel ise mikrotübüllerin stabilizasyonu yoluyla hücre bölünmesini engeller ve mitotik arrest meydana getirir [37].

Bununla birlikte, kemoterapiye bağlı olarak ciddi hematolojik ve non-hematolojik toksisiteler ortaya çıkabilmekte; bulantı, kusma, mielosupresyon, nöropati ve alopesi gibi yan etkiler hastaların yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir [38]. Ayrıca, kemoterapiye karşı gelişen ilaç direnci ve yüksek nüks oranları, hastalığın tedavisinde önemli bir engel teşkil etmektedir.

Son yıllarda, kemoterapi uygulamalarında tedavi etkinliğini artırmak ve toksisiteyi azaltmak amacıyla sirkadiyen ritme dayalı kronoterapi yaklaşımları gündeme gelmiştir [39]. Sirkadiyen ritmin, hücre döngüsü ve DNA onarımı gibi kemoterapiye yanıtı belirleyen temel biyolojik süreçleri düzenlediği bilinmektedir. Yapılan prelinik ve klinik çalışmalarda, kemoterapi ajanlarının günün farklı zamanlarında uygulanmasının tedavi yanıtında ve toksisite profilinde anlamlı değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir. Özellikle platin ve taksan ajanlarının sirkadiyen ritme uygun şekilde verilmesi, tümör hücrelerinde apoptozu artırırken sağlıklı dokularda toksisiteyi azaltabilmektedir [40].

Tüm bu bulgular ışığında, kemoterapi rejimlerinin bireyin sirkadiyen ritmine göre optimize edilmesi, over kanseri tedavisinde hem etkinliği artırmak hem de yan etkileri azaltmak için umut vaat eden bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır.

2.3.1. Karboplatin

Hücre siklusuna özgül olmayan bifonksiyonel alkilleyici ajanlardır. Alkil grupları aracılığı ile DNA ya kovalent olarak bağlanarak zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar oluşturlar ve DNA konfigürasyonunu bozarak DNA replikasyonunu engellerler. Hücreler hücre bölünmesi sırasında çapraz bağlı DNA yı kopyalamaya veya onarmaya çalıştığında DNA iplikçikleri kırılabilir ve apoptoz adı verilen bir tür programlanmış hücre ölümüne neden olabilir. Hücre siklusuna spesifik olmasalar da G2 fazında hücre siklusunun duraklamasına neden olmaktadır. Eitelyal over kanseri adjuvan ve salvage tedavisinde FDA onaylıdır. İ.v. olarak kullanılır. Myelosupresyon doz sınırlayıcı etkisidir. Sisplatinden daha az toksisiteye sahiptir. Gastrointestinal yan etkiler, nefrotoksisite, nörotoksisite ve ototoksisite daha az görülmektedir. Karboplatin, sisplatine göre daha fazla myelosupresyon ile ilişkilidir.

2.3.2. Paklitaksel

Paklitaksel, taksan grubu bir antineoplastik ajandır. Mikrotübüllerin depolimerizasyonunu inhibe ederek bunların stabil kalmasını sağlar ve böylece hücrelerin mitotik iğ ipliklerini düzgün şekilde oluşturmasını engeller. Bu durum, hücrelerin mitozun metafaz evresinde duraklamasına (mitotik arrest) ve sonuç olarak apoptozun tetiklenmesine neden olur. Böylece kanser hücrelerinin proliferasyonu engellenir [41]. Paklitaksel ileri evre epitelyal over kanseri olan tüm kadınların primer tedavilerine toksisite veya önemli medikal morbiditeler engel olmadıkça eklenmelidir. Major yan etkileri kemik iliği supresyonu, gastrointestinal sistem semptomları ve alopesidir [42].

2.4. Sirkadiyen Ritim

Sirkadiyen terimi, circa (yaklaşık) ve dies (gün) anlamına gelen iki Latince kelimenin birleşmesinden meydana gelmiş olup, yaklaşık bir günü ifade etmek için kullanılır. Hücre döngüsü, DNA hasarına cevap ve tümör baskılanması gibi önemli biyolojik yollar sirkadiyen kontrol altındadır [43].

Bu içsel (intrensek) biyolojik saat, memelilerde hipotalamusta yer alan suprakiazmatik nükleusa (SCN) yerleşmiş olan özel bir nöron topluluğu tarafından yönetilmektedir [44]. Göze ulaşan ışık retinal gangliyon hücrelerinde melanopsini uyarır [45]. Melanopsin glutamatın salınmasına yol açarak membran depolarizasyonuna neden olur [46]. Ca^{+2} sinyali artar ve SCN'ye bir bilgi olarak gelir ve SCN'da değerlendirilerek bir osilasyon süreci başlatır [47]. Suprakiazmatik nükleusun başlattığı bu merkezi osilasyon hem beynin birçok merkezinin hem de periferik organların ışıkla düzenlenen ritmik sirkadiyen süreçten haberdar olmasını sağlar [48].

Sirkadiyen döngünün bozulması metabolizma, uyku-uyanıklık, endokrin düzenleme, üreme, kardiyovasküler fonksiyon ve bağışıklık gibi önemli biyolojik süreçleri değiştirir [49]. Yapılan çalışmalarda sirkadiyen saat mekanizmasının hücre döngüsü, hücre çoğalması ve apoptoz ile yakın bir ilişki içinde olduğu olduğu gösterilmiştir [50]. Sirkadiyen ritmin bozulması, tümör gelişimi riskinin artmasıyla da ilişkilidir [51].

Memelilerde biyolojik saat moleküler seviyede 9 gen/protein içermektedir: Circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK), Aril hidrokarbon reseptör nükleer translokator benzeri protein 1 (ARNTL) veya Beyin ve Kas ARNT-benzeri 1 (BMAL1) Bmal1, Periyod1, Periyod2, Periyod3 (Per1, Per2, Per3), Kriptokrom1, Kriptokrom2 (Cry1, Cry2), Timeless (TIM), CK1 ϵ [52]. Bu moleküller hücresel saatte otoregülatör transkripsiyon-translasyon geri bildirim döngü mekanizmasına sahiptir ve pozitif-negatif yönde birbirlerinin transkripsiyonuna etki ederek transkripsiyonel bir döngü başlatırlar [44]. BMAL1 ve CLOCK, sitoplazmada heterodimer oluşturarak nükleusa geç ederler ve Per ve Cry genlerinin transkripsiyonunu sağlarlar. Per ve Cry proteinleri kompleks halinde hücre sitoplazmasında gece boyunca birikir, gün içinde ise hücrede degrade olur ve böylece 24 saatlik gece/gündüz döngüsünde, sirkadiyen ritimle, eş zamanlı şekilde ritmik dalgalanır [53]. Gece boyunca sitoplazmada biriken Per ve Cry, kazein kinaz 1 ϵ/δ (CK1 ϵ/δ) ile kompleks oluşturarak nükleusa gidip kendi transkripsiyonel aktivasyonlarını da baskılamış olurlar. Per ve Cry'nın gün içinde degrade olmaları ise bu baskılanmayı ortadan kaldırır ve tekrar kendilerinin transkripsiyonel aktivasyon fazına geçmelerine neden olur [53]. Bu döngülerinin tamamlanması yaklaşık 24 saat sürer ve hücresel sirkadiyen ritmin oluşumunun temelini oluşturmaktadır. Dolayısıyla; geri bildirimin hızı ve ritmisite, bu döngüye katılan proteinlerin fosforilasyon durumu, stabilitesi ve nükleer lokalizasyonu ile kontrol edilir. Elde edilen ritmik bilgi, promotörlerinde E-kutusu veya RRE içeren saat kontrollü genlerin ritmik transkripsiyonu yoluyla genomun geri kalanına iletilir [54]. SKN'dan bağımsız olarak periferel organlarda da sirkadiyen saat genleri ritmik bir şekilde eksprese edilmektedir [48]. Farklı kanserlerde ifade düzeyleri bozulan sirkadiyen genler Çizelge 2.2 'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Farklı kanserlerde ifade düzeyleri bozulan sirkadiyen genler

Gen Adı	İfade Değişikliği	İlgili Kanser Türleri	Referans
CLOCK	Aşırı ifade, hipermetilasyon	Meme kanseri	PubMed ID: 20124474 [55]
BMAL1 (ARNTL)	Düşük ifade	Pankreas kanseri, hematolojik maligniteler	PubMed ID: 36647780, PubMed ID: 39566400 [56,57]
PER1	Düşük ifade	Meme kanseri, lenfoma, akut miyeloid lösemi	PubMed ID: 27346616 [58]
PER2	Düşük ifade	Meme kanseri, lenfoma, akut miyeloid lösemi	PubMed ID: 27346616 [58]
CRY1	Aşırı ifade	Prostat kanseri	PubMed ID: 33846572 [59]
NPAS2	Polimorfizm ilişkisi	Meme ve kolorektal kanser	PubMed ID: 31421905 [60]
TIMELESS	Aşırı ifade	Meme, servikal ve kolorektal kanser	PubMed ID: 27346616 [58]

2.5. Kronokemoterapi

Kemoterapi ilaçlarının biyolojik saat doğrultusunda uygulanması, tedavi etkinliğinin zamanlamaya bağlı olarak optimize edilmesini mümkün kılar; bu yaklaşım “kronokemoterapi” olarak adlandırılmaktadır [39]. Kronokemoterapi, tedavinin tolere edilebilirliğini artırmak, tedavi planına bağlılığı teşvik etmek ve yaşam kalitesini artırmak için çok önemlidir [8].

Kronoterapötikler ilk olarak 1970'lerin başında kanser araştırmalarında keşfedilmiştir. Bir krono-kemoterapötik çalışmada, tüm farelere 24 saatlik bir süre boyunca toplam 240 mg/kg arabinosil sitozin (ara-C) verilmiştir. Endojen sirkadiyen salınımlara dayalı tedavi grubuna, her üç saatte bir standart 30 mg/kg yerine, farelerin en toleranslı olduğu döngünün başlarında en yüksek dozlar verilmiştir (yani, ilk dört doz, 24 saatlik döngüdeki son dört dozdan iki kat daha yüksekti). Kronoterapötik tedavi grubundaki fareler önemli ölçüde daha uzun süre hayatta kalmakla kalmamış, aynı zamanda daha yüksek kemoterapi dozlarına toleranslıydılar; başka bir deyişle, uygulama süresinden yararlanmak daha etkili bir tedavi üretmiştir [61].

Buna göre hücrelerimizde DNA onarımının zirvede olduğu zaman aralığında hastalara kemoterapi verilmesinin daha yararlı olabileceği düşünülmektedir. Böylece, toksik yan etkileri azaltırken kemoterapinin gücünü kullanmak mümkün olabilecektir. Bu durumda, kemoterapilerde maksimum etki gözlenirken, yan etkiler en aza indirilir [62].

Çoğu kanser ilacı etkisini, tümör hücrelerinde DNA hasarı oluşturarak gerçekleştirdiğinden dolayı sirkadiyen ritim ve DNA hasarı arasındaki ilişki daha net şekilde ortaya konulduğunda kronokemoterapinin de kullanımı yaygınlaşacaktır [63].

Kemoterapötik ilaçların yanı sıra kurtarma ajanlarının kronobiyolojik olarak uygulanmasının koloni uyarıcı faktörler, büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer biyolojik tedavilerin faydasını artırması muhtemeldir [40]. Kanser hastalarında bazen sirkadiyen zaman yapısının değiştiği görülmektedir [8].

Bugüne kadar yapılan klinik çalışmalar, kemoterapinin sirkadiyen ritimlere göre optimal zamanlamasının toksisiteyi azaltabileceği ve daha doz yoğun bir tedavinin uygulanmasına

olanak sağlayabileceği yönündeki klinik öncesi bulguları doğrulamıştır [64]. Birkaç prospektif randomize çalışmada, sirkadiyen temelli kemoterapi verilen ileri metastatik over, mesane ve böbrek kanseri olan hastalarda daha iyi bir objektif yanıt oranı ve/veya sağkalım göstermiştir [57]. Bu klinik kanıtlara rağmen, kanser kronoterapisinin insan kanser tedavisinin sonuçlarını iyileştirmek için rutin bir araç olarak kabul edilmesi için hala birçok sorunun çözülmesi gerekmektedir. Hayvan verilerine dayanarak, ilk ilaç uygulaması normal ve tümör dokularında hücre bölünmesinin spontan sirkadiyen ritimlerinde bozukluklara neden olabilir veya olmayabilir. Bu durum teorik olarak hedef hücrelerin ilaç duyarlılığında bir değişikliğe yol açabilir. Sürekli çoklu gün infüzyonu ve aralıklı tedavilerle yapılan ve tekrarlanabilir sirkadiyen ve günlük sonuç farklılıkları gösteren klinik çalışmalar, bu teorik olasılığı bir dereceye kadar hafifletmektedir [65]. Ayrıca, ilaçlar aynı tedavi döngüsünde kombinasyon halinde verildiğinde, birbirlerinin optimal uygulama zamanlaması üzerinde karmaşık etkilere sahip olabilirler. İlerlemiş over, endometrium veya mesane kanseri tedavisi vakalarında üç veya daha fazla ilacın kombinasyonundan oluşan birkaç tedavi döngüsünün kullanılması yaygındır [39].

Apoptoz

Apoptoz, hücrelerin fizyolojik olarak programlanmış bir şekilde ölmesini sağlayan ve organizmada doku homeostazının korunmasında merkezi bir rol oynayan kontrollü bir hücre ölüm mekanizmasıdır [66,67]. Embriyonik gelişim sürecinde apoptoz, hücre sayısının düzenlenmesi, gereksiz ya da hatalı farklılaşmış hücrelerin elimine edilmesi ve düzgün organ morfogenezinin sağlanması açısından kritik öneme sahiptir. Özellikle parmakların oluşumu sırasında interdijital hücrelerin temizlenmesi gibi morfogenetik olaylarda apoptoz belirleyici bir süreçtir [67,68].

Yetişkin bireylerde ise apoptoz, hücre yenilenmesi ve dokusal bütünlüğün sürdürülmesi ile birlikte, bağışıklık sisteminin olgunlaşması, inflamatuvar süreçlerin sonlandırılması ve DNA hasarı, oksidatif stres veya onarılamaz hücresel disfonksiyon gibi çeşitli içsel ve dışsal uyarılara yanıt olarak hasarlı hücrelerin eliminasyonu gibi çok sayıda fizyolojik ve patofizyolojik olayın düzenlenmesinde aktif rol alır [68,69].

Apoptoz, moleküler düzeyde başlıca iki yolak aracılığıyla gerçekleştirilir: intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik (ölüm reseptörü aracılı) yollar. İntrinsik yolak, genotoksik

stres, oksidatif hasar, DNA mutasyonları veya mitokondriyal disfonksiyon gibi hücre içi sinyallerle aktive olur ve mitokondri dışı membran permeabilitesinin artması sonucu sitokrom c'nin sitozole salınması ile kaspaz kaskadının başlatılmasına yol açar. Bu süreçte Bcl-2 ailesi proteinleri, pro- ve anti-apoptotik üyeleriyle mitokondriyal geçirgenliği kontrol eder [68-70]. Ekstrinsik yolak ise Fas (CD95), TNF- α reseptörü gibi hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin ligandlarına bağlanmasıyla aktive olur ve kaspaz-8'in etkinleşmesi yoluyla apoptotik süreci başlatır [69-71]. Her iki yolak da sonunda yürütücü kaspazların (özellikle kaspaz-3, -6 ve -7) aktive olmasıyla karakterize edilen hücre ölümüne yol açar.

Bu süreçlerin bozulması; kanser, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve enfeksiyonlar gibi birçok hastalığın etiyopatogenezinde rol oynamaktadır. Bu nedenle apoptoz mekanizmalarının detaylı olarak anlaşılması, hem temel hücre biyolojisi hem de yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır [58-71].

Apoptoz ve Kanser

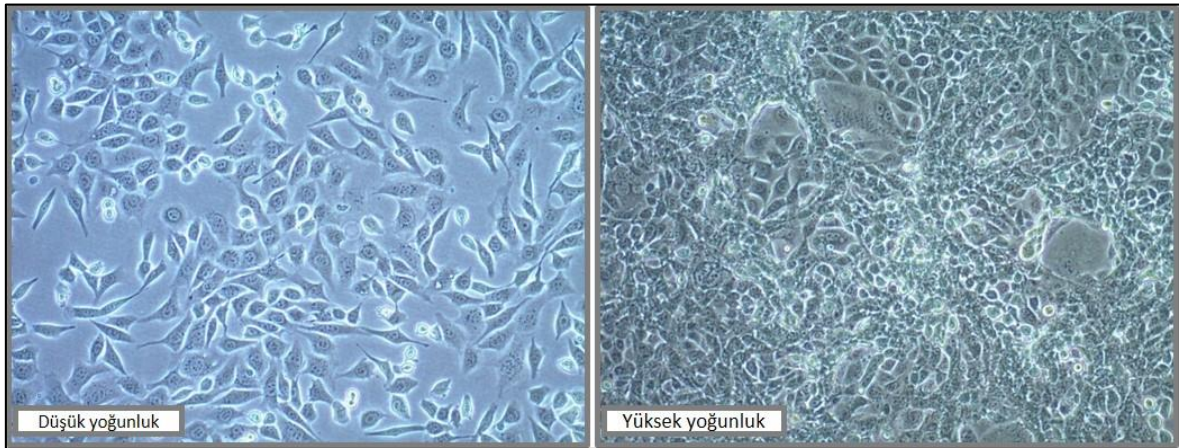
Apoptoz, karsinogeneze karşı doğal bir hücrel savunma mekanizması olarak görev yapar. Bu nedenle, malign neoplazmlarda apoptozun düzenleyici sinyal yollarında sıklıkla genetik ve işlevsel bozukluklar meydana gelir [15]. Ayrıca, birçok kemoterapötik ajan hücre ölümünü apoptoz yoluyla indüklediğinden, bu yolların sağlamlığı, tedavi etkinliğini belirleyen temel faktörlerden biridir. Apoptotik sinyal iletiminde yer alan moleküler bileşenler - ölüm reseptörleri (Fas, TRAIL-R), Bcl-2 ailesi proteinleri (antiapoptotik: Bcl-2, Bcl-xL; proapoptotik: Bax, Bak), kaspazlar, apoptoz inhibitör proteinleri (IAP'lar) ve tümör baskılayıcılar (p53) günümüzde kemoterapötik ve hedefe yönelik tedavi ajanlarının temel hedefleri arasında yer almaktadır [72]. Özellikle Bcl-2 ailesi üyelerinden antiapoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu ya da proapoptotik proteinlerin baskılanması, kemoterapiye karşı hücrel direnç gelişimine yol açtığı için, bu proteinlerin hedeflenmesi antikanser tedavi stratejileri açısından büyük önem taşımaktadır [71,73].

Apoptoz sürecinin ana yürütücülerinden olan kaspazlar da bu bağlamda önemli hedeflerdir. Başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8 ve kaspaz-9), ekstrinsik ve intrinsik yollar aracılığıyla apoptozun başlatılmasında görev alırken; efektör kaspazlardan kaspaz-3, hücrenin morfolojik olarak apoptoza girmesiyle ilişkili kromatin kondensasyonu, DNA fragmentasyonu ve sitoplazmik organel yıkımı gibi olayları yürütür [74]. Yapılan çeşitli

deneysel ve klinik çalışmalarda, kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-3 ekspresyonunun artırılmasının kemoterapi ile indüklenen apoptotik yanıtı güçlendirdiği ve tümör hücrelerinin ilaçlara duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir [75,76]. Bu nedenle, apoptoz sinyal yollarında kaybedilen fonksiyonların, aday terapötik ajanlar aracılığıyla yeniden aktive edilmesi, dirençli kanser alt tiplerinde etkili bir strateji olarak değerlendirilmektedir.

ID8 fare epitelyal over kanseri hücre hattı

ID8 fare epitelyal over kanseri hücre serisi, özellikle epitelyal over kanseri (EOC) çalışmalarında sıkça kullanılan immortalize edilmiş bir murin (fare) hücre hattıdır. ID8 hücre hattı, ilk kez Roby ve ark. tarafından tanımlanmıştır [77]. Bu hücre hattı, C57BL/6 dişi farelerinin normal over epitelyal hücrelerinden türetilmiştir. Hücreler uzun süreli *in vitro* kültüre maruz bırakılarak spontan transformasyonla immortalize edilmiştir. Bu transformasyon sonucu, ID8 hücreleri epitelyal morfoloji, tümör oluşumu potansiyeli ve *in vivo* transplantasyonla tümör oluşturabilme yeteneği kazanmıştır [78,79]. Bu hücre serisi, bağışıklık sistemi bozulmamış fare modellerinde tümör mikroçevresini ve bağışıklık yanıtlarını incelemek için oldukça uygundur. Temel bilimsel araştırmalarda ve prelinik ilaç testlerinde yaygın olarak kullanılmakta, tümör bağışıklığı, DNA onarım mekanizmaları, anjiyogenez ve immünoterapötik yanıtın modellenmesinde kritik rol oynar [77-79].



Resim 2.1. ID8 hücrelerinin morfolojik görüntüsü [80]

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Gereçler

3.1.1. Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler

- Terazı (Precisa)
- Çoklu manyetik karıştırıcı (IKA)
- Ultrasonik su banyosu (Bandelin electronic)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich)
- Mikrolaka ELISA okuyucu (Spectra Max M3, Molecular Devices)
- Tüp Çalkalama Cihazı (Vortex; REAMIX 2789)
- Derin dondurucu, -80°C (Sanyo)
- Derin dondurucu, -30°C (Sanyo)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Biyogüvenlik Kabini (CLANLAF VFRS 1206)
- Karbondioksit Etüv (Sanyo)
- Invert mikroskop (Zeiss)
- İnkübatör (NÜVE EN 500, Türkiye)
- Mikropipet seti 10-100-1000 µl (Brand)
- Spin Vorteks (Biosan)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan)
- Laminar flow kabini (Danlaf)
- Mikropipetler
- Spektrofotometre (NanodropND-1000)
- Beher (10 ml'lik)
- Manyetik balık
- Santrifüj tüpleri (50 ml ve 15 ml'lik)
- Ependorf (1,5 ve 2 ml'lik)
- Steril pipet uçları
- Steril 6'lık well plate
- Steril 96'lık well plate
- 25 cm²-75 cm² steril hücre kültürü flaskları

- 1 ml'lik steril insülin enjektörü
- Bistüri (21 Numara)
- Pens (ISOLAB 105mm)
- Patoloji numune toplama kabı (30 ml)
- Hücre kültür flaskları (SPL, 96 kuyucuklu)
- Light Cycler® 480 real-time PCR system (Roche)

3.1.2. Kullanılan kitler ve hücre hattı

- Cytotoxicity Detection Kit Plus (LDH), Roche
- Pierce BCA Protein Assay Kit, (Thermo Scientific)
- SensoLyte® Homogeneous AFC Caspase-3/7 Assay Kit, (Anaspec)
- TriReagent RNA Isolation solution (peqGOLD TriFast)
- Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis kit (Roche)
- ID8 Fare Meme Kanseri Hücre Hattı (Sigma-Aldrich, SCC145)

3.1.3. Kullanılan kimyasallar

- Paklitaksel (Sigma-Aldrich)
- Karboplatin (Sigma-Aldrich)
- Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, EtOH, Merck)
- 2-Propanol (Sigma Aldrich)
- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; HyClone)
- Fetal Sığır Serum (FBS; HyClone)
- L-glutamin (HyClone)
- Penisilin-Streptomisin (HyClone)
- Amfoterisin B (HyClone)
- Trypsin (Biological Industries)
- MTT (Sigma-Aldrich)
- Dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich)
- RIPA Buffer (Thermo Fisher)
- Fenilmetilsülfonilflorid (PMSE, Merck)
- PBS solution (Gibco)

- Ketamin (Pfizer)

3.1.4. Kullanılan besiyeri ve çözeltilerin hazırlanışı

PBS çözeltisinin hazırlanması

10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ve 100mM NaCl karışımının distile suda çözüldükten sonra, pH= 7.5 olacak şekilde HCl kullanılarak ayarlanmıştır. Hazırlanan solüsyon +4 C°'de muhafaza edilmiştir.

20 mM stok Karboplatin çözeltisinin hazırlanması

Moleküler ağırlığı 371.3 g/mol olan karboplatinin, 1.346 ml 20 μM olacak şekildeyken, aşağıdaki yoğunluk-molarite formülüne göre hesaplanarak;

1 μM , 2.5 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM , 30 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 250 μM , 250 μM , 300 μM , 500 μM , 750 μM ve 1000 μM olacak şekilde PBS içinde çözülerek hücreye uygulanırken derişimin %0,2 konsantrasyonunu geçmeyecek duruma ayarlanmıştır.

10 mM stok Paklitaksel çözeltisinin hazırlanması

Molekül ağırlığı 853.9 g/mol olan paklitakselin, 1.171 ml 10 mM olacak şekildeyken, yukarıda verilen yoğunluk molarite formülüne göre hesaplanarak 10 nM, 25 nM, 30 nM, 50 nM, 75 nM, 100 nM, 250 nM, 300 nM, 500 nM, 750 nM, 1 μM , 2 μM ve 5 μM olacak şekilde PBS içinde çözülerek hücreye uygulanırken derişimin %0,2 konsantrasyonunu geçmeyecek duruma ayarlanmıştır.

%4 FBS içeren yüksek glukozlu DMEM besiyerinin hazırlanması

Önceden ısı ile inaktive edilmiş 20 ml fetal dana serumu (Fetal Bovine Serum, FBS), daha sonra 5 ml 100 unit/ml penisilin-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomisin, 500 μl amfoterisin B, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ transferrin ve 5 ng/ml sodyum selenit ile desteklenmiş ve 2 mM L-Glutamin kullanılarak toplam hacim 500 ml olacak şekilde yüksek glukoz içeren DMEM besiyeri hazırlanmıştır.

MTT solüsyonu hazırlanması

PBS içinde 5mg/ml olacak şekilde 5 ml MTT stok solüsyonundan 1 ml'de 5 mg olacak çözündürülmüştür.

Kaspaz-3/7 substrat solüsyonu hazırlanması

Kaspaz-3/7 substratı (üretici yönergesi içerik A) 50µl, 1 M 200µl DTT (E içeriği), 4.75µl Analiz Tamponu (D içeriği) çözündürülerek toplam hacim 5 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.2. Metod ve Yöntemler

Tezde kullanılan metodlar ID8 fare over kanseri hücreleri ile *in vitro* ve ID8 hücreleri ile oluşturulan allograft deneysel over kanseri fare modeli oluşumu ile yapılan *in vivo* deneyler olmak üzere çalışmamız genel olarak iki aşamadan oluşmaktadır. Yapılacak deneysel çalışmalarda aşağıda belirtilen yöntemler kullanılmıştır.

3.2.1. *In vitro* deneyler

Hücre kültürü

Çalışmamızda ID8 fare epitelyal over kanseri hücre serisi ile çalışılmıştır. Hücre serisi, Sigma-Aldrich firmasından (SCC145) ticari olarak temin edilmiştir. Hücre kültürü, 2 mM glutamin, %4 FBS, antibiyotikler (100 unit/ml penisilin-100 µg/ml streptomisin), 5 µg/ml insulin, 5 µg/ml transferrin ve 5 ng/ml sodyum selenit ile desteklenmiş yüksek glukoz içeren DMEM besiyerinde %5 CO₂'li 37 °C nemlendirilmiş ortamda gerçekleştirilmiştir. Hücreler 2-6 pasajdan sonra log fazındayken deney basamaklarına geçilmiştir. Karboplatinin (1-1000 µM) ve paklitakselin (10 nM-5 µM) çeşitli konsantrasyonları tek başlarına ve birlikte 24 ve 48 saat süresince ID8 hücrelerine uygulanmıştır.

Hücre canlılığı analizi

ID8 hücrelerine karboplatin ve paklitaksel farklı konsantrasyon ve sürelerde tek başlarına ve birlikte uygulanmalarının hücre canlılığına olan etkisi MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) yöntemi ile belirlenmiştir. Böylelikle, ajanların tek başlarına ve

birlikte uygulanmaları sonucu IC₅₀ konsantrasyonları belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılacak karboplatin ve paklitaksel fosfat buffer saline (PBS) ile konsantrasyonlarına uygun hacimlerde çözündürülmüştür. Kültür ortamında PBS'in son konsantrasyonunun % 0.1'i geçmemesine dikkat edilmiştir.

Hücreler 96'lık kültür kaplarına, her bir kuyuda 2×10^4 olacak şekilde ekilerek bir gece inkübasyona bırakılmış ve ardından hücelere değişen konsantrasyonlarda karboplatin ve paklitaksel uygulanmıştır. Karboplatin ve paklitaksel uygulaması sonrası belirlenen inkübasyon süreleri sonunda, kuyular 100 µl taze besiyeri ile değiştirilerek her bir kuyuya MTT çalışma solüsyonundan 10 µl/kuyu (5 mg/mL) olacak şekilde ilave edilmiştir. 4 saat 37 °C ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyon sonunda oluşan formazan kristalleri 100 µl DMSO ile çözülmüştür. Çözünen kristallerin absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda ELISA mikropłaka okuyucuda (Spectramax M3 plate reader, Molecular Devices, Silicon Valley, California, ABD) okutulmuştur. Negatif kontroller sıfır absorbans değeri olarak kullanılmıştır. Deney tüm konsantrasyon ve süreler için 6 kez tekrarlanmıştır.

Sitotoksosite analizi

Karboplatinin ve paklitakselin tek başlarına ve birlikte uygulanmalarının ID8 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olup olmadığının belirlenmesinde, hücreden salınan laktat dehidrojenaz (LDH) düzeyi kullanılmıştır. ID8 hücreleri, 96 kuyulu kültür kaplarında her bir kuyuya 2×10^4 hücre gelecek şekilde ekilmiştir. Bir gece inkübasyonun ardından karboplatin ve paklitaksel belirlenecek konsantrasyon ve sürelerde hücelere uygulanmıştır. İnkübasyon süreleri dolduktan sonra kültür ortamından 100 µL besiyeri alınıp 96 kuyulu mikropłakanın her bir kuyusuna eklenmiştir. Ardından, her bir kuyuya 100 µL taze hazırlanmış reaksiyon karışımı eklenerek, ışıktan uzak bir ortamda, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra ELISA okuyucu cihaz ile 490-492 nm dalga boyundaki absorbans değerleri okunmuştur. Elde edilen absorbans değerlerinden kör kontrolün absorbansı çıkartıldıktan sonra, ilaçların sitotoksosite değerinin yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır [Sitotoksosite (%) = (örnek abs. – düşük kontrol abs. / yüksek kontrol abs. – düşük kontrol abs.) x 100]. Deney tüm konsantrasyon ve süreler için 3 kez tekrarlanmıştır.

3.2.2. In vivo deneyler

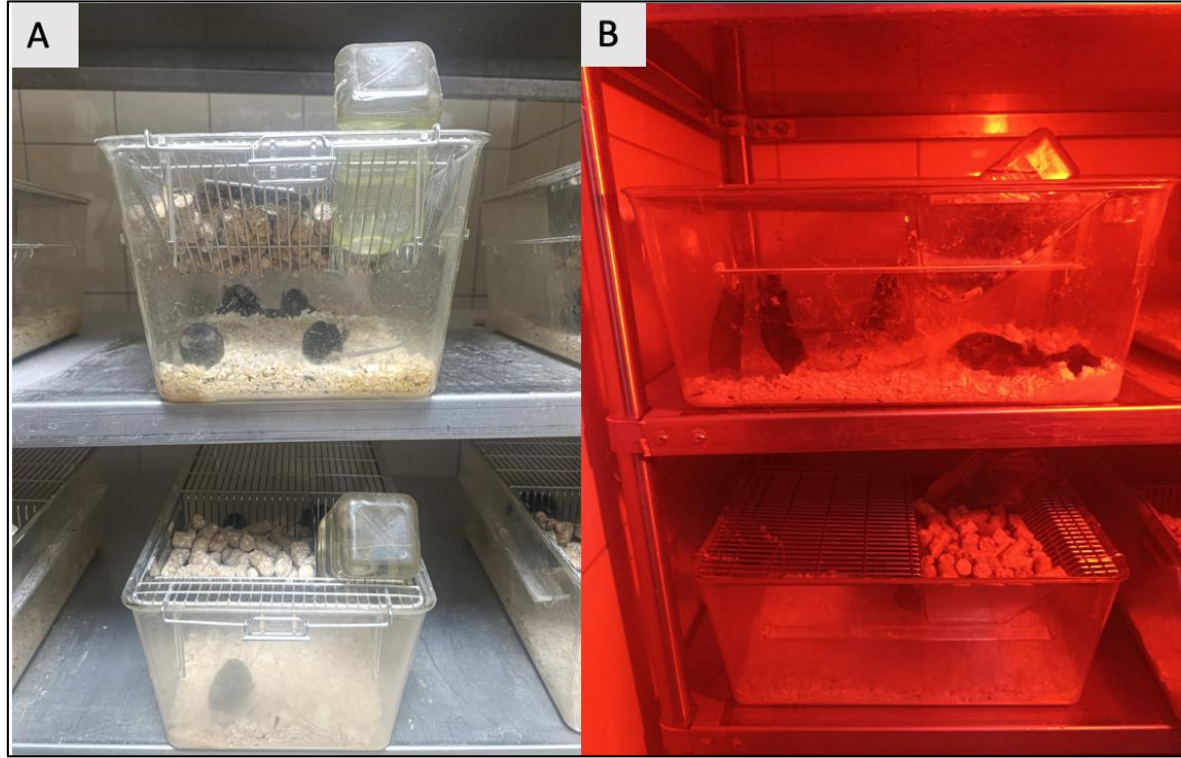
Deneysel over kanser fare modeli

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezinde (GÜDAM), ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma koşulları ve hayvan modelinin oluşturulması için en uygun model olarak C57BL/6 fareler kullanılmıştır.

Çalışmamızın *in vitro* aşamasını oluşturan hücre canlılığı (MTT yöntemi) ve sitotoksisite (LDH) deney sonuçlarının değerlendirilmesi ve literatürün gözden geçirilmesi ile birlikte, karboplatin ve paklitaksel'in *in vivo* uygulama konsantrasyonları belirlenmiştir. Proje önerimizin *in vivo* aşamasında, hücre kültürü yöntemi ile çoğaltılan ID8 hücreleri, (5×10^6 / 0,2 ml PBS içinde) serum içermeyen DMEM besiyeri içinde C57BL/6 farelere uygulanıp deneysel fare over kanser modeli oluşturulmuştur. Çalışmamıza başlamadan önce, deneysel over kanser modelinin oluşturulması, *in vitro* deney sonuçlarımız ve literatürün gözden geçirilmesi sonucu belirlenen ajanlara ait konsantrasyonların deney hayvanı üzerindeki etki/etkilerinin belirlenmesi amacıyla ön çalışma yapılmış ve koşulların optimizasyonu sağlanmıştır. Buna göre, her bir grupta 2 fare (n=2), toplamda 16 fare ile ön çalışma yapılması planlanmıştır.

Çalışmamızda 6-8 haftalık 20-30 gr ağırlığında 80 adet dişi C57BL/6 fare kullanılmıştır. Fareler, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM)'nden temin edilmiştir. Hayvan deneyleri Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alınarak yapılmıştır (G.Ü.ET-21.065). 80 adet farenin kiloları ortalama olacak şekilde 8 farklı gruba ayrılarak gruplandırılmıştır. Fareler, GÜDAM'da deney öncesi ve deney süresince serbest yem ve su ile beslenerek barındırılmıştır. Deney gruplarının yarısının (n=40) tüm deneysel işlemleri farelerin sirkadiyen ritmine (12 saat aydınlık:12 saat karanlık) uygun olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarının kalan yarısının (n=40) tüm deneysel işlemleri ise sirkadiyen ritmin senkronize edilmesinin ardından (12 saat karanlık:12 saat aydınlık) gerçekleştirilmiştir. Farelerin senkronizasyonu, deneyler öncesinde en az 3 hafta boyunca ve deneyler süresince aydınlık-karanlık döngüsü ve diğer önemli çevresel koşulların kontrolü

ile sağlanmıştır. Aydınlatma rejimi, ~100 lüks ışık yoğunluğu ile 12 saat aydınlık (ışıklı 08:00 - 20:00 arası) ile dönüşümlü olarak 12 saat karanlık (karanlık 20:00 - 08:00 arası) şeklinde yapılmıştır [65] (Resim 3.1).



Resim 3.1. Sirkadiyen ritmi korunmuş ve sirkadiyen ritmi değiştirilmiş C57BL/6 farelerin deneysel barınma koşullarının fotoğrafları (A) 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık (doğal ışık) döngüsüne maruz bırakılarak sirkadiyen ritmi korunmuş olan C57BL/6 fareleri ile; (B) 12 saat karanlık / 12 saat aydınlık döngüsüne maruz bırakılarak sirkadiyen ritmi değiştirilen C57BL/6 fareleri görülmektedir. Aydınlatma rejimi ~100 lüks ışık yoğunluğu ile 12 saat aydınlık (ışıklı 08:00 - 20:00 arası) ile dönüşümlü olarak 12 saat karanlık (karanlık 20:00 - 08:00 arası) olacak şekilde yapılmıştır [65]

In vitro olarak çoğaltılacak olan ID8 hücre süspansiyonu (5×10^6 / 0,1 ml PBS içinde) serum içermeyen DMEM besiyeri içinde, her bir farenin peritoneal boşluğa 30 gauge iğneli bir Hamilton şırıngası kullanılarak intraperitoneal (i.p.) olacak şekilde enjekte edilmiştir. Kontralateral overe, cerrahi tekniğe herhangi bir doku tepkisini hesaba katmak için eşdeğer miktarda PBS enjekte edilmiştir. Fareler, sonraki 24 saat boyunca yakından izlenerek iyileşmelerine izin verilmiştir. Hayvanlar tartıldıktan sonra haftada iki kez sağlık değerlendirmeleri yapılmıştır. Literatüre göre 8-10. günün sonunda tümör palpe edilip, yaklaşık boyutu 100 mm^3 olduğunda ötenazi gerçekleştirilmiştir [81,82]. Tümör gelişimi belirlenen fareler, rastgele bir şekilde 8 deneysel gruba ayrılmış ve her bir grupta 10 hayvan ($n=10$) olacak şekilde düzenlenmiştir.

Gruplar: 1) Sham Grubu 1, 2) Sham Grubu 2, 3) Aydınlik döngüde tek başına karboplatin uygulanan grup, 4) Karanlık döngüde tek başına karboplatin uygulanan grup, 5) Aydınlik döngüde tek başına paklitaksel uygulanan grup, 6) Karanlık döngüde tek başına paklitaksel uygulanan grup, 7) Aydınlik döngüde karboplatin ve paklitaksel uygulanan grup, 8) Karanlık döngüde karboplatin ve paklitaksel uygulanan grup

Grup I - Sham grubu 1: ID8 fare over kanseri hücreleri ile over kanser modeli oluşturulmuş ve PBS verilen grup. Hayvanlara her dört günde bir kez olmak üzere PBS i.p. olarak sabah 9:00'da 16 gün süresince verilmiştir (n=10).

Grup II – Sirkadiyen döngüsü değiştirilmiş sham grubu 2: Senkronizasyon sonrası döngüleri değişen farelere ID8 fare over kanseri hücreleri ile over kanser modeli oluşturulmuş ve PBS verilen grup. Hayvanlara her dört günde bir kez olmak üzere PBS i.p. olarak sabah 9:00'da 16 gün süresince verilmiştir (n=10).

Karboplatin ve Paklitaksel'in çözündürülmesi için PBS kullanılacağından ve bu ajanların farelere veriliş yöntemi (i.p. enjeksiyon) ve veriliş süreleri aynı olmakla birlikte sirkadiyen ritm farklılığından dolayı farklı saat dilimlerinde uygulanması nedeniyle çalışmamızda 2 farklı sham grubu kullanılması gerekliliği doğmuştur.

Grup III - Tek başına Karboplatin uygulanan grup: ID8 fare over kanseri hücreleri ile over kanser modeli oluşturulmuş ve karboplatin ile tedavi edilmiş grup. Hayvanlara her dört günde bir kez olmak üzere 16 mg/kg karboplatin [83] i.p. olarak sabah 9:00'da 16 gün süresince verilmiştir (n=10).

Grup IV - Sirkadiyen döngüsü değiştirilmiş tek başına Karboplatin uygulanan grup: Senkronizasyon sonrası döngüleri değişen farelere ID8 fare over kanseri hücreleri ile over kanser modeli oluşturulmuş ve karboplatin ile tedavi edilmiş grup. Hayvanlara her dört günde bir kez olmak üzere 16 mg/kg karboplatin [83] i.p. olarak sabah 9:00'da 16 gün süresince verilmiştir (n=10).

Grup V - Tek başına Paklitaksel uygulanan grup: ID8 fare over kanseri hücreleri ile over kanser modeli oluşturulmuş ve paklitaksel ile tedavi edilmiş grup. Hayvanlara her dört günde

bir kez olmak üzere 20 mg/kg paklitaksel [83] i.p. olarak sabah 9:00'da 16 gün süresince verilmiştir (n=10).

Grup VI - Sirkadiyen döngüsü değiştirilmiş tek başına Paklitaksel uygulanan grup: Senkronizasyon sonrası döngüleri değişen farelere ID8 fare over kanseri hücreleri ile over kanser modeli oluşturulmuş ve paklitaksel ile tedavi edilmiş grup. Hayvanlara her dört günde bir kez olmak üzere 20 mg/kg paklitaksel [83] i.p. olarak sabah 9:00'da 16 gün süresince verilmiştir (n=10).

Grup VII - Karboplatin ve Paklitaksel'in birlikte uygulandığı grup: ID8 fare over kanseri hücreleri ile over kanser modeli oluşturulmuş ve karboplatin ve paklitaksel ile tedavi edilmiş grup. Hayvanlara her dört günde bir kez olmak üzere 16 mg/kg karboplatin [83] i.p. olarak 16 gün süresince ve yine her dört günde bir kez olmak üzere 20 mg/kg paklitaksel [83] i.p. olarak sabah 9:00'da 16 gün süresince verilmiştir (n=10).

Grup VIII - Sirkadiyen döngüsü değiştirilmiş Karboplatin ve Paklitaksel'in birlikte uygulandığı grup: Senkronizasyon sonrası döngüleri değişen farelere ID8 fare over kanseri hücreleri ile over kanser modeli oluşturulmuş ve ve karboplatin ve paklitaksel ile tedavi edilmiş grup. Hayvanlara her dört günde bir kez olmak üzere 16 mg/kg karboplatin [83] i.p. olarak 16 gün süresince ve yine her dört günde bir kez olmak üzere 20 mg/kg paklitaksel [83] i.p. olarak sabah 9:00'da 16 gün süresince verilmiştir (n=10).

Tümör büyüklüğü haftada iki kez kaliper ile ölçülerek tümör hacmi standart formül ile hesaplanmıştır: $\text{Genişlik}^2 \times \text{uzunluk} / 2$. Vücut ağırlığındaki değişiklikler her hafta ölçülmüştür. Deney süresi sonunda farelere, ketamin ve ksilazin anestezisi altında intrakardiyal kan alma yöntemiyle ötenazi uygulanmıştır. Ötenazi sonrası hayvanlardan kan ve tümör dokularının yanı sıra, karaciğer, akciğer, böbrek ve kalp dokuları da alınmıştır.

Aktif Kaspaz-3/7 seviyesinin belirlenmesi

Tümör dokusundan elde edilen lizatlardan, farelere uygulanan karboplatin ve paklitaksel'in apoptotik yolağın önemli bir belirteci olan aktif kaspaz-3 miktarına olan etkilerinin belirlenmesi için SensoLyte® Homogeneous AFC Caspase-3/7 Assay (AnaSpec) kiti kullanılmıştır. Öncelikle her bir gruptan farelerin ovaryum tümör dokularından protein

izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Dokular 50-100 mg olacak şekilde eppendorf tüplere konulduktan sonra 500 µL soğuk RIPA lysis tamponu (tampon içerisine %1'i proteaz inhibitörü Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) eklenerek) eklenmiş ve homojenizatör yardımıyla mekanik olarak parçalanmıştır. Lizat 13.500 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek, üstte kalan süpernatant başka bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve analiz günü kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

Elde edilen lizatların içindeki protein miktarlarının belirlenmesi için BCA Protein Assay kit kullanılmıştır. İlk önce BSA (bovine serum albumin) ile farklı konsantrasyonlarda (0; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 mg/mL) standartların hazırlanması gerçekleştirilmiştir. Standartların hazırlanması sırasında ultra saf su kullanılmıştır. Tüm standartlar ve örnekler 3 tekrarlı olacak şekilde 96 kuyulu kültür kabına konulmuştur. Kit içerisinde bulunan A ve B çözeltileri 50:1 oranında hazırlanmıştır. Hazırlanan reaksiyon karışımı standartların ve örneklerin bulunduğu her kuyuya toplam hacim 100 µl olacak şekilde eklenmiştir. 37 °C'de, 30 dak. inkübe edildikten sonra 562 nm dalga boyunda Spectramax M3 cihazı ile okuma yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerleriyle BSA için bir standart eğrisi oluşturulmuş ve bu eğri üzerinden her bir hücre lizatının içindeki protein miktarının belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

Protein miktarı belirlenmiş örneklerden SensoLyte® Homogeneous AFC Caspase-3/7 Assay (AnaSpec) kitindeki protokol gereği her örnekten 150 µl alınıp içerisine 50 µl substrat solüsyonu eklenmiştir. Substrat solüsyonun hazırlanması için gerekli bileşenler Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. 96 kuyulu kültür kabı için Kaspaz-3/7 substrat solüsyonu hazırlanması (100 kuyu için)

Bileşenler	Hacim
Kaspaz-3/7 substratı (İçerik A)	500 µl
1 M DTT (İçerik E)	200 µl
Analiz tamponu (İçerik D)	4.75 µl
Toplam hacim	5 mL

Substrat solüsyonu eklenmesinden sonra kültür kabı ışık görmeyecek şekilde karıştırıcıya yerleştirilmiş ve 1 saat boyunca karıştırmaya devam edilmiştir. Süre sonunda floresan yoğunluğu eksitasyon/emisyon= 380/500 nm (Ex/Em) dalga boylarında olacak şekilde ölçüm yapılmıştır.

Dokuların Histopatolojik olarak incelenmesi

Gruplar arasında yapısal farklılıkları ışık mikroskopik düzeyde incelemek amacıyla, süre bitiminde alınan ovaryum dokuları % 10 nötral formalinde 72 saat tespit edildikten sonra rutin histolojik takip işlemlerinin geçirilerek parafin bloklar elde edilmiştir. Hazırlanan paraffin bloklardan 4-5 mikron kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınan kesitler etüvde 63 °C’de 2 saat deparafinize edildikten sonra % 100, % 96, % 80, % 70, % 50, azalan alkol serilerinden geçirilmiştir. 10 dk akar suda yıkandıktan ve alkol uzaklaştırıldıktan sonra Harris Hematoksilen solüsyonunda 10 dk tutularak akar suya alınmıştır. 10 dk akar suyun altında boyanın fazlası uzaklaştırılarak % 1’lik HCl solüsyonunda 1-2 dip yapıldıktan sonra kesitler tekrar akar suda yıkanmıştır. Lamlar, fazla su uzaklaştırıldıktan sonra 10 dk Eozin solüsyonunda bekletilmiştir. Fazla boyayı uzaklaştırmak amacıyla 10 dk akar suda yıkandıktan sonra kurutularak % 50, % 70, % 80, % 96, % 100 artan alkol serilerinden geçirilmiş ve suyun kesitlerden uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ardından 45 dk ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatılmış ve elde edilen preparatlar Leica DCM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programı kullanılarak resimlendirilmiştir.

Karboplatin ve paklitakselin tümör dokuları üzerindeki gen ifade düzeylerine etkisi

RNA İzolasyonu ve Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) yöntemi

Deneklerden elde edilen tümör dokusu, steril serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra DNaz ve RNaz free 1,5 ml’lik ependorf tüplere alınarak hızlı bir şekilde sıvı azot içinde dondurulduktan sonra analizlerin yapılacağı güne kadar -80 °C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Doku örneklerinden Chomczynski ve ark. tarafından tanımlanan, guanidin isothiocyanate/phenol-kloform metodunun modifikasyonu sonucu oluşan Trizol (İnvitrogen, ABD) kullanılarak homojenizatör yardımı ile homojenize edilmiş ve dokudan total RNA izolasyonu elde edilmiştir [84]. Apoptozda görev alan genlere ve sirkadiyen ritm genlerine ait mRNA ifade düzeylerinin belirlenmesi için öncelikle tamamlayıcı DNA (cDNA) eldesi gerçekleştirilmiştir. Bunun için, “QuantiTect Reverse Transcription kit” cDNA sentez kiti protokolü uygulanmış ve otomatik ısı döngü cihazında aşağıda özetlenen deney basamakları gerçekleştirilmiştir. RNA örnekleri ile random hegzamerler kullanılarak 65 °C’de 10 dakika bekletildikten sonra karışıma revers transkriptaz enzimi, enzim tamponu, RNaz inhibitörü,

dNTP karışımı, DTT (dithiothreitol) eklenip sırasıyla, 29 °C’ de 10 dakika, 48 °C’ de 60 dakika ve 85 °C’ de 5 dakika inkübe edilmiştir. Elde edilen cDNA’lar analiz edilene kadar -20 °C’ de saklanmıştır.

Kantitatif Real Time PCR yöntemi

Gen ifade düzeyi çalışmaları kantitatif Real-time PCR (qPCR) yöntemi ile CFX Connect™ Real-Time PCR System (Bio-Rad Laboratories, USA) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Sirkadiyen ritm ve hücre ölümü’nde görev alan ilgili genlerin mRNA ifade düzeylerinin belirlenmesi amacıyla, ilgili genlerin mRNA’larına özgü primer çiftleri kullanılarak CFX Connect™ Real-Time PCR System cihazında çoğaltılmıştır. Çoğaltılan PCR dizisinin özgünlüğünü belirlemek için prob dizisi kullanılmıştır. Her bir 20 µL’lik reaksiyona 5 µL cDNA, Light Cycler® 480 Probes Master karışımından 4 µL, 0.2 µL prob, herbir primerden 0.5 µL ve steril distile su eklenerek reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra, PCR koşulları optimize edilmiştir. İfade düzeylerinin normalizasyonu için housekeeping bir gen olan Beta actin (Actb) mRNA seviyeleri referans olarak alınmıştır. Sonuçlar Actb mRNA seviyeleri ile normalize edilerek belirlenen genlere ait ifade düzeyi kantitatif olarak belirlenmiştir. Gene özgü primer dizileri Çizelge 3.2’de ve Real-time PCR tepkimesi karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 3.3’de verilmiştir. Relatif gen ifadenmesi sonuçları “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplanmıştır [85,86].

Çizelge 3.2. Gen spesifik qPCR primer dizileri

Gen	Forward primer (5’- 3’)	Reverse primer (5’- 3’)
Bcl-2	GTCCCGCCTCTTCACCTTTCAG	GATTCTGGTGTTTCCCGTTGG
Bcl-xL	AACATCCCAGCTTCACATAACCCC	GCGACCCCAGTTTACTCCATCC
Bax	GCGTGGTTGCCCTCTTCTACTTIG	AGTCCAGTGTCCAGCCCATGATG
Bak	AAGGTGGGCTGCGATGAGTCC	GGGTCTCCTGTTCTGCTGGTG
Casp3	AGATACCGGTGGAGGCTGACT	TCTTTCGTGAGCATGGACACA
Per1	CGCCTCCTTGCTACAGGTACAT	GGTAGGAACAGCCAGAGGTTTC
Per2	TGTGTGCTTACACGGGTGTCCTA	ACGTTTGTTTTGCGCATGAA
Clock	CACCGACAAAGATCCCTACTGAT	TGAGACATCGCTGGCTGTGT
Bmal1	CAACCTTCCCGCAGCTAACA	TCCGCGATCATTGACCTAT
Cry1	CCTCTGTCTGATGACCATGATGA	CCCAGGCCTTTCTTTCCAA
Cry2	AGGGCTGCCAAGTGCATCAT	AGGAAGGGACAGATGCCAATAG
Actb	TGACAGGATGCAGAAGGAGA	GCTGGAAGGTGGACAGTGAG

Actb: Beta actin; Casp3: Caspase 3; Per: Period; qPCR: quantitative real-time PCR; PCR: polimeraz zincir reaksiyonu

Çizelge 3.3. Actb, Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bak, Casp3, Per1, Per2, Clock, Bmal1, Cry1 ve Cry2 gen ifade düzeylerinin belirlenmesi için Real-time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	4.7 µl
Prob Master mix (X10)	1X	1.4 µl
25 mM MgCl ₂	4 mM	1.2 µl
Primer F	10 pmol/µl	0.5 µl
Primer R	10 pmol/µl	0.5 µl
TaqMan prob	10 pmol	0.1 µl
cDNA	-	2 µl

CFX Connect™ Real-Time PCR System deney programı

Nicel gerçek zamanlı PCR karışımları hazırlandıktan sonra 96 kuyulu mikrolakalara dağıtıldıktan sonra, üzerine önceden elde edilen cDNA'lar eklenmiştir. Mikrolakaların üzeri şeffaf kapatıcı ile örtüldükten sonra, mikrolakalar CFX Connect™ Real-Time PCR System cihazına yerleştirilmiştir. Çizelge 3.4'te belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirilmiştir. Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bak, Casp3, Per1, Per2, Clock, Bmal1, Cry1, Cry2 ve Actb genleri için aynı program kullanılmıştır. Reaksiyon sonucu, hedef genlerin mRNA ifade düzeylerini gösteren Crossing point (Cp) değerleri belirlenmiştir.

Çizelge 3.4. PCR amplifikasyon programı

Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	1	
Analiz Modu	-	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)	95	
İnkübasyon Zamanı (s:dk:sn)	10:00dk	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	
Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)		
Program verisi	Değer	
Döngüler	50	
Analiz Modu	Çoğalma	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	Kısım 2
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60
İnkübasyon Zamanı (s:dk:sn)	10 sn	10:00dk
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	20.0
Program 3. Soğutma		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	1	
Analiz Modu	-	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)	40	
İnkübasyon Zamanı (s:dk:sn)	30sn	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	

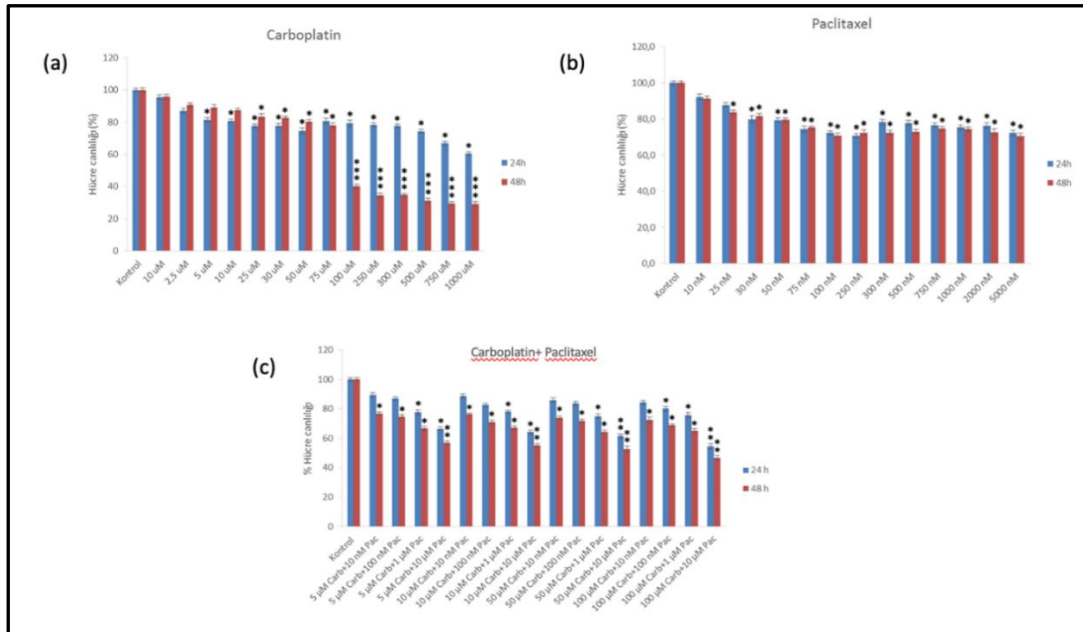
İstatistiksel analizler

Hedeflenen genlerin mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar “REST (2009 V2.0.13)” istatistik programı ile karşılaştırılmıştır [85]. Veriler, “tek yönlü Anova” testiyle karşılaştırılmış ve “SPSS 24.0” istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan gruplarda farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Bütün istatistiksel analizlerde $*p<0.05$, $**p<0.01$ ve $***p<0.001$ bulunan p değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Karboplatin ve Paklitaksel'in Hücre Canlılığına Etkisi

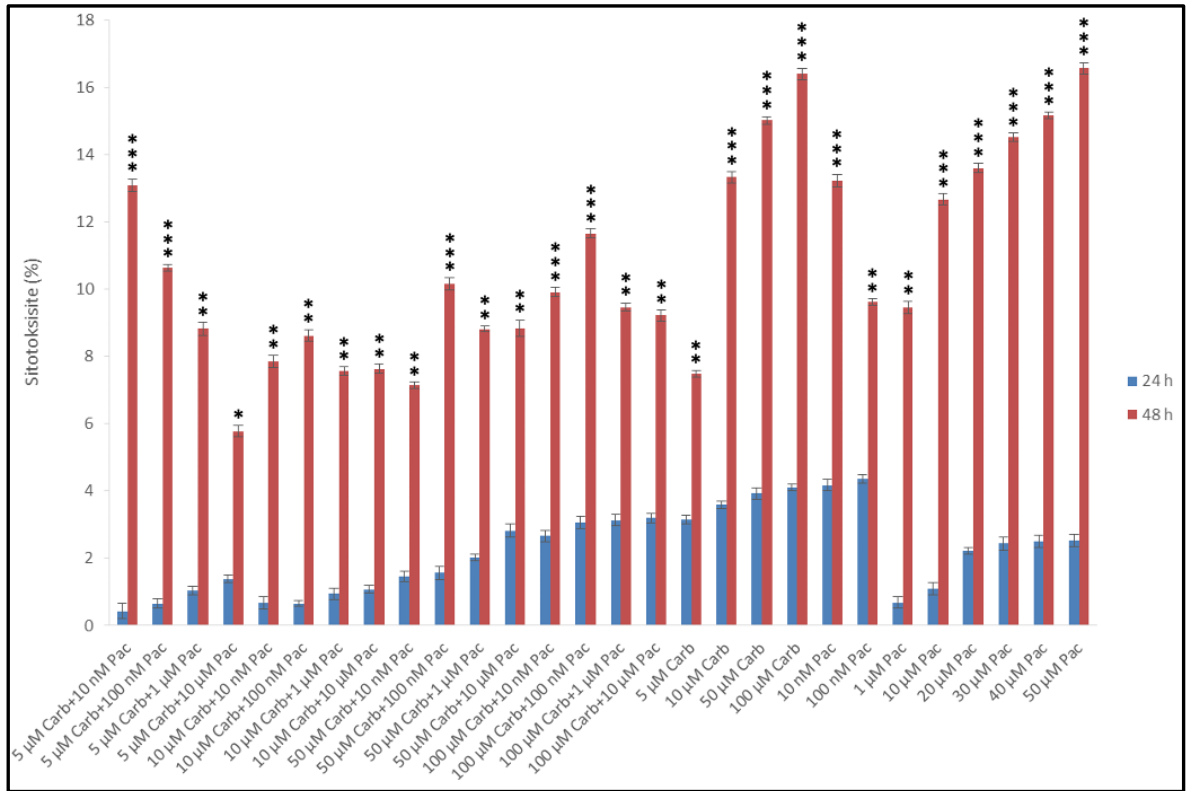
ID8 hücre canlılığı MTT deneyi ile belirlenmiştir (Şekil 4.1). ID8 hücreleri 24 ve 48 saat boyunca karboplatin ve paklitaksel ile muamele edilmiştir. 24 ve 48 saat boyunca paklitaksel'in 25-5000 nM konsantrasyonlarının ID8 hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca tek başına uygulanması hücre canlılığında hafif bir azalmaya yol açmıştır ($p<0.05$). 24 ve 48 saat boyunca karboplatin uygulanması 5 μM 'ye kadar olan konsantrasyonlarda hücrelerin canlılığını değiştirmemiştir ($p>0.05$). Karboplatin'in 5-75 μM konsantrasyonlarının ID8 hücrelerine 24 saat boyunca tek başına uygulanması hücre canlılığında hafif bir azalmaya yol açmış ($p<0.05$), ancak daha yüksek konsantrasyonlarda (100-1000 μM) ise anlamlı düzeyde azalma görülmüştür ($p<0.001$). Paklitaksel ve karboplatin kombine uygulamalarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 4.1'de gösterilmiştir. 24 ve 48 saatlik uygulamadan sonra, en düşük hücre canlılığı (sırasıyla %54,49 ve %46,80) 100 μM karboplatin ve 100 μM paklitaksel kombine tedavisinde gözlenmiştir. Paklitaksel ve karboplatin'in kombine uygulamaları, ajanların tek başlarına kullanımına kıyasla hücre canlılığında daha fazla azalmaya yol açmıştır.



Şekil 4.1. 5-100 μM Karboplatin (a), 1-100 μM Paklitaksel uygulanmış ID8 hücrelerinin (b) 24 ve 48 saatlerde hücre canlılığı. 24 ve 48. saatlerde Karboplatin ve Paklitaksel kombinasyonunun (c) seçilen konsantrasyonlarının ID8 hücre canlılığı üzerindeki etkileri. Veriler ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p<0.05$; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ** $p<0.01$; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *** $p<0.001$; Carb: Karboplatin; Pac: Paklitaksel

4.2. Paklitaksel ve Karboplatin'in Sitotoksikite Üzerine Etkisi

Karboplatin ve Paklitaksel'in ID8 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri LDH salınım deneyi ile değerlendirilmiştir. Karboplatin ve paklitaksel'in 24 saat süre ile tek başlarına ve birlikte uygulanmaları ID8 hücrelerinde sitotoksisiteye neden olmamıştır ($p>0.05$). Ancak, 48 saat süre ile tek başlarına ve birlikte uygulanmaları ID8 hücrelerinde sitotoksisiteye neden olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$; $p<0.001$). Sonuçlarımız Karboplatin ve Paklitaksel'in kombine tedavisinin ID8 hücrelerinde Karboplatin ve Paklitaksel'in tek başlarına sitotoksik etkilerini önemli ölçüde azalttığını göstermektedir (Şekil 4.2).

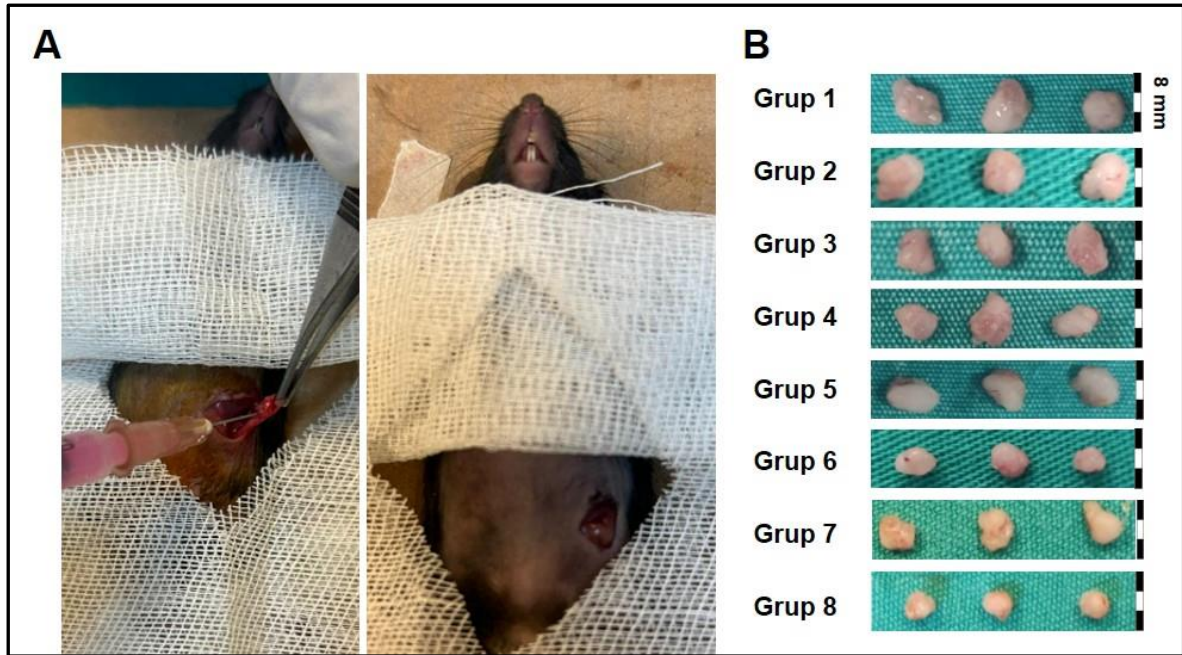


Şekil 4.2. Karboplatin ve/veya Paklitaksel'in ID8 hücrelerinde LDH salınımı ile belirlenen sitotoksikite üzerindeki etkisi. Veriler ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p<0.05$; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ** $p<0.01$; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *** $p<0.001$

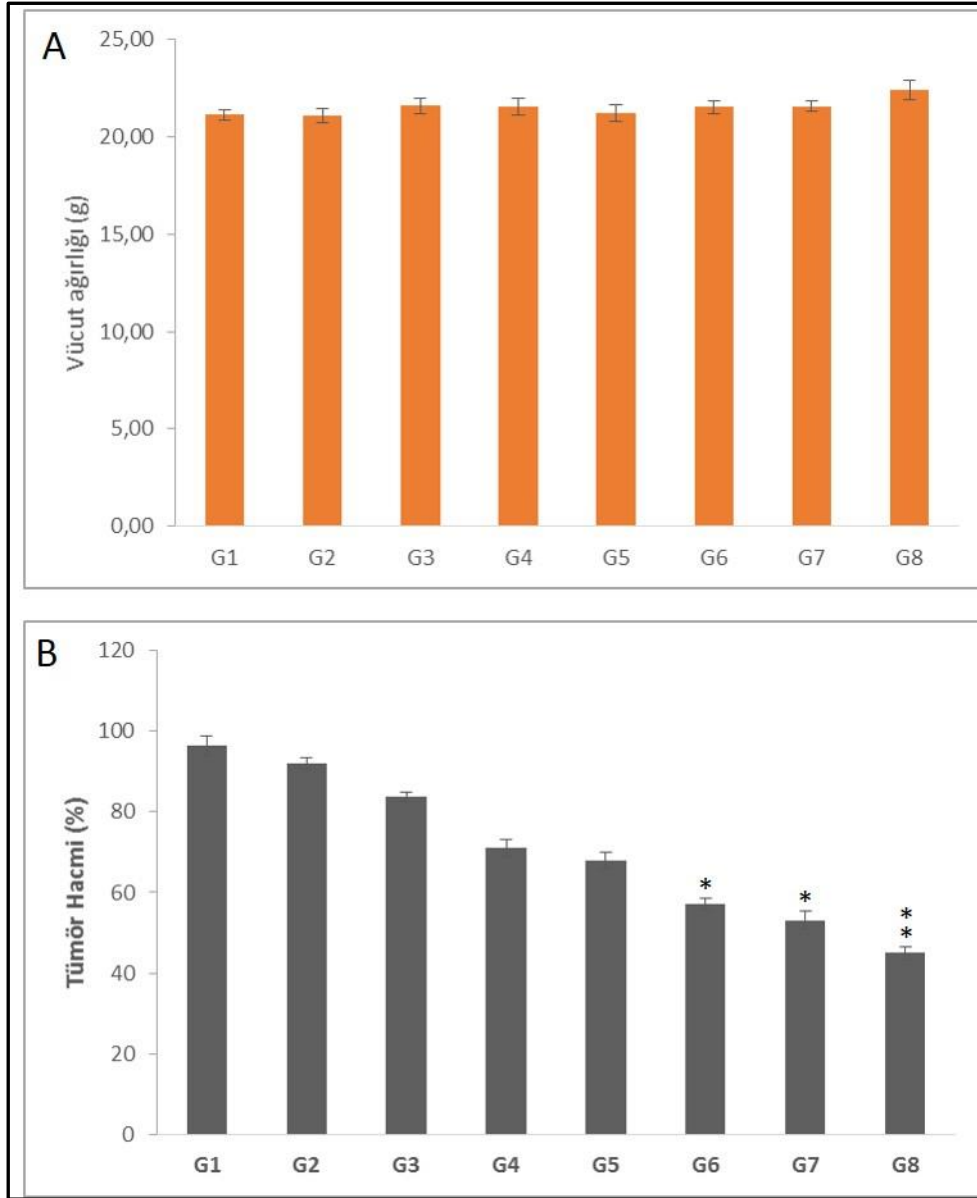
4.3. Vücut Ağırlıkları ve Tümör Hacimlerinin Değerlendirilmesi

Tümörler tedavilerin sonunda 8 gruptan toplanmıştır (Resim 4.1(A) ve 4.1(B)). Kontrol grupları ile tedavi grupları karşılaştırıldığı zaman, tedavi gruplarında kontrol gruplarına kıyasla vücut ağırlıklarında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir ($p>0.05$, Şekil 4.3 (A)). Haftalık tümör hacmi ölçümlerinde ise tek başına karboplatin uygulanan grup (G3), sirkadiyen döngüsü değiştirilmiş tek

başına karboplatin uygulanan grup (G4) ile tek başına paklitaksel uygulanan grup (G5), kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman istatistiksel anlamlılık tespit edilmemiştir ($p>0.05$, Şekil 4.3 (B)). Ancak, sirkadiyen döngüsü değiştirilmiş tek başına paklitaksel uygulanan grup (G6), karboplatin ve paklitaksel'in birlikte uygulandığı grup (G7) ve sirkadiyen döngüsü değiştirilmiş karboplatin ve paklitaksel'in birlikte uygulandığı grup (G8) kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman tümör hacminde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmuştur ($p<0.05$, Şekil 4.3 (B)). Sham kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, tek başına karboplatin uygulanan (G3), sirkadiyen döngüsü değiştirilmiş tek başına karboplatin uygulanan (G4) ile tek başına paklitaksel uygulanan (G5) gruplarındaki tümör hacim yüzdesi sırasıyla (%83.75, %71 ve %68) daha düşük olduğu ancak tüm bu değişikliklerin anlamlı düzeye ulaşmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Buna karşılık, sirkadiyen döngüsü değiştirilmiş tek başına paklitaksel uygulanan (G6), karboplatin ve paklitaksel'in birlikte uygulandığı (G7) ve sirkadiyen döngüsü değiştirilmiş karboplatin ve paklitaksel'in birlikte uygulandığı (G8) gruplardaki tümör hacmi yüzdesinin (sırasıyla %57.23, %53.14 ve %45.08) sham kontrol gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür ($p<0.05$, Şekil 4.3).



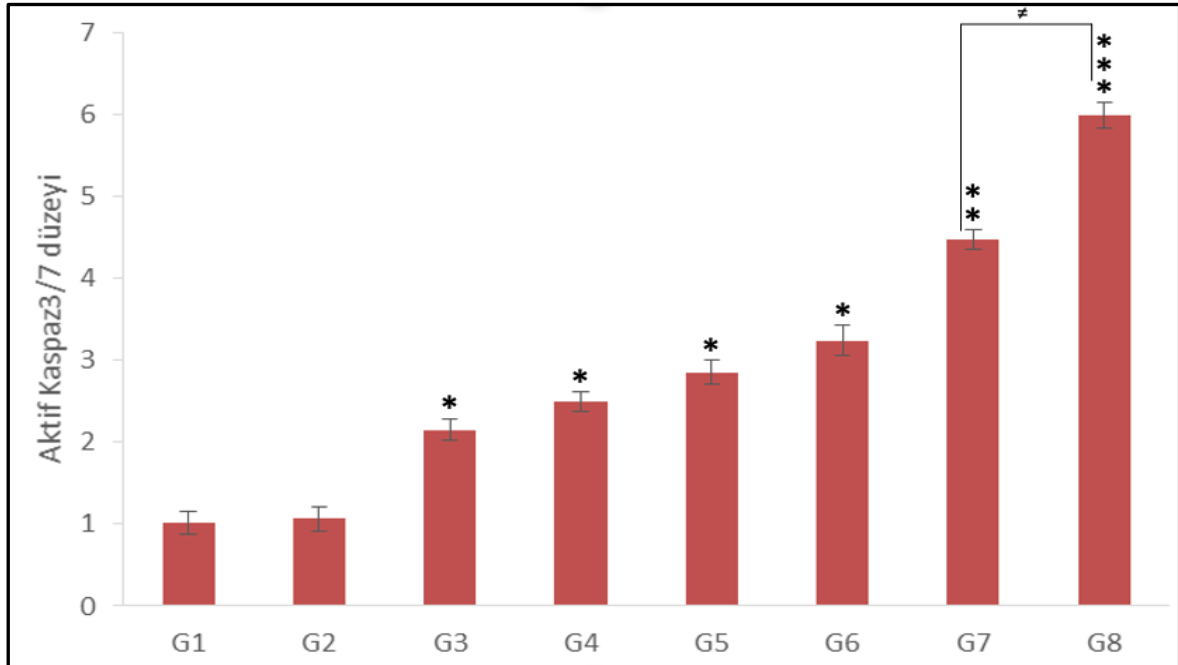
Resim 4.1. ID8 hücresi taşıyan C57BL/6 farelerin temsili fotoğrafı (A). Deney sonunda gruplardan çıkarılan tümör dokularının fotoğrafları (B). Grup 1: çözücü kontrolü (PBS ile tedavi); Grup 2: çözücü kontrolü (PBS ile tedavi, döngüler senkronize edildi); Grup 3: karboplatin ile tedavi edildi; Grup 4: karboplatin ile tedavi edildi, döngüler senkronize edildi; Grup 5: paklitaksel ile tedavi edildi; Grup 6: paklitaksel ile tedavi edildi, döngüler senkronize edildi; Grup 7: karboplatin ve paklitaksel ile tedavi edildi; Grup 8: karboplatin ve paklitaksel ile tedavi edildi, döngüler senkronize edildi. PBS, fosfat tamponlu salin



Şekil 4.3. Paklitaksel ve/veya Karboplatin'in C57BL/6 farelerinde haftada bir kez ölçülen vücut ağırlıkları (A) ve tümör hacimleri (B) üzerindeki etkileri. Ölçümler haftada bir kez gerçekleştirilmiştir. Grup 1: Çözücü kontrolü (PBS ile tedavi); Grup 2: Çözücü kontrolü (PBS ile tedavi, döngüler senkronize); Grup 3: karboplatin ile tedavi; Grup 4: karboplatin ile tedavi, döngüler senkronize; Grup 5: paklitaksel ile tedavi; Grup 6: paklitaksel ile tedavi, döngüler senkronize; Grup 7: karboplatin ve paklitaksel ile tedavi; Grup 8: karboplatin ve paklitaksel ile tedavi, döngüler senkronize. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında * $p < 0.05$; Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında ** $p < 0.01$; Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında *** $p < 0.001$. PBS, fosfat tamponlu salin

4.4. Tümör Dokularında Paklitaksel ve Karboplatin'in Kaspaz-3/7 Seviyelerine *In Vivo* Etkisi

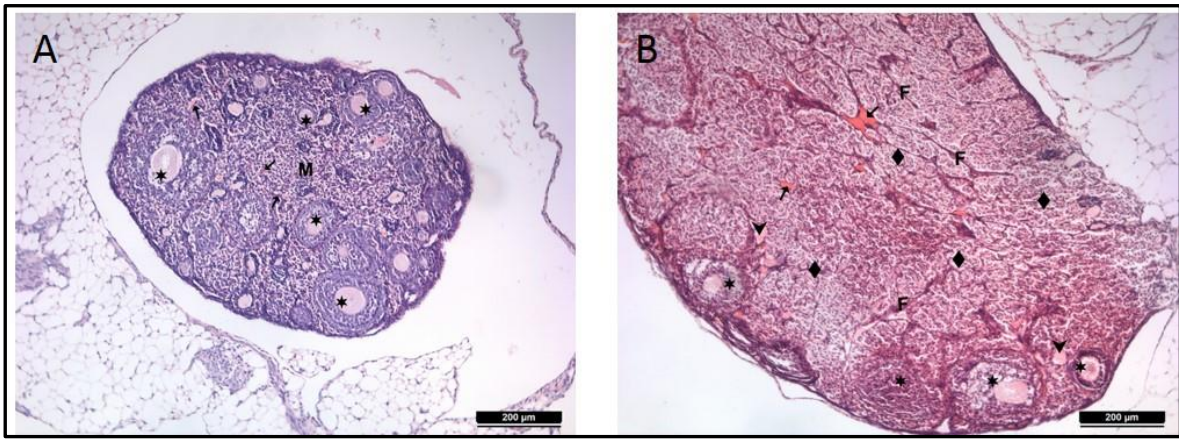
Paklitaksel ve karboplatin'in tümör dokularında apoptoz varlığını doğrulamak için kaspaz-3/7 aktivite seviyeleri belirlenmiştir. Kaspaz-3/7 aktivite seviyeleri, senkronizasyon sonrası döngüleri değişen farelere karboplatin (G4) ve paklitaksel (G6)'in tek başına uygulandığı gruplar ile normal döngüye sahip olan karboplatin (G3) ve paklitaksel (G5)'in tek başına uygulandığı gruplarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür ($p<0.05$). Ancak, senkronizasyon sonrası döngüleri değişen farelere karboplatin (G4) ve paklitaksel (G6)'in tek başına uygulandığı gruplar ile normal döngüye sahip olan karboplatin (G3) ve paklitaksel (G5)'in tek başına uygulandığı gruplara kıyasla kaspaz-3/7 aktivite düzeyinin artmasına rağmen bu artışın anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Ek olarak, kaspaz-3/7 aktivite düzeyinin kombine gruplarında kontrol gruplarına kıyasla önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir ($p<0.01$, $p<0.001$). Ayrıca, senkronizasyon sonrası döngüleri değişen farelere karboplatin ve paklitaksel uygulanan grupta (G8) normal döngüye sahip olan karboplatin ve paklitaksel uygulanan gruba (G7) kıyasla kaspaz-3/7 aktivite düzeyinin anlamlı ölçüde arttığı görülmüştür ($p<0.05$; Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Paklitaksel ve/veya Karboplatin'in tümör dokularındaki kaspaz-3/7 aktivite seviyeleri üzerindeki etkileri. Veriler ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Gösterilen sonuçlar üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında * $p<0.05$; Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında ** $p<0.01$; Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında *** $p<0.001$; G7 grubu ile karşılaştırıldığında # $p<0.05$. G1: Grup 1; G2: Grup 2; G3: Grup 3; G4: Grup 4; G5: Grup 5; G6: Grup 6; G7: Grup 7; G8: Grup 8

4.5. Hematoksilen - Eozin Sonuçları

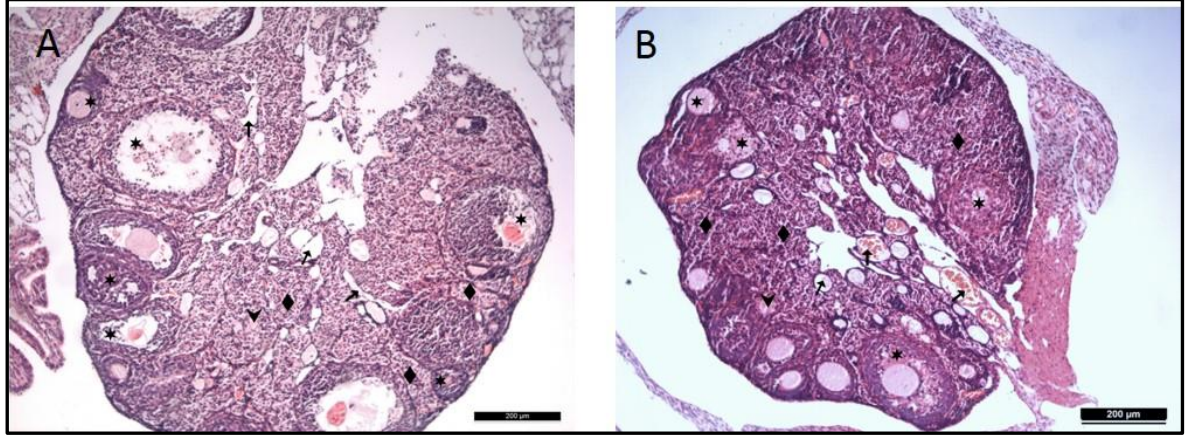
Deneysel kanser oluşturulan ve PBS uygulanan sham kontrol gruplarında, over genelinin tümör dokusundan oluştuğu ilgi çekmiştir. Tümör dokusunda yer yer fibröz bantlar oluştuğu gözlenmiştir. Kortekste az sayıdaki folikülün kapsül altına sıkışmış görüntüsü dikkati çekerken, mevcut tüm foliküllerin de dejenere olduğu belirlenmiştir. Tümör hücre gruplarının arasında yer yer hiyalin madde birikimi ve kapiller dilatasyon ilgi çekmiştir (Resim 4.2).



Resim 4.2. (A) Deneysel kanser modeli oluşturulan sham kontrol grubu. Kortekste farklı gelişim evrelerindeki foliküller (★), medulla (M), kapillerler (↑) normal yapıları ile ayırd edilmektedir. (B) Deneysel kanser modeli oluşturulan sirkadiyen döngü uyumlu sham kontrol grubu. Over genelinde tümör dokusu (◆), tümör dokularının arasında fibröz batlar (F), Kortekste az sayıda dejenere foliküller (★), kapiller dilatasyon (↑) ve yer yer hiyalin madde birikimi (▼) dikkati çekmektedir (Hematoksilen - Eosin X100)

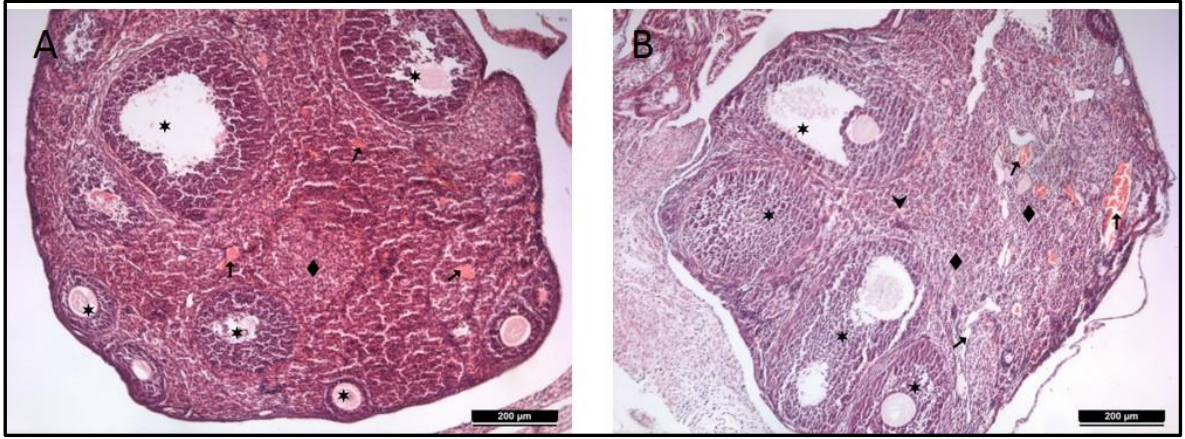
Deneysel kanser modelinde paklitaksel uygulanan grupta (Resim 4.3 (A)), over tümör yaygınlığının göreceli azaldığı dikkati çekmiştir. Bu grupta gelişimin çeşitli aşamalarında gözlenen foliküller, kanser grubuna kıyasla oldukça fazlaydı. Ancak bu grupta da özellikle antral foliküllerde dejeneratif değişiklikler devam ediyordu. Tümör yayılımının organın medullar bölgesinde yoğun olmakla birlikte perifoliküler alanda da kısmi varlığı dikkat çekmiştir. Kapiller dilatasyonun bu bu grupta da belirgindi. Yer yer intersellüler hiyalin birikimi de izlenmiştir. Deneysel kanser modelinde sirkadiyen döngü uyumlu paklitaksel uygulanan grupta (Resim 4.3 (B)), sirkadiyen ritim gözetilmeden uygulama yapılan gruba benzer histomorfolojik görünüm dikkat çekmiştir. Bu grupta da medullada daha yoğun olmakla birlikte perifoliküler alanda da tümör hücrelerinin varlığı belirgindi. Özellikle antral

foliküllerde dejenerasyon ilgi çekiciydi. Kapiller dilatasyon ve hyalin birikim belirgindi (Resim 4.3).



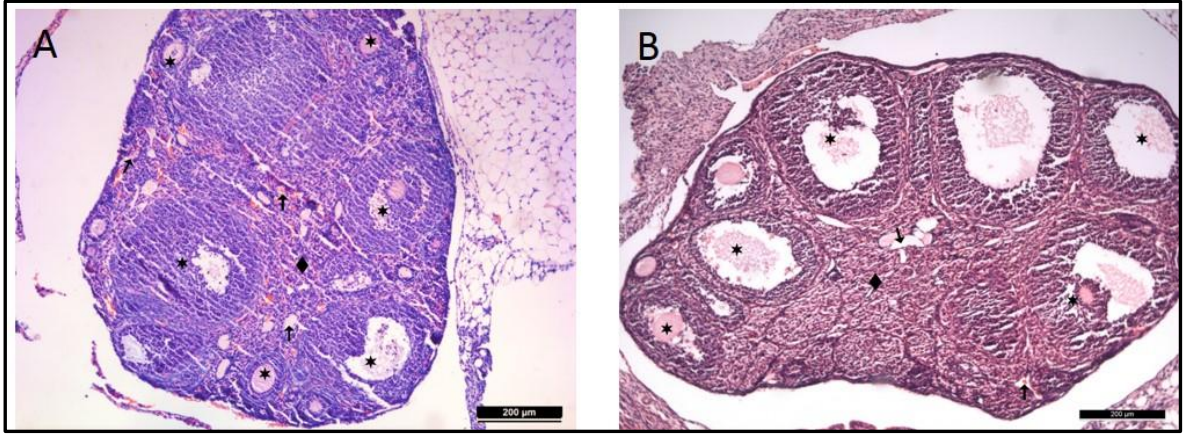
Resim 4.3. (A) Deneysel kanser modelinde Paklitaksel uygulanan grup. Tümör dokusunun (◆) genel olarak medulla bölgesinde yoğun olmakla birlikte perifoliküler alandada varlığı izlenmektedir. Kortekste foliküllerin (★) göreceli arttığı ancak çoğunun dejenere olduğu, kapiller dilatasyon (↑) ve yer yer hyalin madde birikimi (▼) dikkat çekmektedir. (B) Deneysel kanser modelinde sirkadiyen döngü uyumlu Paklitaksel uygulanan grup. Tümör dokusunun (◆) medullada yoğun olmakla birlikte perifoliküler alanda da olduğu görülmektedir. Kortekste farklı gelişim evrelerindeki foliküllerin (★) dejeneratif değişikliğe sahip oldukları izlenirken, kapiller dilatasyon (↑) hyalin madde birikimi (▼) belirgin olarak izlenmektedir (Hematoksilen – Eosin X100)

Deneysel kanser modelinde karboplatin uygulanan grupta (Resim 4.4 (A)), tümör alanının medulla ile sınırlandığı görülmüştür. Kortekste gelişimin farklı evrelerindeki foliküller izlenmiştir. Foliküllerde yoğun dejenerasyon izlenmese de yer yer şekilsel bozukluk gösterdikleri belirgindi. Medullada kapiller dilatasyon ve azalmış interselüler hyalin birikimi görülmüştür. Deneysel kanser modelinde sirkadiyen döngü uyumlu Karboplatin uygulanan grupta (4.4 (B)), over genelinde tümör yayılımının son derece sınırlandığı, medullada dar bir alanda varlığı dikkat çekmiştir. Kortekste farklı gelişim evrelerinde çok sayıda folikül ayırt edilmiştir. Foliküllerin, sirkadiyen ritim göz ardı edilerek Karboplatin uygulanan grupla karşılaştırıldığında, şekilsel dejeneratif değişikliğin ortadan kalktığı dikkat çekmiştir. Kapiller dilatasyonun bu grupta göreceli azaldığı gözlenmiştir. İnterselüler hyalin madde birikimi izlenmemiştir (Resim 4.4).



Resim 4.4. (A) Deneyisel kanser modelinde Karboplatin uygulanan grup. Tümör dokusunun (◆) medulla bölgesinde sınırlandığı izleniyor. Kortekste farklı gelişim evrelerindeki foliküllerin (★) yer yer şekilsel bozukluk göstermekle birlikte normal yapıda oldukları dikkati çekerken, kapiller dilatasyon (↑) ve azalmış miktarda hiyalin madde birikimi (▼) görülmektedir. (B) Deneyisel kanser modelinde sirkadiyen döngü uyumlu Karboplatin uygulanan grup. Tümör dokusunun (◆) genel olarak medulla bölgesinde yoğun olmakla birlikte perifoliküler alandada varlığı izlenmektedir. Kortekste foliküllerin (★) göreceli arttığı ancak çoğunun dejenere olduğu, kapiller dilatasyon (↑) ve yer yer hiyalin madde birikimi (▼) dikkat çekmektedir (Hematoksilen – Eosin X100)

Deneyisel kanser modelinde paklitaksel ve karboplatin'in birlikte uygulandığı grupta (Resim 4.5 (A)), tümör hücreleri belirginliğini kaybederken, over dokusu normal histomorfolojik özelliği ile ayırt edilmiştir. Kortekste çok sayıda folikül gözlenmiştir. Ancak özellikle antral foliküllerin, kontrol grubundan ayrıcalıklı olarak dejeneratif özellik gösterdiği ilgiyi çekmiştir. Kapiller dilatasyonun bu grupta azaldığı görülmüştür. İnterselüler hiyalin madde birikimi izlenmemiştir. Mevcut bulgular kanser modelinde ortak ilaç kullanımında karboplatin'in baskın etkide olduğunu göstermiştir. Deneyisel kanser modelinde sirkadiyen ritim gözetilerek paklitaksel ve karboplatin uygulanan grupta (Resim 4.5 (B)), tümör alanının medullar bölgede sınırlı kaldığı dikkati çekmiştir. Kortekste foliküller belirgin olarak izlenirken, sirkadiyen ritim gözetilmeden paklitaksel uygulanan gruba benzer histomorfolojik görünüm dikkati çekmiştir. Ancak bu grupta antral foliküllerde dejenerasyonun göreceli azaldığı, normal histolojik yapıya sahip antral foliküllerin de varlığı ilgi çekicidir. Dejenere foliküllerde granüloza katmanında interselüler ödem, antruma hücresel dökülme ve granüloza katman kalınlığında değişimler belirgin olarak izlenmiştir. Bu grupta kapiller dilatasyonun azaldığı da belirgin olarak gözlenmiştir. İnterselüler hiyalin madde birikimi izlenmemiştir (Resim 4.5).



Resim 4.5. (A) Deneysel kanser modelinde paklitaksel ve karboplatinin birlikte uygulandığı grup. Tümör dokusunun (◆) belirginliğini ve yaygınlığını kaybettiği ilgiyi çekiyor. Kortekste farklı gelişim evrelerindeki foliküllerin (★) varlığı, ancak yer yer dejeneratif değişikliğe sahip oldukları izlenirken, azalmış kapiller dilatasyon (↑) görülmektedir. (B) Deneysel kanser modelinde sirkadiyen döngü uyumlu paklitaksel ve karboplatinin birlikte uygulandığı grup. Tümör dokusunun (◆) medulla bölgesinde sınırlandığı izlenmektedir. Kortekste gözlenen çok sayıdaki folikülde (★) dejenerasyonun göreceli azaldığı görülürken, kapiller dilatasyonda da (↑) azalma ilgiyi çekmektedir (Hematoksilen – Eosin X100)

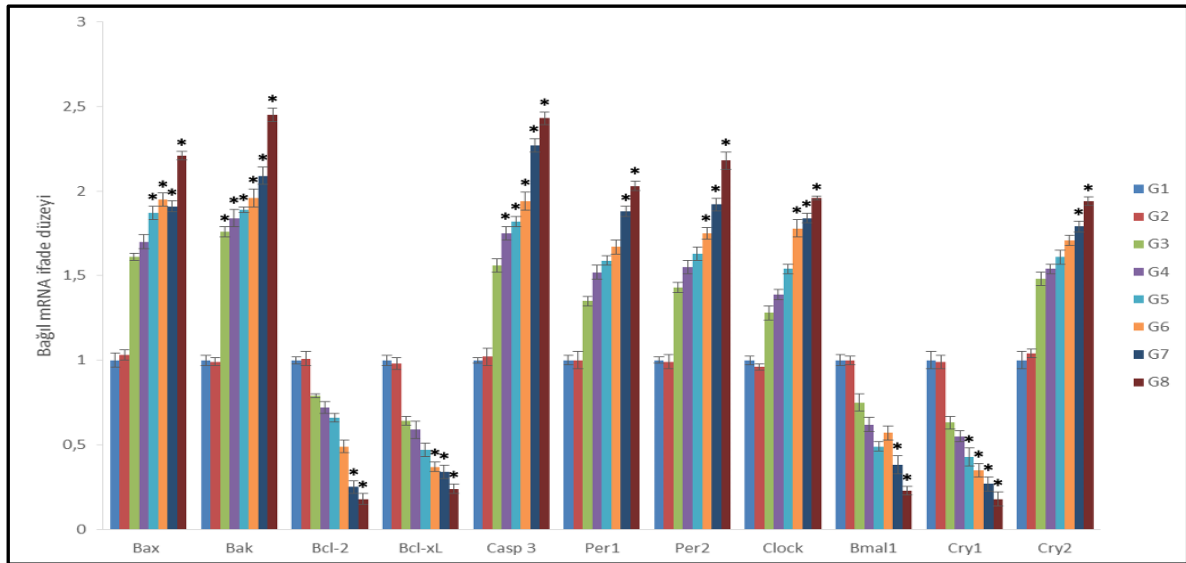
Sonuç olarak kanser tedavisinde karboplatin'in paklitaksel uygulamasına kıyasla daha etkin olduğu, bu etkinin sirkadiyen ritm gözetilerek yapılan uygulamada daha belirgin gözlendiği dikkati çekmiştir. Her iki ajanın birlikte uygulandığı gruplarda ise sirkadiyen ritm uygulamasının, göz ardı edilen gruba karşı çok etkili olmadığı, sirkadiyen ritm gözetilerek yapılan ikili tedavide paklitaksel baskın etkinin gözlendiği dikkati çekmiştir. Bu bulgular ışığında yapılan çalışmada en etkili uygulamanın sirkadiyen ritm gözetilerek Karboplatin tedavisi olduğu kanısına varılmıştır.

4.6. Paklitaksel ve Karboplatin'in Apoptoz ve Sirkadiyen Ritm ile İlişkili Genlerin *In vivo* mRNA Seviyelerine Etkisi

Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL, Casp3, Per1, Per2, Clock, Bmal1, Cry1 ve Cry2 genlerinin mRNA ifade düzeyleri qPCR analizi ile değerlendirilmiştir. Bax mRNA düzeyinin senkronizasyon sonrası döngüleri değişen farelere karboplatin (G4)'in tek başına uygulandığı grupta normal döngüye sahip olan karboplatin (G3)'in tek başına uygulandığı gruba ve kontrol gruplarına kıyasla arttığı görülmekle birlikte bu artışın anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Bak ve Casp3 mRNA ifade düzeylerinin G3 ve G4 gruplarında kontrol gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür ($p<0.05$). Ancak, Bak ve Casp3 mRNA ifade düzeylerinin G4 grubunda G3 grubuna kıyasla anlamlı düzeyde arttığı görülmekle birlikte bu artışın anlamlı

olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Bax, Bak ve Casp3 mRNA ifade düzeylerinin senkronizasyon sonrası döngüleri değişen farelere paklitaksel (G6)'in tek başına uygulandığı grupta normal döngüye sahip olan Paklitaksel (G5)'in tek başına uygulandığı gruba kıyasla arttığı görülmekle birlikte bu artışın anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Bax, Bak ve Casp3 mRNA ifade düzeylerinin G5 ve G6 gruplarında kontrol gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür ($p<0.05$). Yine, Bax, Bak ve Casp3 mRNA ifade düzeylerinin kombine gruplarda kontrol gruplarına kıyasla önemli ölçüde arttığı ($p<0.05$), ancak senkronizasyon sonrası döngüleri değişen farelere Karboplatin ve Paklitaksel uygulanan grupta (G8) normal döngüye sahip olan Karboplatin ve Paklitaksel uygulanan gruba (G7) kıyasla Bax, Bak ve Casp3 mRNA ifade düzeylerinin arttığı görülmekle birlikte bu artışın anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).

Bcl-2 ve Bcl-xL mRNA ifade düzeylerinin G3 ve G4 gruplarında kontrol gruplarına kıyasla azalış görülmekle birlikte bu azalışın anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Yine Bcl-2 ve Bcl-xL mRNA ifade düzeylerinin G5 ve G6 gruplarında kontrol gruplarına kıyasla azalış görülmekle birlikte bu azalışın anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Bcl-2 ve Bcl-xL mRNA ifade düzeylerinin G7 ve G8 kombine gruplarında kontrol gruplarına kıyasla önemli ölçüde azaldığı ($p<0.05$), ancak G8 grubunda G7 grubuna kıyasla Bcl-2 ve Bcl-xL mRNA ifade düzeylerinin azaldığı görülmekle birlikte bu azalışın anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).



Şekil 4.5. Karboplatin ve/veya Paklitaksel'in apoptoz ve sirkadiyen ritim ile ilişkili mRNA ifade düzeyleri üzerindeki etkileri. Veriler ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Gösterilen sonuçlar üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında $*p<0.05$. G1: Grup 1; G2: Grup 2; G3: Grup 3; G4: Grup 4; G5: Grup 5; G6: Grup 6; G7: Grup 7; G8: Grup 8

Per1, Per2, Clock ve Cry2 mRNA ifade düzeylerinin G3, G4, G5 ve G6 gruplarında kontrol gruplarına kıyasla artış görülmekle birlikte bu artışın anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Per1, Per2, Clock ve Cry2 mRNA ifade düzeylerinin G7 ve G8 kombine gruplarında kontrol gruplarına kıyasla önemli ölçüde arttığı ($p<0.05$), ancak G8 grubunda G7 grubuna kıyasla Per1, Per2, Clock ve Cry2 mRNA ifade düzeylerinin arttığı görülmekle birlikte bu artışın anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).

Bmal1 mRNA ifade düzeyinin G3, G4, G5 ve G6 gruplarında kontrol gruplarına kıyasla azalış görülmekle birlikte bu azalışın anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Bmal1 mRNA ifade düzeyinin G7 ve G8 kombine gruplarında kontrol gruplarına kıyasla önemli ölçüde azaldığı ($p<0.05$), ancak G8 grubunda G7 grubuna kıyasla Bmal1 mRNA ifade düzeyinin azaldığı görülmekle birlikte bu azalışın anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Cry1 mRNA ifade düzeyinin G3 ve G4 gruplarında kontrol gruplarına kıyasla azalış görülmekle birlikte bu azalışın anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Yine Cry1 mRNA ifade düzeyinin G5 ve G6 gruplarında kontrol gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde azalış olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Cry1 mRNA ifade düzeylerinin G7 ve G8 kombine gruplarında kontrol gruplarına kıyasla önemli ölçüde azaldığı ($p<0.05$), ancak G8 grubunda G7 grubuna kıyasla Cry1 mRNA ifade düzeyinin azaldığı görülmekle birlikte bu azalışın anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).

5. TARTIŞMA

Over kanseri, kadın üreme sisteminde bulunan yumurta hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasından kaynaklanan ölümcül bir kanser türüdür ve jinekolojik kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir [26]. Over kanserinin prognozu, hastalığın evresine, histolojik tipine, tümör derecesine ve hastanın genel sağlık durumuna bağlı olarak değişebilir. Tedavi protokolü sitoredüktif cerrahi ve adjuvan kemoterapidir. Sitoredüktif cerrahi total abdominal histerektomi ve bilateral salpingoooferektomi, bulky lenf nodlarının diseksiyonu, total omentektomi ve peritoneal yüzeyler ve tüm metastatik lezyonların rezeksiyonunu kapsar [87]. Erken evredeki bazı olgular hariç (evre 1a, grad1, grad2) tüm hastalara kemoterapi uygulanır. Genellikle Karboplatin ve Paklitaksel gibi platin bazlı ajanlar standart tedavi protokolünü oluştururken, bu ajanların uygulanması neoadjuvan (cerrahiden önce) veya adjuvan (cerrahiden sonra) olabilir. Kemoterapi, over kanseri tedavisinde malign hücrelerin DNA'sına doğrudan hasar vererek hücre ölümünü tetikleyen temel yaklaşımlardan biridir. Ancak kemoterapötik ajanlar sağlıklı hücreleri de hedef alabilmekte, bu durum sistemik toksisiteye ve hastanın yaşam kalitesinde belirgin düşüşe neden olmaktadır [88]. Ayrıca, zamanla gelişen kemoterapi direnci, tedavi başarısını sınırlandıran önemli bir engel teşkil etmektedir [89]. Yeni kemoterapötik ajanlar ve kombinasyon stratejileri geliştirilerek tedavi seçenekleri çeşitlendirilmeye çalışılsa da, geleneksel kemoterapi uygulamalarında ilaçların biyolojik ritimlerden bağımsız şekilde uygulanması önemli bir sınırlılık oluşturmaktadır. Kemoterapi, kanser hücrelerinin DNA yapısını hedef alarak sitotoksik etki göstermeyi amaçlarken, aynı zamanda sağlıklı hücrelerde de ciddi hasarlara yol açabilmekte ve bu durum hastalarda yaygın yan etkilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, kemoterapötik ajanların uygulanma zamanının optimize edilmesi amacıyla geliştirilen kronokemoterapi yaklaşımı, son yıllarda ön plana çıkmaktadır. Kronokemoterapi, ilaç uygulamasını hastanın sirkadiyen ritmine uyumlu şekilde zamanlayarak hem tümör hücrelerinde duyarlılığı artırarak maksimum etkinlik sağlanmasını, hem de sağlıklı hücrelerde oluşabilecek toksik etkilerin en aza indirilmesini hedeflemektedir [39]. Bu amaçla bu tez çalışmasında, fare over kanser modelinde karboplatin ve paklitaksel'in sirkadiyen ritme bağlı olarak *in vitro* ve *in vivo* etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Sirkadiyen ritim; hücre döngüsü, DNA onarım mekanizmaları, ilaç metabolizması ve apoptoz gibi birçok temel biyolojik süreci düzenlemektedir. Çeşitli prelinik ve klinik çalışmalar, bazı kemoterapi ajanlarının günün belirli saatlerinde uygulandığında daha yüksek tümör hücre öldürücülüğü ve daha düşük sistemik toksisite ile ilişkilendirilebileceğini göstermektedir [8]. Bu

nedenle, bazı kemoterapötik ajanların biyolojik saate duyarlı olarak farklı zaman dilimlerinde daha etkili olduğu gösterilmiştir [90]. Örneğin, platin bazlı ajanların gece saatlerinde uygulandığında miyelosupresyon riskini azalttığı, ancak antitümör etkinliğini koruduğu bildirilmiştir [91]. Bu nedenle, over kanseri gibi kemoterapiye bağımlı tedavi protokollerinde kronoterapötik yaklaşımlar, hem tedavi başarısını artırabilecek hem de hastaların yaşam kalitesini iyileştirebilecek potansiyel bir strateji olarak değerlendirilmektedir [92].

Karboplatin ve Paklitaksel, farklı hücresel hedeflere etki eden kemoterapötik ajanlar olup, kombine kullanımlarının daha etkili ve kapsamlı bir antitümör yanıt sağlayacağı düşünülmektedir. Ancak çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, bu iki ajanın birlikte uygulanmasının, ID8 over kanseri hücrelerinde her iki ilacın da tek başına gösterdiği sitotoksik etkinin anlamlı düzeyde azaldığını göstermektedir. Özellikle sirkadiyen ritme uygun olarak yapılan tedavi uygulamalarında, kombinasyonun beklenen sinerjistik etkisinin ortaya çıkmadığı, aksine etkilerin birbiriyle dengelenerek toplam tedavi etkinliğinin azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuç, Printezi ve arkadaşlarının (2022) kronomodüle kemoterapi ile ilgili sistematik derlemesinde sunulan bulgularla paralellik göstermektedir. Söz konusu derlemede, farklı kemoterapi ajanlarının sirkadiyen ritme uygun olarak uygulanmasının toksisiteyi azaltabileceği, ancak tedavi etkinliğinin ilaç kombinasyonlarında karmaşık bir hal alabileceği vurgulanmıştır [93]. Dolayısıyla, çalışmamızda da saptandığı üzere, karboplatin ve paklitaksel'in birlikte uygulanmasının sirkadiyen ritme bağlı olarak tek başına uygulanan ilaçlara kıyasla daha az sitotoksik etki yaratması, kronomodüle kemoterapi uygulamalarında ilaç kombinasyonlarının dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgular, tedavi rejimlerinin kişiye ve biyolojik ritme özgü olarak yeniden tasarlanmasının gerekliliğine işaret etmektedir. Ancak literatür taraması yapıldığı zaman mevcut çalışmaların hiçbirinin, *in vitro* ve *in vivo* modellerde paklitaksel ve karboplatin uygulamasını sirkadiyen ritme göre kronoterapötik zamanlama ile değerlendirmedeği görülmüştür [94-96]. Bir çalışmada, paklitaksel + karboplatin + 5-FU kombinasyonunda kronomodüle uygulamanın etkili olabileceğine yönelik *retrospektif klinik analiz* sunulmasına rağmen, çalışma sadece hasta verileri üzerine yapılmış olup prelinik model içermediği görülmüştür [97]. Yine benzer şekilde yapılan bir başka deneysel model çalışmasında A2780 xenograft fare modelinde paklitaksel ve karboplatin'in birlikte uygulanmasının tümör küçültücü etkisi, erken FDG/FLT-PET ile doğrulanmıştır. Fakat bu çalışma ilaç zamanlamasının sabah/akşam şeklinde karşılaştırılmadığı ve standart aralıklarla doz uygulaması yapılan bir çalışmadır [98]. Ortotopik fare modellerinde (HeyA-8, SKOV3.ip1) yapılan bir başka çalışmada ise paklitaksel ve karboplatin'in birlikte tam doz uygulandığında

tümör kontrolünün ve sağkalım artışının olduğu, ancak kronoterapi türü zamanlama stratejisinin uygulanmadığı görülmüştür [99].

Literatürde over kanserinde paklitaksel ve karboplatin kombinasyonunun belirli saatlerde uygulanarak değerlendirildiği herhangi bir faz çalışması da bulunmamakla birlikte, Kanabrocki ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada tek vaka raporunda, over hastasında adriamisin ve cisplatin sabah/akşam, ardından öğle saatlerinde Taksol uygulamasının CA-125 düzeylerinde düşüşe neden olduğu görülmüştür [100]. Yine yapılan bir başka faz 3 çalışmasında, haftalık paklitaksel ve 3 haftada bir uygulanan karboplatin tedavisinin daha iyi yaşam kalitesi ve daha az toksik etki ile ilişkilendirildiği görülmüştür [101]. Sharma ve arkadaşlarının yaptıkları bir diğer çalışmada ise, platin dirençli tekrarlayan over kanseri hastalarında genişletilmiş haftalık doz yoğunluğu yaklaşımının umut verici sonuçlar verdiği ve hastalarda oluşan yan etkilerin tolere edilebilir düzeyde olduğu görülmüştür [102].

Çalışmamızda sirkadiyen ritme uygun olarak karboplatin ve paklitakselin birlikte uygulandığı gruplarda Per1 ve Per2 mRNA ifade düzeylerinin kontrol gruplarına göre kıyasla anlamlı bir artış izlenmiştir. Özellikle sirkadiyen ritme uygun olarak karboplatin ve paklitakselin birlikte uygulanan grubunda senkronizasyon sonrası döngüsü değişmesine rağmen Per1 ve Per2 mRNA ifade düzeylerindeki artış dikkat çekicidir. Bu bulgu, kemoterapinin hücre düzeyinde sirkadiyen saat genlerini etkileyebileceğini ve bu etkinin ritim değişikliğinden bağımsız olarak da ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir. Wang ve arkadaşlarının çalışmasında gece vardiyasında çalışan hastalarda Per1 ve Per2 genlerinin mRNA ifade düzeylerinin azaldığı, buna karşılık programlanmış hücre ölümüyle ilişkili bazı belirteçlerin ve bağışıklık sistemiyle ilişkili proteinlerin (IL-6, PD-1, PD-L1) mRNA ifade düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, bu değişimlerin PI3K/Akt sinyal yolunu ve bağışıklık faktörlerini etkileyerek kemoterapiye karşı olumsuz etki yarattığı da rapor edilmiştir [103]. Çalışmamızda ise, her iki kemoterapi uygulama koşulunda da (karboplatin ve paklitakselin birlikte uygulanan ve sirkadiyen ritme uygun olarak karboplatin ve paklitakselin birlikte uygulanan gruplarda), Per1 ve Per2 mRNA ifade düzeylerinde artış izlenmesi, bu genlerin kemoterapiye duyarlılıkta olumlu bir rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte, literatürde Per genlerinin hücre döngüsünde ve tümör baskılanmasında önemli işlevlere sahip olduğu, Per kaybının p16 aktivasyonunu ve sirkadiyen hücre döngüsü geçişini ortadan kaldırarak tümör hücrelerinde kontrolsüz çoğalma ve ilaç direnci gelişimine yol açabileceği gösterilmiştir [103]. Bizim çalışmamızda saptanan Per1 ve Per2 mRNA ifade düzeylerindeki artış, özellikle kombinasyon

tedavisi uygulanan gruplarda (hem normal hem de sirkadiyen ritmi değiştirilmiş koşullarda) ilaç direnciyle mücadelede ve tümör kontrolünde potansiyel bir avantaj sunabilir.

Sirkadiyen ritimdeki bozukluklara hücrenin cevabı DNA hasarı şeklinde olmaktadır. Apoptoza duyarlılığın artması kanser tedavisinin etkinliğinde farklılıklara neden olabilmektedir. Cry1/2 (sirkadiyen ritmi düzenleyen genler) ve p53 (tümör baskılayıcı gen) mutasyonu olan tümörler, sadece p53 mutasyonu olan tümörlere göre kemoteröpatik ilaçlara daha duyarlıdır [104]. Tedavide Cry gen baskılayıcıları kullanımı kemoterapinin etkinliğini artırabilmektedir [105]. Bizim çalışmamızda, karboplatin ve paklitaksel'in birlikte uygulandığı ve sirkadiyen ritme uygun olarak karboplatin ve paklitakselin birlikte uygulandığı gruplarda kontrol grubuna göre Cry1 mRNA ifade düzeyi azalmıştır. Bu gen ifadesinin ve aktivitelerinin değerlendirilmesi kanser tedavisinin hem etkinliğini artırmak hem de bireysel tedavi stratejilerini optimize etmek için potansiyel fırsatlar sunabilir.

Çalışmamızda Bmal1 mRNA ifade düzeyinin karboplatin ve paklitaksel'in birlikte uygulandığı ve sirkadiyen ritme uygun olarak karboplatin ve paklitakselin birlikte uygulandığı gruplarda kontrol gruplarına kıyasla önemli ölçüde azaldığı, ancak sirkadiyen ritme uygun olarak karboplatin ve paklitaksel'in birlikte uygulandığı grupta karboplatin ve paklitaksel'in birlikte uygulandığı gruba kıyasla Bmal1 mRNA ifade düzeyinin azaldığı görülmekle birlikte bu azalışın anlamlı olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar, Bmal1 geninin kemoterapiye yanıt ve sirkadiyen ritimle ilişkili biyolojik süreçlerdeki rolünü vurgulayan literatürle uyumludur. Tang ve arkadaşlarının dil skuamöz hücreli karsinom (TSCC) üzerine yaptıkları çalışmada, Bmal1 mRNA ifade düzeylerinin tümör dokularında azaldığı ve bu azalışın tümör gelişimini teşvik ettiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada, Bmal1'in overekspresyonunun hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu inhibe ettiği, ayrıca paklitaksel tedavisine duyarlılığı artırdığı bulunmuştur. Bu bulgular, Bmal1'in tümör baskılayıcı bir gen olarak işlev gördüğünü ve kemoterapi etkinliğini artırabileceğini göstermektedir [106]. Benzer şekilde, Niu ve arkadaşlarının kolorektal kanser hücrelerinde yaptıkları çalışmada, Bmal1'in pirimidin metabolizması yoluyla 5-fluorourasil (5-FU) etkinliğini artırdığı gösterilmiştir. Bu çalışma, Bmal1'in kemoterapiye duyarlılığı artırıcı bir rol oynayabileceğini ve sirkadiyen ritme dayalı tedavi stratejilerinin önemini vurgulamaktadır [107]. Ayrıca, Guo ve arkadaşlarının küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) üzerine yaptıkları çalışmada, immün kontrol noktası inhibitörlerinin (ICIs) sirkadiyen ritme göre uygulanmasının tedavi etkinliğini etkilediği gösterilmiştir. Bu çalışmada, sabah saatlerinde uygulanan ICIs tedavisinin tümör büyümesini daha fazla inhibe ettiği ve bu etkinin

BMAL1 ve PER2 mRNA ifade düzeyinin artışıyla ve PD-L1 seviyesinin azalması ile ilişkili olduğu bulunmuştur [108]. Bu literatür bulguları, çalışmamızda gözlemlediğiniz Bmal1 mRNA ifade düzeyindeki azalma ile uyumludur ve Bmal1'in over kanseri tedavisinde kemoterapiye yanıtı etkileyebilecek önemli bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir. Sirkadiyen ritmin bozulması, Bmal1 mRNA ifade düzeyini daha da azaltarak kemoterapi etkinliğini olumsuz yönde etkileyebilir. Bu nedenle, Bmal1'in mRNA ifade düzeylerinin izlenmesi ve sirkadiyen ritme uygun tedavi zamanlamalarının belirlenmesi, over kanseri tedavisinde daha etkili ve kişiselleştirilmiş yaklaşımlar geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

Over kanseri gibi malign tümörlerde apoptoz dünya çapında kanser tedavisi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Özellikle kemoterapi ve radyoterapi kanser hücrelerini hedef alarak apoptozu indüklemeyi amaçlar. Kaspazlar apoptozda rol oynayan enzimlerdir. Kaspaz-3/7 aktivasyonu kanser hücrelerinin apoptoz yoluyla ölümünü teşvik edebilir. Bu sebeple over kanserinde kullanılan ilaçların kaspazların aktivitesini artırması beklenmektedir. Kronokemoterapi tümör hücrelerinin en hassas olduğu dönemde verilirse Kaspaz-3/7 nin daha etkili bir şekilde aktive edilmesi sağlanabilir. Çalışmamızda Kaspaz-3/7 aktivite seviyeleri, senkronizasyon sonrası döngüleri değişen farelere karboplatin ve paklitaksel'in tek başına uygulandığı gruplar ile normal döngüye sahip olan karboplatin ve paklitaksel'in tek başına uygulandığı gruplarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür. Ayrıca, senkronizasyon sonrası döngüleri değişen farelere karboplatin ve paklitaksel uygulanan grupta normal döngüye sahip olan karboplatin ve paklitaksel uygulanan gruba kıyasla kaspaz-3/7 aktivite düzeyinin anlamlı ölçüde arttığı görülmüştür. Özellikle sirkadiyen ritmin değiştirildiği koşullarda uygulanan karboplatin ve paklitaksel'in, kaspaz-3/7 aktivitesini artırdığı ve bu etkinin normal döngüde tedavi edilen gruplara kıyasla daha belirgin olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, kemoterapi yanıtında biyolojik ritmin dikkate alınmasının, tedavi başarısını artırabilecek önemli bir strateji olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar, literatürdeki bazı çalışmalarla paralellik göstermektedir. Örneğin, Albuquerque ve arkadaşlarının 2023 yılında yayınladığı bir çalışmada, sirkadiyen ritmin paklitaksel tedavisinin etkinliği üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada, paklitaksel'in belirli zaman dilimlerinde uygulanmasının, kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitelerinde artışa yol açtığı ve bunun da apoptozu uyardığı gösterilmiştir. Ayrıca, Bmal1 geninin susturulmasının, paklitaksel'in hücre içi alımını ve apoptozu azalttığı bulunmuştur [109]. Bu bulgular, sirkadiyen ritmin kemoterapi etkinliği üzerinde önemli rol oynadığını ve tedavi zamanlamasının optimize edilmesinin tedavi başarısını artırabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda, kronokemoterapinin over kanseri tümör dokusunda anlamlı morfolojik değişikliklere yol açtığı gözlenmiştir. Sirkadiyen ritme uyumlu olarak uygulanan kemoterapi, tümör yayılımını belirgin şekilde sınırlandırmış, kortekste normal folikül yapılarının korunmasını sağlamış ve dejeneratif değişikliklerin azalmasına neden olmuştur. Ayrıca, tümör dokusunda fibröz bantlar, hyalin madde birikimi ve kapiller dilatasyon gibi patolojik bulguların da azaldığı izlenmiştir. Bu değişiklikler, tümör invazivitesinin azalmasına ve tedaviye yanıtın artmasına işaret etmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda da, kemoterapi sonrası over kanseri tümör dokularında benzer şekilde stromal fibrozis, hyalin değişiklikler ve vasküler değişiklikler gibi çeşitli histopatolojik bulguların tedavi yanıtının değerlendirilmesinde önemli olduğu bildirilmiştir [110]. Ayrıca, güncel bir çalışmada, tümörle ilişkili fibrozisin over kanserinin invazyonu ve peritoneal yayılımında rol oynadığı, stromal yapının ve fibröz bantların yeniden düzenlenmesinin tümörün agresifliğiyle doğrudan ilişkili olabileceği gösterilmiştir [111]. Bu nedenle, sirkadiyen ritme uygun zamanlanmış kemoterapinin tümör dokusunda oluşturduğu olumlu morfolojik değişiklikler, hastaların prognozu açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasının bazı kısıtlılıkları da bulunmaktadır. Öncelikle, elde edilen sonuçlar bir hayvan modeli (ID8 fare over kanser hücreleri) temelinde değerlendirilmiştir; bu nedenle bulguların insan kanser biyolojisine doğrudan genellenmesi kısıtlıdır. Ayrıca, sadece belirli doz ve zaman aralıklarında çalışılmış olup, farklı dozların ve alternatif kemoterapi ajanlarının etkileri değerlendirilmemiştir. Çalışmada yalnızca belirli sirkadiyen gen ifade düzeyleri ve apoptoz belirteçleri incelenmiştir, diğer potansiyel hücre ölüm yolları analiz edilememiştir. Ayrıca, sirkadiyen ritmin insanlardaki fizyolojik ve çevresel etkilerle çok daha karmaşık olduğu unutulmamalıdır. Tüm bu nedenlerle, bulgularımızın translasyonel potansiyelinin değerlendirilmesi ve klinik uygulamalara entegrasyonu için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, çalışmamızda elde edilen bulgular, kemoterapi zamanlamasının klasik uygulamalara göre optimize edilmesiyle, tedavi etkinliğinde anlamlı artışlar sağlanabileceğini göstermektedir. Ancak, araştırmamızın hücre ve hayvan modeli ile sınırlı olması, insanlarda doğrudan benzer sonuçların elde edilebileceği konusunda temkinli olunmasını gerektirmektedir. Sonuçlarımız, paklitaksel ve karboplatin'in sirkadiyen ritme uygun şekilde uygulanması over kanser tedavisi için umut verici bir terapötik strateji olabilir. Son olarak, paklitaksel ve karboplatin'in gelecekteki çalışmalarda farklı over kanseri modellerinde araştırılması önerilmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bulgularımız, kemoterapötik ajanların etkinliğinin yalnızca uygulanan ilacın türüne değil, aynı zamanda uygulama zamanlamasının biyolojik ritme uygunluğuna da bağlı olabileceğini göstermektedir. Ayrıca çalışmamız paklitaksel ve karboplatin gibi kemoterapi ajanlarının uygulanma zamanlamasının, over kanseri tedavisinde tümör yanıtı ve apoptoz mekanizmaları üzerinde anlamlı bir etki oluşturabileceğini ortaya koymaktadır. Sirkadiyen ritme uygun şekilde planlanan kemoterapötik uygulamalar, hem moleküler düzeyde apoptoz yanıtını artırmakta hem de tümör dokusunda morfolojik iyileşmeler sağlayarak tedavi etkinliğini olumlu yönde etkileyebilmektedir.

Gelecekteki araştırmalarda, farklı kanser türleri ve çeşitli kemoterapi kombinasyonlarında kronokemoterapinin etkinliği incelenmeli, klinik çalışmalar ile laboratuvar bulguları doğrulanmalıdır. Uzun dönem sağkalım, nüks oranları ve yaşam kalitesi gibi parametreler tedavi zamanlaması açısından değerlendirilmeli, bireyselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarında hastaların sirkadiyen biyolojisi mutlaka dikkate alınmalıdır. Sonuçların translasyonel değerinin ortaya konması için ileri moleküler analizlere ve klinik faz çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çerçevede, kemoterapi uygulamalarının biyolojik saat ritmine göre düzenlenmesi, over kanseri ve diğer malignitelerde daha etkili ve yan etkisi düşük tedavi protokollerinin geliştirilmesine olanak sağlayabilir.

KAYNAKLAR

1. Thull, T., and Kempton, D. (2024). Ovarian cancer: A review for primary care providers. *Official Journal of the American Academy of Physician Assistants*, 37(7), 32-36.
2. Liberto, J. M., Chen, S. Y., Shih, I. M., Wang, T. H., Wang, T. L., and Pisanic, T. R. (2022). Current and emerging methods for ovarian cancer screening and diagnostics: a comprehensive review. *Cancers*, 14(12), 2885.
3. Craig, A. D., Garcia, E., Peters, P. N., Chen, L. M., and Chapman, J. S. (2021). Primary treatment of advanced ovarian cancer: how does the 'real world' practice?. *Future Oncology (London, England)*, 17(34), 4687–4696.
4. Swift, B. E., Covens, A., Mintsopoulos, V., Parra-Herran, C., Bernardini, M. Q., Nofech-Mozes, S., and Hogen, L. (2022). The effect of complete surgical staging and adjuvant chemotherapy on survival in stage I, grade 1 and 2 endometrioid ovarian carcinoma. *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society*, 32(4), 525–531.
5. Bell, J., Brady, M. F., Young, R. C., Lage, J., Walker, J. L., Look, K. Y., Rose, G. S., Spirtos, N. M., and Gynecologic Oncology Group. (2006). Randomized phase III trial of three versus six cycles of adjuvant carboplatin and paclitaxel in early stage epithelial ovarian carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic Oncology*, 102(3), 432–439.
6. Bai, B., Ma, Y., Liu, D., Zhang, Y., Zhang, W., Shi, R., and Zhou, Q. (2024). DNA damage caused by chemotherapy has duality, and traditional Chinese medicine may be a better choice to reduce its toxicity. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1483160.
7. Gul, S., Rahim, F., Isin, S., Yilmaz, F., Ozturk, N., Turkay, M., and Kavakli, I. H. (2021). Structure-based design and classifications of small molecules regulating the circadian rhythm period. *Scientific Reports*, 11(1), 18510.
8. Innominato, P. F., Roche, V. P., Palesh, O. G., Ulusakarya, A., Spiegel, D., and Lévi, F. A. (2014). The circadian timing system in clinical oncology. *Annals of Medicine*, 46(4), 191–207.
9. Crosby, P., and Partch, C. L. (2020). New insights into non-transcriptional regulation of mammalian core clock proteins. *Journal of Cell Science*, 133(18), jcs241174.
10. El-Tanani, M., Rabbani, S. A., Ali, A. A., Alfaouri, I. G. A., Al Nsairat, H., Al-Ani, I. H., Aljabali, A. A., Rizzo, M., Patoulas, D., Khan, M. A., Parvez, S., and El-Tanani, Y. (2024). Circadian rhythms and cancer: implications for timing in therapy. *Discover Oncology*, 15(1), 767.
11. Kang, T. H., and Sancar, A. (2009). Circadian regulation of DNA excision repair: implications for chrono-chemotherapy. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(11), 1665–1667.
12. Granda, T. G., and Lévi, F. (2002). Tumor-based rhythms of anticancer efficacy in experimental models. *Chronobiology International*, 19(1), 21–41.

13. Yang, Y., Adebali, O., Wu, G., Selby, C. P., Chiou, Y. Y., Rashid, N., Hu, J., Hogenesch, J. B., and Sancar, A. (2018). Cisplatin-DNA adduct repair of transcribed genes is controlled by two circadian programs in mouse tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(21), E4777–E4785.
14. Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., and Longacre, M. (2013). Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 21087–21113.
15. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
16. Torgovnick, A., and Schumacher, B. (2015). DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Frontiers in Genetics*, 6, 157.
17. Fulda S. (2010). Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *International Journal of Cell Biology*, 2010, 370835.
18. Lewandowska, A. M., Rudzki, M., Rudzki, S., Lewandowski, T., and Laskowska, B. (2019). Environmental risk factors for cancer - review paper. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 26(1), 1–7.
19. Leong, S. P., Naxerova, K., Keller, L., Pantel, K., and Witte, M. (2022). Molecular mechanisms of cancer metastasis via the lymphatic versus the blood vessels. *Clinical & Experimental Metastasis*, 39(1), 159–179.
20. Sathyanarayanan, V., and Neelapu, S. S. (2015). Cancer immunotherapy: Strategies for personalization and combinatorial approaches. *Molecular Oncology*, 9(10), 2043–2053.
21. Qazi A. S. (2023). Introduction and overview of cancer therapeutics. *Cancer Treatment and Research*, 185, 1–13.
22. Wargo, J. A., Reuben, A., Cooper, Z. A., Oh, K. S., and Sullivan, R. J. (2015). Immune effects of chemotherapy, radiation, and targeted therapy and opportunities for combination with immunotherapy. *Seminars in Oncology*, 42(4), 601–616.
23. Armstrong, D. K., Alvarez, R. D., Backes, F. J., Bakkum-Gamez, J. N., Barroilhet, L., Behbakht, K., Berchuck, A., Chen, L. M., Chitiyo, V. C., Cristea, M., DeRosa, M., Eisenhauer, E. L., Gershenson, D. M., Gray, H. J., Grisham, R., Hakam, A., Jain, A., Karam, A., Konecny, G. E., Leath, C. A., Leiserowitz, G., Liu, J., Martin, L., Matei, D., McHale, M., McLean, K., Miller, D. S., Percac-Lima, S., Remmenga, S. W., Schorge, J., Stewart, D., Thaker, P. H., Vargas, R., Hendrickson, A. W., Werner, T. L., Zsiros, E., Dwyer, M. A, and Hang, L. (2022). NCCN Guidelines® insights: ovarian cancer, Version 3.2022. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 20(9), 972–980.
24. Kaku, T., Ogawa, S., Kawano, Y., Ohishi, Y., Kobayashi, H., Hirakawa, T., and Nakano, H. (2003). Histological classification of ovarian cancer. *Medical Electron Microscopy: Official Journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan*, 36(1), 9–17.

25. De Leo, A., Santini, D., Ceccarelli, C., Santandrea, G., Palicelli, A., Acquaviva, G., Chiarucci, F., Rosini, F., Ravegnini, G., Pession, A., Turchetti, D., Zamagni, C., Perrone, A. M., De Iaco, P., Tallini, G., and de Biase, D. (2021). What is new on ovarian carcinoma: Integrated morphologic and molecular analysis following the new 2020 World Health Organization classification of female genital tumors. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 11(4), 697.
26. Arora, T., Mullangi, S., Vadakekut, E. S., and Lekkala, M. R. (2024). *Epithelial ovarian cancer*. Boca Raton, FL: StatPearls Publishing, 2,8.
27. Galhenage, P., Zhou, Y., Perry, E., Loc, B., Fietz, K., Iyer, S., Reinhardt, F., Da Silva, T., Botchkarev, V., Chen, J., Crum, C. P., Weinberg, R. A., and Pathania, S. (2023). Replication stress and defective checkpoints make fallopian tube epithelial cells putative drivers of high-grade serous ovarian cancer. *Cell Reports*, 42(10), 113144.
28. Prat, J., and FIGO Committee on Gynecologic Oncology. (2014). Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 124(1), 1–5.
29. Hacker, N. F., and van der Burg, M. E. (1993). Advanced ovarian cancer. Debulking and intervention surgery. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 4(Suppl 4), 17–22.
30. Thigpen J. T. (1999). Limited-stage ovarian carcinoma. *Seminars in Oncology*, 26(6 Suppl 18), 29–33.
31. Chi, D. S., Eisenhauer, E. L., Zivanovic, O., Sonoda, Y., Abu-Rustum, N. R., Levine, D. A., Guile, M. W., Bristow, R. E., Aghajanian, C., and Barakat, R. R. (2009). Improved progression-free and overall survival in advanced ovarian cancer as a result of a change in surgical paradigm. *Gynecologic Oncology*, 114(1), 26–31.
32. Lee, M. X., and Tan, D. S. (2018). Weekly versus 3-weekly paclitaxel in combination with carboplatin in advanced ovarian cancer: which is the optimal adjuvant chemotherapy regimen?. *Journal of Gynecologic Oncology*, 29(6), e96.
33. Steer C. B. (2009). Chemotherapy for ovarian cancer in the older adult. *Current treatment Options in Oncology*, 10(3-4), 159–170.
34. Wang, D., and Lippard, S. J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews: Drug Discovery*, 4(4), 307–320.
35. du Bois, A., Reuss, A., Pujade-Lauraine, E., Harter, P., Ray-Coquard, I., and Pfisterer, J. (2009). Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer*, 115(6), 1234–1244.

36. McGuire, W. P., Hoskins, W. J., Brady, M. F., Kucera, P. R., Partridge, E. E., Look, K. Y., Clarke-Pearson, D. L., and Davidson, M. (1996). Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *The New England Journal of Medicine*, 334(1), 1–6.
37. Jordan, M. A., and Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews: Cancer*, 4(4), 253–265.
38. Lyman G. H. (2009). Impact of chemotherapy dose intensity on cancer patient outcomes. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 7(1), 99–108.
39. Lévi, F., Okyar, A., Dulong, S., Innominato, P. F., and Clairambault, J. (2010). Circadian timing in cancer treatments. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50, 377–421.
40. Lévi, F. (2006). Chronotherapeutics: the relevance of timing in cancer therapy. *Cancer Causes & Control*, 17(4), 611–621.
41. Jordan, M. A., Wendell, K., Gardiner, S., Derry, W. B., Copp, H., and Wilson, L. (1996). Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Research*, 56(4), 816–825.
42. Rogers B. B. (1993). Taxol: a promising new drug of the '90s. *Oncology Nursing Forum*, 20(10), 1483–1489.
43. Chen-Goodspeed, M., and Lee, C. C. (2007). Tumor suppression and circadian function. *Journal of Biological Rhythms*, 22(4), 291–298.
44. Moore, R. Y., and Eichler, V. B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*, 42(1), 201–206.
45. Berson, D. M., Dunn, F. A., and Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5557), 1070–1073.
46. Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M., and Yau, K. W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5557), 1065–1070.
47. Ding, J. M., Chen, D., Weber, E. T., Faiman, L. E., Rea, M. A., and Gillette, M. U. (1994). Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5191), 1713–1717.
48. Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepk, S. M., Hong, H. K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M., and Takahashi, J. S. (2004). PERIOD2: LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15), 5339–5346.
49. Zhang, R., Lahens, N. F., Ballance, H. I., Hughes, M. E., and Hogenesch, J. B. (2014). A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(45), 16219–16224.

50. Masri, S., and Sassone-Corsi, P. (2013). The circadian clock: a framework linking metabolism, epigenetics and neuronal function. *Nature Reviews: Neuroscience*, 14(1), 69–75.
51. Fu, L., and Lee, C. C. (2003). The circadian clock: Pacemaker and tumour suppressor. *Nature Reviews: Cancer*, 3(5), 350–361.
52. Takahashi, J. S., Hong, H. K., Ko, C. H., and McDearmon, E. L. (2008). The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nature Reviews: Genetics*, 9(10), 764–775.
53. Partch, C. L., Green, C. B., and Takahashi, J. S. (2014). Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends in Cell Biology*, 24(2), 90–99.
54. Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., and Schibler, U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 110(2), 251–260.
55. Hoffman, A. E., Yi, C. H., Zheng, T., Stevens, R. G., Leaderer, D., Zhang, Y., Holford, T. R., Hansen, J., Paulson, J., and Zhu, Y. (2010). CLOCK in breast tumorigenesis: genetic, epigenetic, and transcriptional profiling analyses. *Cancer Research*, 70(4), 1459–1468.
56. Huang, C., Zhang, C., Cao, Y., Li, J., and Bi, F. (2023). Major roles of the circadian clock in cancer. *Cancer Biology and Medicine*, 20(1), 1–24.
57. Motiei, M., Abu-Dawud, R., Relógio, A., and Assaf, C. (2024). Circadian rhythms in haematological malignancies: therapeutic potential and personalised interventions. *EBioMedicine*, 110, 105451.
58. Reszka, E., and Przybek, M. (2016). Circadian genes in breast cancer. *Advances in Clinical Chemistry*, 75, 53–70.
59. Battaglin, F., Chan, P., Pan, Y., Soni, S., Qu, M., Spiller, E. R., Castanon, S., Roussos Torres, E. T., Mumenthaler, S. M., Kay, S. A., and Lenz, H. J. (2021). Clocking cancer: the circadian clock as a target in cancer therapy. *Oncogene*, 40(18), 3187–3200.
60. Sulli, G., Lam, M. T. Y., and Panda, S. (2019). Interplay between circadian clock and cancer: New frontiers for cancer treatment. *Trends in Cancer*, 5(8), 475–494.
61. Kisamore, C. O., Elliott, B. D., DeVries, A. C., Nelson, R. J., and Walker, W. H. (2023). Chronotherapeutics for solid tumors. *Pharmaceutics*, 15(8), 2023.
62. Sancar, A., and Van Gelder, R. N. (2021). Clocks, cancer, and chronochemotherapy. *Science (New York, N.Y.)*, 371(6524), eabb0738.
63. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Gaddameedhi, S., Selby, C. P., Ye, R., Chiou, Y. Y., Kemp, M. G., Hu, J., Lee, J. H., and Ozturk, N. (2015). Circadian clock, cancer, and chemotherapy. *Biochemistry*, 54(2), 110–123.
64. Marcu, L. G. (2024). Circadian rhythm-based cancer therapy in randomised clinical trials. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 24(1-2), 29–39.

65. Koritala, B. S. C., Porter, K. I., Sarkar, S., and Gaddameedhi, S. (2022). Circadian disruption and cisplatin chronotherapy for mammary carcinoma. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 436, 115863.
66. Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.
67. Fadeel, B., Orrenius, S. (2005). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Journal of Internal Medicine*, 258(6), 479-517.
68. Green, D. R., and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5684), 626-629.
69. Green, D. R., and Llamby, F. (2015). Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(12), a006080.
70. Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., and Swanson, P. E. (2009). Cell death. *The New England Journal of Medicine*, 361(16), 1570-1583.
71. Youle, R. J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews: Molecular Cell Biology*, 9(1), 47-59.
72. Fulda, S., and Debatin, K. M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34), 4798-4811.
73. Cory, S., and Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews: Cancer*, 2(9), 647-656.
74. Taylor, R. C., Cullen, S. P., and Martin, S. J. (2008). Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 9(3), 231-241.
75. Deveraux, Q. L., and Reed, J. C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes and Development*, 13(3), 239-252.
76. Fulda, S. (2015). Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*, 31, 84-88.
77. Roby, K. F., Taylor, C. C., Sweetwood, J. P., Cheng, Y., Pace, J. L., Tawfik, O., Persons, D. L., Smith, P. G., and Terranova, P. F. (2000). Development of a syngeneic mouse model for events related to ovarian cancer. *Carcinogenesis*, 21(4), 585-591.
78. Ciucci, A., Buttarelli, M., Fagotti, A., Scambia, G., and Gallo, D. (2022). Preclinical models of epithelial ovarian cancer: practical considerations and challenges for a meaningful application. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(7), 364.
79. Cho, S., Sun, Y., Soisson, A. P., Dodson, M. K., Peterson, C. M., Jarboe, E. A., Kennedy, A. M., and Janát-Amsbury, M. M. (2013). Characterization and evaluation of pre-clinical suitability of a syngeneic orthotopic mouse ovarian cancer model. *Anticancer Research*, 33(4), 1317-1324.

80. Internet: Web: <https://www.merckmillipore.com/TR/tr/product/ID8-Mouse-Ovarian-Surface> Epithelial-Cell-Line,MM_NF SCC145?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F adresinden 18 Mart 2025'te alınmıştır.
81. Yeung, H. Y., Lo, P. C., Ng, D. K., and Fong, W. P. (2017). Anti-tumor immunity of BAM-SiPc-mediated vascular photodynamic therapy in a BALB/c mouse model. *Cellular and Molecular Immunology*, 14(2), 223–234.
82. Koehl, G. E., Andrassy, J., Guba, M., Richter, S., Kroemer, A., Scherer, M. N., Steinbauer, M., Graeb, C., Schlitt, H. J., Jauch, K. W., and Geissler, E. K. (2004). Rapamycin protects allografts from rejection while simultaneously attacking tumors in immunosuppressed mice. *Transplantation*, 77(9), 1319–1326.
83. Shah, D. K., Veith, J., Bernacki, R. J., and Balthasar, J. P. (2011). Evaluation of combined bevacizumab and intraperitoneal carboplatin or paclitaxel therapy in a mouse model of ovarian cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 68(4), 951–958.
84. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1(2), 581–585.
85. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), e36.
86. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408.
87. Martín-Cameán, M., Delgado-Sánchez, E., Piñera, A., Diestro, M. D., De Santiago, J., and Zapardiel, I. (2016). The role of surgery in advanced epithelial ovarian cancer. *ECancerMedicalScience*, 10, 666.
88. Giacchetti, S., Bjarnason, G., Garufi, C., Genet, D., Iacobelli, S., Tampellini, M., Smaaland, R., Focan, C., Coudert, B., Humblet, Y., Canon, J. L., Adenis, A., Lo Re, G., Carvalho, C., Schueller, J., Anciaux, N., Lentz, M. A., Baron, B., Gorlia, T., Lévi, F., and European Organisation for Research and Treatment of Cancer Chronotherapy Group. (2006). Phase III trial comparing 4-day chronomodulated therapy versus 2-day conventional delivery of fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin as first-line chemotherapy of metastatic colorectal cancer: the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Chronotherapy Group. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(22), 3562–3569.
89. Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B., and Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews: Cancer*, 13(10), 714–726.
90. Ballesta, A., Innominato, P. F., Dallmann, R., Rand, D. A., and Lévi, F. A. (2017). Systems chronotherapeutics. *Pharmacological Reviews*, 69(2), 161–199.

91. Innominato, P. F., Lévi, F. A., and Bjarnason, G. A. (2010). Chronotherapy and the molecular clock: Clinical implications in oncology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(9-10), 979–1001.
92. Amiama-Roig, A., Verdugo-Sivianes, E. M., Carnero, A., and Blanco, J. R. (2022). Chronotherapy: Circadian rhythms and their influence in cancer therapy. *Cancers*, 14(20), 5071.
93. Printezi, M. I., Kilgallen, A. B., Bond, M. J. G., Štibler, U., Putker, M., Teske, A. J., Cramer, M. J., Punt, C. J. A., Sluijter, J. P. G., Huitema, A. D. R., May, A. M., and van Laake, L. W. (2022). Toxicity and efficacy of chronomodulated chemotherapy: a systematic review. *The Lancet (Oncology)*, 23(3), e129–e143.
94. Kuittinen, T., Rovio, P., Luukkaala, T., Laurila, M., Grénman, S., Kallioniemi, A., and Mäenpää, J. (2020). Paclitaxel, carboplatin and 1,25-D3 inhibit proliferation of ovarian cancer cells *in vitro*. *Anticancer Research*, 40(6), 3129–3138.
95. Uruski, P., Sepetowska, A., Konieczna, C., Pakuła, M., Wyrwa, M., Tussupkaliyev, A., Tykarski, A., Mikuła-Pietrasik, J., and Książek, K. (2021). Primary high-grade serous ovarian cancer cells are sensitive to senescence induced by carboplatin and paclitaxel *in vitro*. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 26(1), 44.
96. Brodeur, M. N., Simeone, K., Leclerc-Deslauniers, K., Fleury, H., Carmona, E., Provencher, D. M., and Mes-Masson, A. M. (2021). Carboplatin response in preclinical models for ovarian cancer: comparison of 2D monolayers, spheroids, ex vivo tumors and *in vivo* models. *Scientific Reports*, 11(1), 18183.
97. Chen, D., Cheng, J., Yang, K., Ma, Y., and Yang, F. (2013). Retrospective analysis of chronomodulated chemotherapy versus conventional chemotherapy with paclitaxel, carboplatin, and 5-fluorouracil in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *OncoTargets and Therapy*, 6, 1507–1514.
98. Munk Jensen, M., Erichsen, K. D., Björkling, F., Madsen, J., Jensen, P. B., Sehested, M., Højgaard, L., and Kjær, A. (2013). Imaging of treatment response to the combination of carboplatin and paclitaxel in human ovarian cancer xenograft tumors in mice using FDG and FLT PET. *PloS One*, 8(12), e85126.
99. Mosley, S., Chen, J. H., Gaikwad, A., Nugent, E. K., and Smith, J. A. (2015). Evaluation of the impact of treatment delays and dose reductions in human ovarian cancer orthotopic mouse models. *Integrative Cancer Science and Therapeutics*, 2(6), 281-285.
100. Kanabrocki, E. L., Hermida, R. C., Haseman, M. B., Bettis, K., Young, R. M., Mathew, J. P., Potkul, R., and Hrushesky, W. J. (2006). Chronotherapy of ovarian cancer: effect on blood variables and serum cytokines. A case report. *La Clinica Terapeutica*, 157(4), 349–354.
101. Pignata, S., Scambia, G., Katsaros, D., Gallo, C., Pujade-Lauraine, E., De Placido, S., Bologna, A., Weber, B., Raspagliesi, F., Panici, P. B., Cormio, G., Sorio, R., Cavazzini, M. G., Ferrandina, G., Breda, E., Murgia, V., Sacco, C., Cinieri, S., Salutari, V., Ricci, C., and Gynecologic Cancer InterGroup (GCIg) Investigators. (2014). Carboplatin plus paclitaxel once a week versus every 3 weeks in patients with advanced ovarian cancer (MITO-7): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *The Lancet (Oncology)*, 15(4), 396–405.

102. Sharma, R., Graham, J., Mitchell, H., Brooks, A., Blagden, S., and Gabra, H. (2009). Extended weekly dose-dense paclitaxel/carboplatin is feasible and active in heavily pre-treated platinum-resistant recurrent ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 100(5), 707–712.
103. Wang, Z., Wang, H., Guo, H., Li, F., Wu, W., Zhang, S., and Wang, T. (2020). The circadian rhythm and core gene Period2 regulate the chemotherapy effect and multidrug resistance of ovarian cancer through the PI3K signaling pathway. *Bioscience Reports*, 40(11), BSR20202683.
104. Jia, M., Su, B., Mo, L., Qiu, W., Ying, J., Lin, P., Yang, B., Li, D., Wang, D., Xu, L., Li, H., Zhou, Z., Li, X., and Li, J. (2021). Circadian clock protein CRY1 prevents paclitaxel-induced senescence of bladder cancer cells by promoting p53 degradation. *Oncology Reports*, 45(3), 1033–1043.
105. Lee, J. H., and Sancar, A. (2011). Circadian clock disruption improves the efficacy of chemotherapy through p73-mediated apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(26), 10668–10672.
106. Tang, Q., Cheng, B., Xie, M., Chen, Y., Zhao, J., Zhou, X., and Chen, L. (2017). Circadian clock gene Bmal1 inhibits tumorigenesis and increases paclitaxel sensitivity in tongue squamous cell carcinoma. *Cancer Research*, 77(2), 532–544.
107. Niu, Y., Fan, X., Wang, Y., Lin, J., Hua, L., Li, X., Qian, R., and Lu, C. (2022). Genome-wide CRISPR screening reveals pyrimidine metabolic reprogramming in 5-FU chronochemotherapy of colorectal cancer. *Frontiers in Oncology*, 12, 949715.
108. Guo, X., Qin, L., Wang, X., Geng, Q., Li, D., Lu, Y., and Jiang, H. (2025). Chronological effects of immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer. *Immunology*, 174(4), 402–410.
109. Albuquerque, T., Neves, A. R., Paul, M., Biswas, S., Vuelta, E., García-Tuñón, I., Sánchez-Martin, M., Quintela, T., and Costa, D. (2023). A potential effect of circadian rhythm in the delivery/therapeutic performance of paclitaxel-dendrimer nanosystems. *Journal of Functional Biomaterials*, 14(7), 362.
110. Tiwana, K. K., Nibhoria, S., Kaur, M., Monga, T., and Gupta, R. (2015). Postchemotherapy histopathological evaluation of ovarian carcinoma: a 40-case study. *Chemotherapy Research and Practice*, 2015, 197871.
111. Fujimoto, H., Yoshihara, M., Rodgers, R., Iyoshi, S., Mogi, K., Miyamoto, E., Hayakawa, S., Hayashi, M., Nomura, S., Kitami, K., Uno, K., Sugiyama, M., Koya, Y., Yamakita, Y., Nawa, A., Enomoto, A., Ricciardelli, C., and Kajiyama, H. (2024). Tumor-associated fibrosis: a unique mechanism promoting ovarian cancer metastasis and peritoneal dissemination. *Cancer Metastasis Reviews*, 43(3), 1037–1053.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 02.09.2021-E.156321



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : E-66332047-604.01.02-156321
Konu : Değerlendirme ve Onay

02.09.2021

Sayın Doç. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Atiye Seda YAR SAĞLAM, Gülnur TAKE KAPLANOĞLU, Gökçe Nur ARIK, Yağmur SOYKAN, Duygu Deniz USTA SALİMLİ'den oluşan, G.Ü.ET-21.065 kod numaralı ve "**Fare Over Kanseri Hücrelerinde Karboplatin ve Paklitaksel'in Sirkadiyen Ritme Bağlı Olarak in vitro ve in vivo Etkilerinin Belirlenmesi**" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-21.065 and entitled "**Determination of in vitro and in vivo effects of carboplatin and paclitaxel in mouse ovarian cancer cells depending on circadian rhythm**" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

Hayvan Türü :Fare C57BL/6
Hayvan Sayısı :96

Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :BSEZT0FRF8

Belge Takip Adresi : <https://belgedogrulama.gazi.edu.tr/belgedogrulama.aspx>

Emniyet Mahallesi Bandırma Caddesi No :6/1 06560 Yenimahalle/ANKARA
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/
Kep Adresi: gaziuniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için :Esengül BOŞNAK
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:03122022666



Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-1. (devam) Etik Kurul Onayı

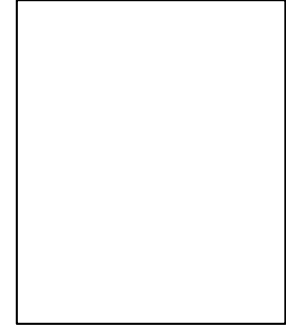
GAZİ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 27/08/2021		TOPLANTI SAYISI : 06	
ADI-SOYADI		İMZA	
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)			
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)			
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU			
Prof.Dr.Tuncay PEKER			
Prof.Dr.Fatma AKAR			
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIÇIK			
Prof.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ			
Prof.Dr.İpek SÜNTAR			
Doç.Dr.Emre BARIŞ			
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR			
Öğr.Gör.Dr.Şeyda DİKER			
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM			
Vet.Hek.Burcu AVCI			
Osman İÇ			

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : SOYKAN, Yağmur
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri
 Medeni hali
 Tel
 E-posta



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı	Devam ediyor
Yandal Uzmanlık	Gazi Üniversitesi Jinekolojik Onkoloji Cerrahisi	2021
Tıpta Uzmanlık	Gazi Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum	2017
Lisans	Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi	2012
Lise	Bozkır Anadolu Lisesi	2005

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2024- devam ediyor	Kırıkkale Yüksek İhtisas Hastanesi.	Yandal uzmanı (Op. Dr.)
2022- 2024	Gaziantep Cengiz Gökçek Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi	Yandal uz
2017- 2018	Kulu Devlet Hastanesi	Uzman
2012	Bozkır Toplum Sağlığı Merkezi	Pratisyen

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Ulusal/Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

- Kimyon, G., Taşçı, T., Soykan, Y., Karalök, A., Üreyen, I., Boran, N., Turan, T. ve Tulunay, G. (2014). Analysis of sclerosing stromal ovarian tumor cases. *Gazi Medical Journal*, 25, 100-102.

2. Tokdemir-Çalış, P., Seymen, M., Soykan, Y., Delen, K., Aral, B., Kaplanoğlu, G. T. ve Karçaaltıncaba, D. (2021). Does exposure of smart phones during pregnancy affect the siblings ovarian reserve ? A rat model study. *Fetal and Pediatric Pathology* 40(2), 142-152.
3. Turan, G., Kul, G. ve Soykan, Y. (2021). Knowledge, attitude and behaviors of people about Human Papillomavirus(HPV) and HPV vaccine: A single-center cross-sectional study. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 18, 225-232.
4. Kozan, R., Bayhan, H., Soykan, Y., Anadol, A. Z., Şare, M. ve Aytaç, A.B. (2020). Acute appendicitis in pregnancy: How to manage?. *Şişli Etfal Tıp Bülteni*, 54(4), 457-462.
5. Soykan, Y., Demirdağ, E. ve Nas, T. (2020). Successful management of acute heavy menstrual bleeding with Foley's catheter of a patient under combined antiplatelet therapy for cardiac disease: a case report. *Gazi Medical Journal*, 31(4), 683-685.
6. Işık, G., Sütçüoğlu, B., Soykan, Y., Kazancı, F., Erdem, Ö. ve Onan, M. A. (2025). Endometrium kanseri hastalarında preoperatif 3D ultrasonografi VOCAL teknikle myometrial invazyon derinliği ve evre predikasyonu: Prospektif çalışma. *Hitit Medical Journal*, 7(1), 88-94.
7. Soykan, Y., Dikmen, A. U., Erdem, Ö. ve Onan, M. A. (2025). The effects of lower uterine segment involvement on angiolymphatic invasion, tumor grade, and staging in patients with early-stage endometrioid type endometrial cancer. *Annals of Clinical and Analytical Medicine*, 16(4), 276-280.
8. Soykan, Y. ve Yar-Sağlam, A. S. (2025). Over kanseri, sirkadiyen ritim ve kronokemoterapi. *Jinekoloji-Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi*, 22(1), 126-132.

Ulusal/Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. Öztürk, M., Akdulum, M. F., Necefaliyeva, A., Soykan, Y., Güler, İ., Onan, M. A. ve Güner, H. (2015). Vulvar endometriosis. 13th National Gynecology and Obstetrics Congress, Antalya, Türkiye.
2. Öztürk, M., Necefaliyeva, A., Soykan, Y., Akdulum, M. F., Güler, İ., Onan, M. A. ve Güner, H. (2015). *Androgen-secreting granüloza cell tumor*. 13th National Gynecology and Obstetrics Congress, Antalya, Türkiye.
3. Öztürk, M., Dumlu, F. A., Soykan, Y., Güler, İ. ve Bozkurt, N. (2015). *Adölesan dönemde saptanan intratubal kist*. 13th National Gynecology and Obstetrics Congress, Antalya, Türkiye.
4. Karçaaltıncaba, D., Tokdemir-Çalış P., Özek, M. A., Soykan, Y., Büyükkaragöz, B. ve Helvacı, Ö. (2016). *Management of maternal focal segmental glomerulosclerosis diagnosis during pregnancy: A case report*. 15th World Congress in Fetal Medicine, Mallorca, Spain.
5. Soykan, Y., Tokdemir-Çalış, P. ve Karçaaltıncaba, D. (2017). *Antenatal diagnosis of distal arthrogryposes Type 1: Case report*. 25th European Congress of Obstetrics and Gynaecology – 15th Congress of Turkish Society of Obstetrics and Gynaecology, Antalya, Türkiye.

6. Soykan, Y., Bostancı, E. İ. ve Onan, M. A. (2018). *Predictability of lower uterine segment to angiolymphatic invasion, survival and lymph node involvement for early stage endometrioid endometrial cancer*. 1st International and 16th National Gynecologic Oncology Congress, November 21-25, Antalya, Türkiye.
7. Tokdemir-Çalış, P., Seymen, M., Soykan, Y., Delen, K., Aral, B., Kaplanoğlu, G. T. ve Karçaaltıncaba, D. (2018). *Does exposure of smart phones during pregnancy affect the siblings ovarian reserve? A rat model study*. 8th Biannual Congress of Turkish Society of Reproductive Medicine November 8-11, Antalya, Türkiye.
8. Kazancı, F., Işık, G., Soykan, Y., Onan, M. A. ve Erdem, Ö. (2019). *Anuler tubuluslu seks kord tümör ile eş zamanlı kontralateral overde torsiyone disgerminom olan primer amenoreik nadir bir olgu*. Batı Akdeniz ve Göller Bölgesi Jinekolojik Onkoloji Sempozyumu, 1 Haziran, Isparta, Türkiye.
9. Kutlucan, H., Soykan, Y. ve Bozkurt, N. (2020). *Total desensus uteri ve sistorektoselli olgunun laparoskopi eşliğinde yönetimi*. 3. Minimal İnvaziv Jinekolojik Cerrahi Kongresi, 19-22 Şubat, İstanbul, Türkiye.
10. Soykan, Y. ve Cevher-Akdulum, M. F. (2020). *Tuboovaryen abse olgusuna minimal invaziv yaklaşım*. COVID-19 Pandemi Sürecinde Kadın Sağlığı ve Üreme Sağlığına Bakış Sempozyumu, 26-27 Aralık, Ankara, Türkiye.
11. Soykan, Y., Cevher-Akdulum, M. F. ve Onan, M. A. (2021). *Contralateral inguinal lymph node metastasis both breast and ovarian carcinoma: a rare case report*. International Gynaecology and Neonatal Days, Ankara, Türkiye.
12. Cevher-Akdulum, M. F. ve Soykan, Y. (2021). *A case of gastrointestinal stromal tumor presenting as a recto-vaginal septal mass*. 2. Uluslararası KKTC Obstetrik ve Jinekoloji Kongresi, 2-5 Eylül, Girne, KKTC.
13. Soykan, Y., Tufan, A. D. ve Onan, M. A. (2021). *A case report: Steroid cell tumour of the ovary*. 18. National Gynecology and Obstetrics Congress, 1-5 Aralık, Antalya, Türkiye.
14. Safarova, S., Soykan, Y., Cevher-Akdulum, M. F. ve Onan, M. A. (2021). *Adölesan çağda görülen desmoid tümör nedeniyle yapılan laparoskopik ooferopeksi olgu sunumu*. 18. National Gynecology and Obstetrics Congress, 1-5 Aralık, Antalya, Türkiye.
15. Sarı, S., Soykan, Y. ve Bozkurt, N. (2021). *Servikal endometriozis olgu sunumu*. 18. National Gynecology and Obstetrics Congress, 1-5 Aralık, Antalya, Türkiye.
16. Işık, G., Sütcüoğlu, B., Soykan, Y., Kazancı, F., Erdem, Ö. ve Onan, M. A. (2021). *Endometrium kanseri hastalarında preoperatif 3D ultrasonografi, volüm ölçümleri ile prediktif evreleme*. 2nd International and 17th National Gynecologic Oncology Congress, 18-21 Kasım, İstanbul, Türkiye.
17. Soykan, Y., Yavuz, A. ve Bostancı, E. İ. (2023). *Spontaneous rupture of Krukenberg tumor in an adolescent girl*. Ulusal Jinekolojik Onkoloji Kongresi ve Ulusal Servikal Patolojiler ve Kolposkopi Kongresi, 20-22 Ocak, Ankara.

18. Soykan, Y. ve Dizibüyük, Ö. F. (2023). *Ektopik molar gebelik, 3 olgu sunumu*. Ulusal Jinekolojik Onkoloji Kongresi ve Ulusal Servikal Patolojiler ve Kolposkopi Kongresi, 20-22 Ocak, Ankara, Türkiye.
19. Tunç, F., Soykan, Y., Onan, M. A., Erdem, Ö. ve Ayhan, D. Z. (2023). *Vulva skuamoz hücreli karsinomu(SCC), endometrium adenokanseri ve ovaryan fibrom birlikteliği*. Ulusal Jinekolojik Onkoloji Kongresi ve Ulusal Servikal Patolojiler ve Kolposkopi Kongresi, 20-22 Ocak, Ankara, Türkiye.
20. Soykan, Y. ve Kara, M. E. (2024). *İzole CA 19-9 yüksekliği olan dev ovaryan kitlede struma ovari zemininde papiller tiroid kanseri ve insidental tiroid papiller kanseri olgu sunumu*. Ulusal Jinekolojik Onkoloji Kongresi ve Ulusal Servikal Patolojiler ve Kolposkopi Kongresi, 5-7 Aralık, Ankara, Türkiye.
21. Akçaoğlu, T., Soykan, Y., Bayramoglu-Tepe, N. ve Doğan, O. (2025). *Evaluation of oropharyngeal and anal swab samples in patients with HPV positivity*. 15. Türk Alman Jinekolojik Kongresi, 23-27 Nisan, Antalya, Türkiye.
22. Gunenç, M., Soykan, Y., Bayramoglu-Tepe, N., Taşkum, İ. ve Tayşi, S. (2025). *HPV enfeksiyonu olan kadınlarda natural killer hücre düzeyleri: Kesitsel bir çalışma*. 22. TJOD Kongresi, 14-18 Mayıs, KKTC.

Kitap Bölümleri

1. Soykan, Y. ve Güler, İ. (2021). Gebelikte beslenme ve destek tedavileri. Ü. Görkem ve C. Toğrul (Edt.), *Antenatal bakım* içinde. Ankara: Akademisyen Yayınevi, 1-12.
2. Soykan, Y. ve Cevher-Akdulum M. F. (2022). Stres ve hamilelik ve doğum sonrası dönem. S. Aslan (Edt.), *Tıp ve psikiyatri* içinde. Ankara: Türkiye Klinikleri, 45-48.
3. Soykan, Y. ve Taşkum, İ. (2023). Birinci trimesterde fetal anatomisinin sonografik incelenmesi ve fetal anoploidi bulguları. T. Karaçor (Edt.), *Sağlık & bilim 2023: Güncel tıp-III* içinde. Ankara: Efe Akademi Yayınları, 67-80.
4. Soykan, Y. ve Yar-Sağlam, A. S. (2025). Endometrium kanseri, sirkadiyen ritim ve kronokemoterapi. *Güncel Kadın Hastalıkları ve Doğum Çalışmaları*, (1), 11-24.

Ulusal/Uluslararası Projeler

1. “MikroRNA Ekspresyonu Endometrioid Tip Endometrium Kanseri Tumor Davranışını Gösteren bir Prediktör müdür?”, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinasyon Birimi (BAP), Tıp Fakültesi Araştırma Projesi, 2023, Proje No: TCD-2021-7102, Araştırmacı, Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Mehmet Anıl ONAN, Tamamlandı.
2. “Endometriozisi olan infertil hastaların ovaryan folikül sıvısında apoptotik yolların foliküler atrezi ile ilişkisinin”, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinasyon Birimi (BAP), Tıp Fakültesi Araştırma Projesi, 2024, Proje No: TCD-2022-7464, Araştırmacı, Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Ahmet ERDEM, Tamamlandı.
3. “Fare over kanser hücrelerinde karboplatin ve paklitakselin sirkadiyen ritme bağlı olarak in vitro ve in vivo etkilerinin”, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinasyon Birimi (BAP), Doktora Tez Projesi, 2024, Proje No: TCD-2021-7309, Araştırmacı, Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Atiye Seda Yar SAĞLAM, Tamamlandı.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..



Gazili olmak ayrıcalıktır

