T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OVARYUM KANSERİNDE POTANSİYEL ANTİKANSER AJANLARIN DİFERANSİYEL GEN EKSPRESYONU VE IN VITRO ANTİTÜMÖR ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Aysu EKER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Eş Danışman

Dr. Burcu TÜRKOĞLU

Aralık, 2025

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OVARYUM KANSERİNDE POTANSİYEL ANTİKANSER AJANLARIN DİFERANSİYEL GEN EKSPRESYONU VE IN VITRO ANTİTÜMÖR ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Aysu EKER tarafından hazırlanan tez çalışması 01.12.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Dr. Burcu TÜRKOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Günseli KURT GÜR, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Samet UÇAK, Üye
İstanbul Aydın Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Ovaryum Kanserinde Potansiyel Antikanser Ajanların Diferansiyel Gen Ekspresyonu ve In Vitro Antitümör Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Aysu EKER

İmza

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FBA-2025-6882 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Annem

ve

ablama

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitim sürecim boyunca değerli bilgileriyle bana yol gösteren danışmanım, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU'na,

Tez sürecimin her aşamasında bilgi birikimiyle bana destek veren ve akademik yolculuğumda yol gösterici tavsiyeleriyle katkı sağlayan değerli eş danışmanım Dr. Burcu TÜRKOĞLU'na,

Çalışmamızda kullanılan hücre hattının temini ve süreçteki destekleri için Dr. Öğr. Üyesi İrem Durmaz ŞAHİN ve Dr. Elif Merve AYDIN'a,

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle gelişimime katkı sağlayan Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün tüm değerli öğretim üyelerine,

Birlikte çalıştığımız kıymetli arkadaşlarım Nursena YÜKSEL'e, Aysun KAPLAN'a ve Nisanur ALLAHVERDİ'ye,

Deneysel çalışmalar için fikir aldığım, sorularımı yanıtsız bırakmayan tüm laboratuvar çalışma arkadaşlarıma,

Beni daima dinlemeye ve anlamaya çabalayan, her daim desteğini ve bana olan inancını kalbimde hissettiğim ablama,

Beni büyüten ve bugünlere getiren anneme,

Başta kıymetli halalarım olmak üzere, beni her daim destekleyen aileme,

Beni dinleyen, destekleyen ve moral veren canım arkadaşım Merve'ye,

Neşe kaynağım olan kedim Safir'e,

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında beni destekleyen TÜBİTAK'a,

Teşekkürü borç bilirim.

Aysu EKER

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ ix
KISALTMA LİSTESİ x
ŞEKİL LİSTESİ xi
TABLO LİSTESİ xiii
ÖZET xiv
ABSTRACT xvi
1 GİRİŞ 1
1.1 Yumurtalık Kanseri 1
1.2 Yüksek Dereceli Seröz Over Kanseri 3
1.3 Yumurtalık Kanserine Yönelik Tedavi Yöntemleri 4
1.4 Tümör Mikroçevresi 6
1.5 Yüksek Dereceli Seröz Over Kanserinde İlaç Direnci 9
1.6 Yüksek Dereceli Seröz Over Kanseri İlişkili Sinyal Yolları 10
1.6.1 DNA Onarım Mekanizmaları 11
1.6.2 PI3K-AKT-mTOR Sinyal Yolu 12
1.6.3 RAS Sinyal Yolu 14
1.6.4 Hücre Döngüsü Düzenleyicileri 15
1.6.5 TGF- β Sinyal Yolu 17
1.6.6 Notch Sinyal Yolu 19
1.6.7 İnterferon Yanıtı 20
1.7 İlaç Yeniden Konumlandırma ve Pirfenidon'un Antikanser Potansiyeli 21
1.7.1 İlaç Yeniden Konumlandırma 21
1.7.2 Pirfenidon ve Antikanser Potansiyeli 21
1.8 Doğal Kaynaklı Bileşikler ve Metilhirokinonun Antikanser Potansiyeli 23
1.8.1 Doğal Kaynaklı Bileşikler ve Kanser Tedavisindeki Potansiyeli 23
1.8.2 Metilhidrokinon ve Antikanser Potansiyeli 24

1.9 Kombinasyon Tedavilerinin Kanser Tedavisindeki Önemi 25
1.10 Caov-3 Hücre Hattı ve Özellikleri 25
2 MATERYAL-METOT **27**
2.1 Materyal 27
2.2 Biyoinformatik Çalışmalar 29
2.2.1 Diferansiyel Ekspresyon Analizinde Kullanılan Programlar ve Araçlar 29
2.2.2 Örneklerin Dağılımının Görselleştirilmesi 30
2.2.3 Diferansiyel Ekspresyon Analizi 30
2.2.4 Isı Haritasının (Heatmap) Oluşturulması 31
2.2.5 Zenginleştirme Analizleri 31
2.2.6 PI3K-AKT-mTOR Sinyal Yoluna Ait Ekspresyon Profili 31
2.2.7 Ağırlıklı Gen Eşekspresyon Ağı Analizi 31
2.2.8 Moleküler Docking Analizleri 32
2.3 Hücre Kültürü Çalışmaları 32
2.3.1 Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları 32
2.3.2 Tam Besiyeri Hazırlanması 35
2.3.3 Hücrelerin Büyütülmesi ve Pasajlanması 36
2.3.4 Hücrelerin Dondurulması 37
2.3.5 Sitotoksisite Analizi 37
2.3.6 Pirfenidon ve Metilhidrokinon İkili Kombinasyonunun Sinerjik Dozunun Belirlenmesi 39
2.3.7 Koloni Oluşturma Deneyi 40
2.3.8 Annexin V-FITC Erken Apoptoz Testi 41
3 BULGULAR **43**
3.1 Biyoinformatik Çalışmalara Ait Bulgular 43
3.1.1 Örneklerin Dağılımının Görselleştirilmesi 43
3.1.2 Diferansiyel Ekspresyon Analizi 44
3.1.3 Isı Haritaları (Heatmap) 45

3.1.4 Zenginleştirme Analizleri 47

3.1.5 PI3K-AKT-mTOR Sinyal Yolu İlişkili Ekspresyon Profili 51

3.1.6 Ağırlıklı Gen Eşekspresyon Ağı Analizi 53

3.1.7 Moleküler Docking Çalışmaları 54

3.2 Hücre Kültürü Çalışmaları 60

3.2.1 Sitotoksisite Analizi 60

3.2.2 Pirfenidon ve Metilhidrokinon İkili Kombinasyonunun Sinerjik Dozunun Synergy Finder ile Belirlenmesi 64

3.2.3 Koloni Oluşturma Deneyi 68

3.2.4 Annexin V-FITC Erken Apoptoz Testi 70

4 SONUÇ 73

KAYNAKÇA 84

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR 101

SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat Derece
FC	Fold change (kat değişimi)
log_2	2 Tabanlı Logaritma
Nm	Nanometre
pH	Hidrojen Potansiyeli

KISALTMA LİSTESİ

BP	Biyolojik Proses
CA125	Kanser Antijeni 125
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
ECM	Hücre Dışı Matriks
FBS	Fetal Sığır Serum
FIGO	Uluslararası Jinekologlar ve Obstetrisyenler Federasyonu
GLOBOCAN	Global Kanser Gözlemevi
GO	Gen Ontolojisi
HGSOC	Yüksek Dereceli Seröz Karsinom
HR	Homolog Rekombinasyon
KEGG	Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi
log2FC	Log2 Fold-Change
MAPK	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MF	Moleküler Fonksiyon
PARP	Poli (ADP-Riboz) Polimeraz
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PCA	Temel Bileşen Analizi
EMT	Epitelyal Mezankimal Geçiş
CAF	Kanser İlişkili Fibroblastlar
TAM	Tümör İlişkili Makrofajlar
TME	Tümör Mikroçevresi
TVU	Transvajinal Ultrason

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Yumurtalık kanserinin evreleri **3**
Şekil 1.2 BRCA2 ve homolog rekombinasyondaki rolü **12**
Şekil 1.3 PI3K-AKT-mTOR sinyal yolu **14**
Şekil 1.4 RAS sinyal yolu **15**
Şekil 1.5 Retinoblastoma proteini ve siklin etkileşimleri **16**
Şekil 1.6 TGF-β sinyalizasyonun kanonik ve kanonik olmayan yolları **18**
Şekil 1.7 Notch sinyalizasyonunun aktivasyonu **19**
Şekil 1.8 Pirfenidon'un iki boyutlu yapısı **22**
Şekik 1.9 Metilhidrokinonun iki boyutlu yapısı **24**
Şekil 2.1 Caov-3 hücre hattı mikroskop görüntüsü **33**
Şekil 2.2 Caov-3 hücre hattı mikroskop görüntüsü **33**
Şekil 2.3 Caov-3 hücre hattının, diğer yüksek dereceli seröz over kanseri hücre hatlarına kıyasla PIK3CA ekspresyon seviyesi **34**
Şekil 2.4 Caov-3 hücre hattının, diğer yüksek dereceli seröz over kanseri hücre hatlarına kıyasla AKT1 ekspresyon seviyesi **34**
Şekil 2.5 Caov-3 hücre hattının, diğer yüksek dereceli seröz over kanseri hücre hatlarına kıyasla mTOR ekspresyon seviyesi **35**
Şekil 2.6 MTT için hücre ekimi **38**
Şekil 3.1 Örneklerin gruplara göre dağılımı **43**
Şekil 3.2 Örneklerin temel bileşen analizine göre dağılımları **44**
Şekil 3.3 Minus-average grafiği **45**
Şekil 3.4 Volkan plot **45**
Şekil 3.5 Diferansiyel eksprese olmuş genlerden ilk 50 up regüle gene ait ısı haritası **46**
Şekil 3.6 Diferansiyel eksprese olmuş genlerden ilk 50 down regüle gene ait ısı haritası **46**
Şekil 3.7 Regülasyonu artmış genlerin Gen Ontolojisi Biyolojik Proses ile zenginleştirilmesi **47**
Şekil 3.8 Regülasyonu azalmış genlerin Gen Ontolojisi Biyolojik Proses ile zenginleştirilmesi **47**
Şekil 3.9 Regülasyonu artmış genlerin Gen Ontolojisi Moleküler Fonksiyon ile zenginleştirilmesi **48**

Şekil 3.10 Regülasyonu azalmış genlerin Gen Ontolojisi Moleküler Fonksiyon ile zenginleştirilmesi **49**

Şekil 3.11 Regülasyonu artmış genlerin Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi ile zenginleştirilmesi **49**

Şekil 3.12 Regülasyonu azalmış genlerin Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi ile zenginleştirilmesi **50**

Şekil 3.13 Regülasyonu artmış genlerin Reactome ile zenginleştirilmesi **50**

Şekil 3.14 Regülasyonu azalmış genlerin Reactome ile zenginleştirilmesi **51**

Şekil 3.15 PI3K-AKT-mTOR sinyal yolunun değişen ekspreyon seviyeleri **51**

Şekil 3.16 PI3K-AKT-mTOR ilişkili genlerin ekspresyonundaki değişimler **52**

Şekil 3.17 PI3K-AKT-mTOR ilişkili genlerin ekspresyonundaki değişimlerin renk kodlu gösterimi **53**

Şekil 3.18 Pirfenidon-PI3K alfa kompleksi **55**

Şekil 3.19 Pirfenidon-AKT1 kompleksi **56**

Şekil 3.20 Pirfenidon-AKT2 kompleksi **56**

Şekil 3.21 Pirfenidon-mTOR kompleksi **57**

Şekil 3.22 Pirfenidon-PDK1 kompleksi **57**

Şekil 3.23 Metilhidrokinon-PI3K alfa kompleksi **58**

Şekil 3.24 Metilhidrokinon-AKT1 kompleksi **59**

Şekil 3.25 Metilhidrokinon-AKT2 kompleksi **59**

Şekil 3.26 Metilhidrokinon-mTOR kompleksi **60**

Şekil 3.27 Metilhidrokinon-PDK1 kompleksi **60**

Şekil 3.28 Pirfenidonun hücre canlılığına etkisi ve IC50 dozu **61**

Şekil 3.29 Pirfenidonun artan konsantrasyonlarının, hücre canlılığına 24 ve 48 saatlik etkisi **62**

Şekil 3.30 Metilhidrokinonun hücre canlılığına etkisi ve IC50 dozu **63**

Şekil 3.31 Metilhidrokinonun artan konsantrasyonlarının, hücre canlılığına 24 ve 48 saatlik etkisi **64**

Şekil 3.32 Sinerji skorlarına ait ısı haritası **65**

Şekil 3.33 Değişen dozlara göre oluşan koloniler **69**

Şekil 3.34 Kontrol ve doz gruplarına göre değişen koloni sayıları **70**

Şekil 3.35 Annexin V-FITC erken apoptoz testi hücre görselleri **71**

Şekil 3.36 Annexin V-PI sinyal yoğunluklarının alan yüzdesi **71**

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1 Caov-3 hücre hattı özellikleri **26**
Tablo 2.1 Kullanılan cihazların listesi **27**
Tablo 2.2 Kullanılan kimyasal malzemeler ve kitlerin listesi..... **28**
Tablo 2.3 Kullanılan sarf ve malzemelerin listesi..... **28**
Tablo 3.1 PI3K-AKT-mTOR sinyal yolu genlerinin ekspresyon profili ve istatistiksel bulgular **52**
Tablo 3.2 PI3K-AKT-mTOR sinyal yolu ve turkuaz modül ilişkisi..... **54**
Tablo 3.3 Pirfenidon'un oluşturduğu komplekslere ait docking skorları **54**
Tablo 3.4 Metilhidrokinonun oluşturduğu komplekslere ait docking skorları **58**
Tablo 3.5 Pirfenidon ve metilhidrokinon ikili kombinasyonunun sinerji skorları..... **65**

ÖZET

Ovaryum Kanserinde Potansiyel Antikanser Ajanların Diferansiyel Gen Ekspresyonu ve In Vitro Antitümör Etkilerinin İncelenmesi

Aysu EKER

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Eş-Danışman: Dr. Burcu TÜRKOĞLU

En ölümcül jinekolojik kanser türü olarak kabul edilen yumurtalık kanserinin genel tedavi yöntemleri cerrahi ve kemoterapidir. Sinyal yollarındaki değişimler, tümör mikroçevresindeki düzenlemeler, ilaç direnci ve nüks gibi sebeplerle hastaların sağkalım oranında iyileşme görülmemektedir. PI3K-AKT-mTOR sinyal yolu, hücre sağkalımı ve tümör progresyonunda merkezi bir rol oynamakta; bağışıklık hücrelerinin aktivitesinin düzenlenmesi, anjiyogenez ve tümör mikroçevresiyle etkileşimler yoluyla over kanseri patogenezine birçok mekanizma üzerinden katkıda bulunmaktadır. Mevcut tedavi yöntemlerinin etkinliğindeki sınırlamalar, yeni ilaç adaylarının araştırılmasını, farklı mekanizmaları hedefleyen ilaç kombinasyonlarının geliştirilmesini önemli kılmaktadır. Bu doğrultuda, doğal kaynaklı bileşiklerin yanı sıra farklı hastalıklar için onaylanmış ilaçların over kanserine karşı yeniden değerlendirilmesi, öne çıkan tedavi stratejileri arasında

yer almaktadır. Onaylı bir ilaç olan Pirfenidon, idiopatik pulmoner fibrozis tedavisinde kullanılmakta olup, son yıllarda antitümör potansiyeliyle de dikkat çekmektedir. Bu bileşik, TGF-β sinyal yolunun inhibisyonu, glikoliz ve epitelyal mezenkimal geçişin baskılanması, kaspaz aracılı apoptozun indüklenmesi ve vasküler endotelyal büyüme faktörü sekresyonunun azaltılması gibi mekanizmalarla tümör progresyonunu inhibe edebilmektedir. Bu biyolojik mekanizmalar, over kanserinde tümör hücrelerinin invazyonu, metastazı, proliferasyonu ve ilaç direnci ile yakından ilişkilidir. Marine kaynaklı doğal bir bileşik olan metilhidrokinonun ise özellikle AKT sinyal yolunu hedefleyerek antianjiyojenik etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışma kapsamında yapılan ön biyoinformatik analizler ile PI3K-AKT-mTOR sinyal yolunun ifadesinin over kanserinde artmış olduğu gösterilmiş ve moleküler docking çalışmalarıyla Pirfenidon ve metilhidrokinonun bu yoldaki proteinler ile olası etkileşimleri incelenmiştir. Docking sonuçları, her iki bileşiğin de PI3K-AKT-mTOR yolunda etkileşim gösterme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Yapılan literatür araştırmaları ve biyoinformatik ön analizler doğrultusunda, onaylı bir ilaç olan Pirfenidon ile doğal kaynaklı bir bileşik olan metilhidrokinonun ve bu etken maddelerin ikili kombinasyonunun yumurtalık kanserine yönelik antikanser potansiyeli değerlendirilmiştir. Pirfenidon, metilhidrokinon ve ikili kombinasyon uygulaması ile sitotoksik dozlar belirlenmiş, sinerjik etki dozları tespit edilmiştir. Hücre sağkalımına yönelik etkinin değerlendirilmesi amacıyla koloni oluşturma deneyleri gerçekleştirilmiştir. Pirfenidon, metilhidrokinon ve ikili kombinasyon uygulamasının apoptotik aktivite üzerine etkisi, Annexin V-FITC Erken Apoptoz Tespit Kiti ile belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Yumurtalık kanseri, PI3K-AKT-mTOR, kombine tedavi, Pirfenidon, metilhidrokinon.

ABSTRACT

Investigation of Differential Gene Expression and In Vitro Antitumor Effects of Potential Anticancer Agents in Ovarian Cancer

Aysu EKER

Department of Molecular Biology and Genetics
Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU
Co-supervisor: Dr. Burcu TÜRKOĞLU

As known to be the deadliest gynecological cancer, the standard treatment methods for ovarian cancer include surgery and chemotherapy. Due to dysregulation in signaling pathways, alterations in the tumor microenvironment, drug resistance, and recurrence, patient survival rates have not significantly improved. The PI3K-AKT-mTOR signaling pathway plays a key role in the pathogenesis of ovarian cancer through several mechanisms, including the regulation of immune cell activity, angiogenesis, and interactions with the tumor microenvironment. The limitations of current treatment approaches highlight the importance of exploring new potential drug candidates and combinations that target different mechanisms. In this concept, both natural-derived compounds and the repurposing of approved drugs for other diseases have emerged as promising strategies. Pirfenidone, an approved drug used in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis, has recently gained attention for its antitumor potential. This

compound may inhibit tumor progression through various mechanisms, such as inhibition of the TGF-β signaling pathway, suppression of glycolysis and epithelial-mesenchymal transition, induction of caspase-mediated apoptosis, and reduction of vascular endothelial growth factor secretion. These mechanisms are highly relevant to tumor cell invasion, metastasis, proliferation and drug resistance in ovarian cancer. Methylhydroquinone, a natural compound of marine origin, has been reported to show antiangiogenic effects, particularly by targeting the AKT signaling pathway. In this study, it has been shown that the expression of PI3K-AKT-mTOR signaling pathway is increased in ovarian cancer by preliminary bioinformatic analyses and possible interactions of Pirfenidone and methylhydroquinone with the proteins in the pathway were analyzed by molecular docking studies. The docking results indicated that both compounds have the potential to target the PI3K-AKT-mTOR pathway. Cytotoxic doses were determined with pirfenidone, methylhydroquinone and dual combination application and synergistic effect doses were determined. Additionally, colony formation assays were conducted to assess the effects on cell survival, and apoptosis was evaluated using the Annexin V-FITC Early Apoptosis Detection Kit.

Keywords: Ovarian cancer, PI3K-AKT-mTOR, combination therapy, Pirfenidone, methylhydroquinone.

1
GİRİŞ

1.1 Yumurtalık Kanseri

Yumurtalık kanseri, en ölümcül jinekolojik kanser olarak kabul edilen, 2020 yılında dünya çapında 207.252 kişinin ölümüne neden olmuş bir kanser tipidir [1, 2]. Yumurtalık kanseri, Amerika Birleşik Devletleri'nde 2020 ve 2021 yıllarında kadınlarda kanserden ölümlerin önde gelen beşinci nedenidir [3, 4]. Global Kanser Gözlemevi (The Global Cancer Observatory, GLOBOCAN) tarafından tahmin edilen rakamlara göre, 2020 yılında 314.000 kadına yumurtalık kanseri teşhisi konulmuş ve 207.000 kadının bu hastalıktan hayatını kaybettiği öngörülmüştür [5]. Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute) istatistiklerine göre, yumurtalık kanseri en sık ileri yaşlarda, özellikle 55-64 yaş aralığında teşhis edilmektedir. Ortalama tanı yaşı ise 63'tür [6]. Erken evre yumurtalık kanserine sahip olan kadınlar için 5 yıllık sağkalım oranı %85-90 aralığında olmasına rağmen, kadınların yaklaşık %70'i geç evrede teşhis edilmiş hastalığa sahiptir ve bu sebeple yumurtalık kanseri hastalarının tüm popülasyonu için 5 yıllık sağkalım oranı %46,5'tir [7].

Yumurtalık kanserine yakalanma riski yaşla birlikte, özellikle de menopozdan sonra, muhtemel hormonal düzensizlikler nedeniyle önemli ölçüde artmaktadır. Kilo alımı ve obezite de daha yüksek bir riskle bağlantılıdır, ayrıca gen mutasyonları ve kalıtsal sendromlar da önemli katkıda bulunan faktörlerdir [8].

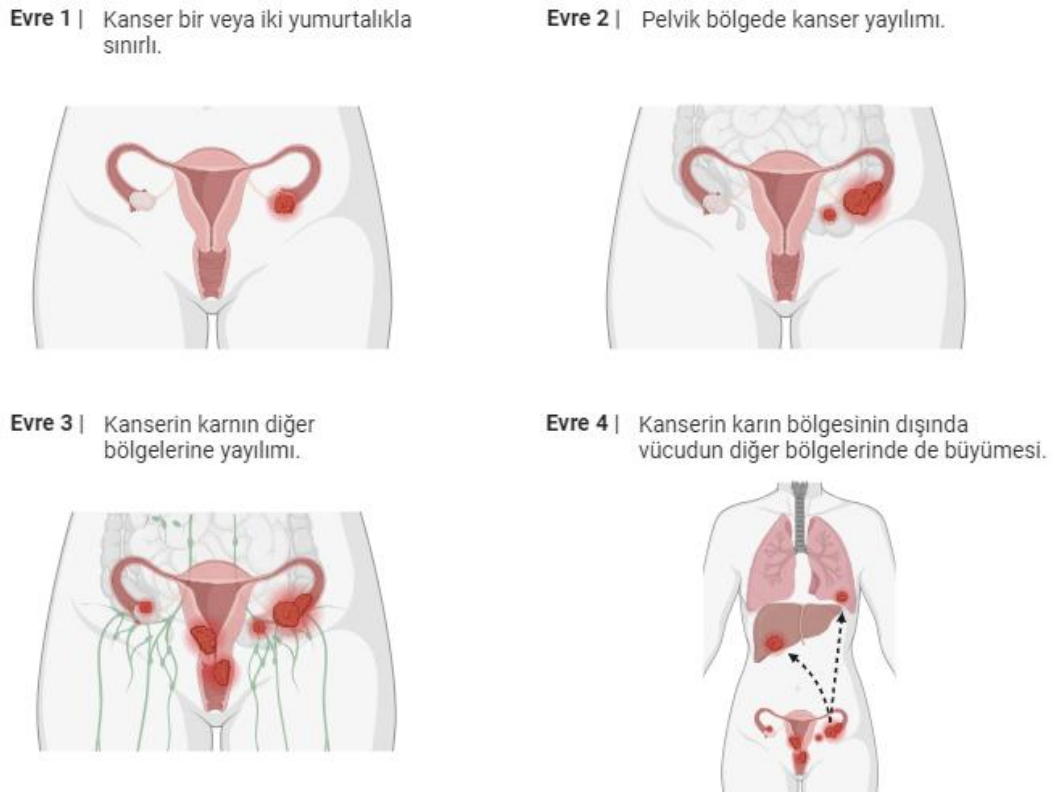
Yetişkin kadın üreme sistemindeki yumurtalık çifti, ovulasyon ve üreme hormonlarının üretimi gibi temel rollere hizmet eder. Epitel hücreler yumurtalığı saran epitelyumu oluşturur; germ hücreleri yumurta hücrelerini oluşturur ve stromal hücreler yumurtalığın bağlayıcı ve yapısal dokularını oluşturur [9, 10]. Yumurtalık kanseri, yumurtalık ve fallop tüpünün epitelinden, germ hücrelerinden (yumurta) veya stromal hücrelerden köken almaktadır [11]. Yumurtalık kanseri, farklı tanımlanabilen risk faktörlerine, köken aldıkları hücrelere, moleküler

bileşimlerine, klinik özelliklerine ve uygulanan tedavi yöntemlerine göre farklı histolojik alt tiplere ayrılabilmektedir. Bu histolojik alt tipler, over kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturan ve seröz, endometrioid, berrak hücreli ve müsinöz karsinomları içeren epitelyal over kanserlerini kapsamaktadır. Bu tipler arasında yüksek dereceli seröz karsinom (HGSOC, High-Grade Serous Ovarian Carcinoma) en sık teşhis konulan tiptir [12]. Germ hücresi kanseri, seks kord stromal kanseri, küçük hücreli karsinomu ve yumurtalık sarkomunu içeren epitel dışı over kanserleri ise over kanserlerinin %5'inden daha azını oluşturmaktadır.

Yumurtalık kanserinin teşhisinde kullanılan tarama yöntemlerinden biri transvajinal ultrasondur (TVU) [13]. TVU, yumurtalık kanserini tespit etmek için kullanılan en yaygın görüntüleme yöntemidir ve klinisyenlerin yumurtalık dokularının boyut ve şeklindeki düzensizlikleri tanımlamasına olanak tanımaktadır. TVU ile elde edilen görüntüler, Uluslararası Yumurtalık Tümörü Analizi (International Ovarian Tumor Analysis, IOTA) kurallarına dayalı olarak belirli klinik özelliklerin varlığını değerlendirmek için radyologlar tarafından incelenmektedir. Değerlendirilen özelliklerden bazıları papiller çıkıntıların, asitlerin ve/veya iç kan akışının varlığını içermekte olup bulgular, malign kitlelerin olasılığını ve evresini tahmin etmek için kullanılmaktadır [14]. Yumurtalık kanseri teşhisine yönelik kullanılan ve bir tümör belirteci olan kanser antijeni 125 (CA125) için yapılan kan testi, başka bir yaygın tarama testidir [13]. MUC16 tarafından kodlanan bir glikoprotein olan CA125, kan dolaşımına salgılanmakta olup yumurtalık kanseri hastalarının %80'inden fazlasında aşırı eksprese edilmekte ve serumda tespit edilebilmektedir [15]. Çoğu laboratuvarda CA125 için normal değer 0 ila 35 ünite/mL aralığındadır. Ancak CA125'in yumurtalık kanserini erken evrelerde tespit etmedeki yararlılığı sınırlıdır, çünkü bu vakaların sadece %50'sinde CA125 seviyeleri yüksek olmaktadır [16].

Seröz karsinomların çoğu Şekil 1.1'de gösterilen evrelerden III. (%51) veya IV. (%29) evrede teşhis edilmektedir. Endometrioid, müsinöz ve berrak hücreli karsinomların çoğunluğu (%58 ila %64), epitelyal olmayan tümörlere benzer şekilde evre I'de teşhis edilmektedir [17]. Uluslararası Jinekologlar ve Obstetrisyenler Federasyonu (International Federation of Gynecologists and Obstetricians, FIGO) tarafından belirlenmiş evreleme sistemine göre, Evre I'de tümör, yumurtalıklar veya fallop tüpleri ile sınırlıdır. Evre II'de tümör, pelvik

yayılım göstermiş (pelvik sınırın altında) veya periton kanseri ile birlikte bir veya her iki yumurtalığı veya fallop tüplerini kapsamaktadır. Evre III'te sitolojik veya histolojik olarak pelvis dışında peritona yayılım göstermiş ve/veya retroperitoneal lenf nodlarına metastaz yaptığı doğrulanmış tümör, bir veya her iki over/fallop tüpünü ya da periton kanserini kapsamaktadır. Evre IV'te ise peritoneal metastazlar hariç uzak metastaz(lar) görülmektedir [18, 19].



Şekil 1.1 Yumurtalık kanserinin evreleri (BioRender.com ile oluşturulmuştur)

Tanı konulan over karsinomlarının yaklaşık %30'u tip I ve %70'i tip II'dir. Tip I tümörler genellikle yumurtalıklarla sınırlıdır (evre I) ve yumurtalık kanserine bağlı ölümlerin %10'unu oluşturarak olumlu bir prognoza sahiptir. Aksine, daha agresif olan tip II tümörler, tedavinin mümkün olmadığı ileri evrelerde (III, IV) teşhis edilmekte ve Tip II tümörler, yumurtalık kanserine bağlı ölümlerin %90'ını kapsamaktadır [20].

1.2 Yüksek Dereceli Seröz Over Kanseri

Epitelyal over kanserlerinin en yaygın alt tipi olan HGSOC, bu kanserlerin %60'ından fazlasını ve over kanserine bağlı ölümlerin %70'inden fazlasını oluşturmaktadır [21]. HGSOC, tipik olarak periton boşluğu içindeki komşu

organlara doğrudan ulaşarak veya hücrelerin primer tümörden ayrılması yoluyla yayılabildiğinden metastaz yapmak için özellikle kan veya lenfe ihtiyaç duymamaktadır. İç organları saran, sıvı dolu periton boşluğunda, yumurtalık veya fallop tüpü yüzeyinde büyüyen bir tümörün yayılmasını kısıtlayabilecek anatomik bir bariyer bulunmamaktadır [22]. Periton, iç organları örten ve koruyan mezotelyal hücrelerden oluşmaktadır. Alt periton stroması kolajen bazlı bir matriks, aktive fibroblastlar, kan damarları ve lenfatik yapıları içermektedir. Bu benzersiz ortam, hem kanser hem de stromal hücreler tarafından salgılanan faktörlerin birikmesine izin vermekte ve metastatik yayılma ve tümör proliferasyonunu mümkün kılmaktadır [23].

Yüksek dereceli seröz over kanseri, kopya sayısı odaklı bir kanser olarak kabul edilmektedir; yaygın genomik kayıp ve kazanç bölgelerine yol açan kromozomal instabilite ile karakterizedir [24]. HGSOC, yalnızca genetik değişkenlik açısından değil, mikroskobik düzeyde sergilediği farklı büyüme paternleriyle de dikkat çeker. Papiller, solid, psödo-endometrioid ve mikropapiller gibi morfolojik çeşitlilik; BRCA1 mutasyonları, homolog rekombinasyon eksikliği (HRD), bağışıklık hücresi infiltrasyonu ve hasta prognozu gibi moleküler ve klinik özelliklerle ilişkilidir. Ayrıca, HGSOC dokularında genellikle birden fazla morfolojik yapının bir arada gözlemlenmesi, tanısal süreci karmaşıklaştırmakta ve tümörün heterojen yapısını daha belirgin hale getirmektedir [25].

Bu alt tipte, tümörlerin büyük çoğunluğunda TP53 mutasyonları (%96) görülmekte; NF1, BRCA1, BRCA2, RB1 ve CDK12 gibi genlerde ise düşük prevalanslı ancak istatistiksel olarak tekrarlayan somatik mutasyonlar gözlemlenmektedir. HGSOC'lerin yaklaşık %50'sinde homolog rekombinasyon (HR) DNA onarım yolunda bozukluklar bulunmaktadır [26]. p53 fonksiyon kaybının, HGSOC tümörigenezinde kromozomal instabiliteye yol açan ve genellikle homolog rekombinasyon eksikliği ile daha da tetiklenen önemli bir erken olay olduğu anlaşılmıştır [24].

1.3 Yumurtalık Kanserine Yönelik Tedavi Yöntemleri

Yumurtalık kanserinde standart tedavi, cerrahiyi takiben platin-taksan kemoterapi tedavisini içermektedir [27]. Vakaların yaklaşık %80'inde, tümör metastaz yapmış olduğundan bu vakalarda 5 yıldan daha uzun yaşama şansı sadece %29,2 olarak

belirlenmiştir [28]. Over kanserinde hastaların çoğu başlangıçtaki klasik tedaviye yanıt verse de, üç yıl içinde nüks ve ilaç direnci sıkça görülmektedir; bu da tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır [29]. Ayrıca kemoterapi ciddi yan etkilere yol açabilmekte ve bu durum hastaların yaşam kalitesini olumsuz etkileyebilmektedir [30].

Mevcut tedavi yaklaşımları, çeşitli alt tiplerden oluşan bir hastalık olan over karsinomunun mekansal ve zamansal heterojenliğini yansıtmayı amaçlayan karmaşık bir çerçeveye evrilmiştir. Bu alt tiplerdeki moleküler heterojenlik, geleneksel platin bazlı kemoterapiye karşı farklı derecelerde doğal ilaç direncine yol açmaktadır [31]. Tedavi direnci, over kanserinde çok boyutlu bir olgudur; çoklu ilaç direnci, DNA hasar onarımında artış, metabolik yeniden programlanma, oksidatif stres tepkileri, hücre döngüsü kontrolü, kanser kök hücrelerinde artışlar, bağışıklıktan kaçış, apoptoz ilişkili bozukluklar, otofaji ve disregüle olan sinyal ağlarının karmaşık etkileşimi sonucu ortaya çıkmaktadır [32]. Kanser ilerledikçe, membran lipit yapısındaki değişiklikler, efflux (dışa atım) pompalarının etkinliğinin artması, ilacın metabolik olarak dönüştürülmesi, hasarlı DNA'nın onarılması, apoptoz yollarının baskılanması, hedef proteinlerin miktar ya da yapısının değişmesi, hücre döngüsünün kritik aşamalarının bozulması ve mikrotübül-ilişkili proteinler ile β-tübülin mutasyonları gibi çok sayıda süreç çoklu ilaç direncinin gelişimine ortaklaşa katkıda bulunmaktadır. Özellikle adenozin trifosfat (ATP) bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılarının aşırı ekspresyonu ile apoptoz yolunun engellenmesi, çoklu ilaç direncinin başlıca iki kaynağını oluşturmaktadır [33]. Bu karmaşık direnç mekanizmalarını hedeflemek amacıyla yeni nesil ajanların geliştirilmesine odaklanılmıştır.

Yeni nesil hedefe yönelik ajanlar, cerrahi ve klasik kemoterapiye ek olarak kullanılmakta; Bevacizumab gibi anti-vasküler endotalyel büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor, VEGF) terapileri hayvan modellerinde nüksü geciktirirken [34], BRCA mutasyonlu veya homolog rekombinasyon yetersizliği (HRD) gösteren hastalarda Olaparib ve Niraparib gibi Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) inhibitörlerinin kullanımı sağkalımı uzatmaktadır [35].

Poli (ADP-riboz) polimeraz inhibitörleri, DNA'daki küçük kırıkları onarmak için PARP'ların eklediği ADP-riboz zincirlerini bloke ederek işlev göstermektedir. Ayrıca PARP inhibitörleri, PARP'ların DNA kırıklarına yapışıp kalmasına neden

olur; bu “PARP tuzağı” replike olmaya çalışan DNA ipliklerinin kopmasına yol açar. Biriken ve onarılamayan hasar, hücrenin bölünmeyi durdurup apoptoza uğramasına neden olmaktadır [36]. Anti-VEGF stratejisine yönelik geliştirilen Bevacizumab, VEGF-A’ya bağlanarak VEGF-A’nın VEGFR-2 reseptörüne erişimini engellemektedir. Bu sayede mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ve PI3K-AKT-mTOR sinyal yollarının aktivasyonu bloke edilir. Sonuç olarak yeni damar oluşumu, damar geçirgenliği ve lenfanjiyogenez inhibe edilerek tümörlerin oksijen ve besin kaynağına erişimi baskılanmaktadır [37].

Hücre içi platin yükünü düzenleyen taşıyıcı sistemler platin direncinde kritik bir rol oynamaktadır. CTR1 ekspresyonu platin birikimini ve duyarlılığı artırırken, ATP7A/B ve glutatyon sentez enzimlerinin artışı hücreden platini uzaklaştırarak direnci desteklemektedir [38]. PARP inhibitör direncinde ise homolog rekombinasyon onarımının yeniden sağlanması, PARP işlev değişiklikleri, replikasyon çatalı stabilizasyonu, çoklu ilaç direnç mekanizmalarının artışı ve alternatif sinyal yollarının devreye girmesi gibi birden fazla mekanizma görev almaktadır [39].

Bir başka alternatif tedavi yöntemi olarak karşımıza çıkan immünoterapiler, bağışıklık sistemi üzerinden kanseri hedeflemelerine rağmen, etki düzeyleri her hastada değişkenlik göstermektedir. Bu durumun başlıca nedeni tümör mikroçevresinin (Tumor microenvironment, TME) bağışıklığı baskılayıcı rolüdür. TME, düzenleyici T hücreleri (Treg), miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücreler ve tümörle ilişkili makrofajlar (tumor-associated macrophages, TAM) ile birlikte laktik asit ve arginaz-1 gibi metabolik aracılar aracılığıyla antitümör yanıtı zayıflatmaktadır. Tümör hücreleri, bağışıklık sistemi tarafından tanınmayı zorlaştıran düşük mutasyon oranına sahiptir ve PD-L1 gibi proteinler üreterek T hücrelerini etkisiz hale getirmektedir [40].

1.4 Tümör Mikroçevresi

Tümör oluşumu ve tümörün progresyon süreci, tümör hücrelerindeki genetik/epigenetik değişiklikler ve TME bileşenlerinin karşılıklı ve dinamik çapraz etkileşimi yoluyla yeniden düzenlenmesi olmak üzere iki faktörden etkilenmektedir [41]. Tümör mikroçevresi karmaşık ve sürekli gelişen bir yapıdır [42]. Kanser hücreleri, kanserli olmayan hücreleri yeniden programlayarak ve

damar sistemini ve hücre dışı matriksi (extracellular matrix, ECM) yeniden şekillendirerek tümör destekleyici bir ortam oluşturmaktadır [43]. Tümörlerdeki ECM, normal dokulara kıyasla daha yoğun ve sert olup, tedaviye yanıtı olumsuz etkileyen fiziksel bir bariyer oluşturmaktadır. Bu sert ve yoğun yapı, ilaçların tümör hücrelerine ulaşmasını engellemenin yanı sıra hipoksi ve metabolik stres aracılığıyla direnç mekanizmalarını da tetiklemektedir [44]. TME'nin kompozisyonu tümör tipleri arasında farklılık göstermekle birlikte, karakteristik unsurları arasında immün hücreler, stromal hücreler, kan damarları ve hücre dışı matriks yer almaktadır [42]. TME'deki kanser dışı hücreler genellikle, kontrolsüz hücre çoğalmasını uyararak karsinogenezin tüm aşamalarında tümör oluşumunu teşvik edici bir işlev görmektedir. Buna karşılık, kanser hücreleri sağlıklı dokuları istila etmekte ve lenfatik sistem veya dolaşım sistemi yoluyla vücudun diğer bölgelerine yayılmaktadır [45]. ECM, vücuttaki biyomekanik faaliyetleri ve işlevleri destekleyen glikoproteinler, kolajenler ve enzimler dahil olmak üzere bir makromolekül ağından oluşmaktadır. Tümör hücrelerinin çoğalması ve hacminin artması, çevre dokular üzerinde stres oluşturarak damarların sıkışmasına, doku hipoksisine ve kanserle ilişkili fibroblastların (CAF'lerin) aktivasyonuna yol açmaktadır [46]. Tümör ve bağışıklık hücrelerinin salgıladığı TGFβ, PDGF ve FGF2 gibi büyüme faktörleri fibroblast aktivasyonuna neden olmaktadır [47]. Aktive olmuş CAF'ler, ekstraselüler matriks üretimi, sitokin ve kemokin salınımı yoluyla lokal fibrozis, damar basıncında artış ve ECM sertleşmesine neden olmaktadır. Buna karşılık, CAF'lerin salgıladığı matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) ve diğer proteazlar ECM'yi parçalayarak tümör invazyonunu ve metastazı kolaylaştırmaktadır [46]. CAF'ler çoğunlukla yerleşik fibroblastlardan türese de, düz kas hücreleri, perisitler veya kemik iliği kökenli mezenkimal hücrelerden de kaynaklanabilmektedir, bu da heterojen bir hücre popülasyonu oluşturmaktadır. CAF'lerin salgıladığı büyüme faktörleri ve kemokinler, endotel progenitör hücreleri aracılığıyla anjiyogenez ve lenfanjiyogenezi tetiklemektedir [47].

Hipoksi ve anormal anjiyogenez, tümör mikroçevresinin karakteristik özelliklerindendir ve bu iki süreç birbiriyle karşılıklı etkileşim içerisindedir. Hipoksi, vasküler endotalyel büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor, VEGF) üretimini uyararak tümör anjiyogenezine neden olurken; düzensiz tümör

damarları dokuda hipoksiyi daha da güçlendirir. Bu hipoksik ortamda aktive olan HIF'ler, Notch ve OCT4 gibi sinyal yolları aracılığıyla kanser hücrelerinde yeniden programlanmayı tetikleyerek kök hücre benzeri özelliklerin kazanılmasını sağlamakta ve VEGF sinyali de hem doğrudan hem stromal hücreler üzerinden kanser kök hücre havuzunun genişlemesine katkıda bulunmaktadır [48]. Kanser kök hücreleri, hem kendini yenileme hem de farklılaşma yeteneklerine sahip olup tümörleri yeniden oluşturabilme özelliği göstermektedir. Bu hücreler, simetrik bölünme özellikleri ve özgün gen ekspresyon profilleri sayesinde tümördeki diğer hücrelerden ayırt edilebilmektedir [49].

Kanserde damar oluşumu sadece klasik anjiyogenezle sınırlı olmayıp, tümör hücreleri, mevcut damarları ele geçirerek ya da damar benzeri yapılar oluşturarak alternatif yollarla da vaskülarizasyon sağlanmaktadır. Ayrıca, tümör kök hücre benzeri hücreler, tümöre özgü endotelyum oluşturabilirken, kemik iliği kökenli hücreler de patolojik damar gelişimine katılarak tümör damarlarını destekleyebilmektedir. Bu çok yönlü damar oluşumu, tümörün oksijen ve besin ihtiyaçlarını karşılayarak büyümesini ve yayılmasını kolaylaştırmaktadır [50].

Tümör hücreleri tarafından aktive edilen bağışıklık hücreleri ile ilişkili stromal bileşenlerden oluşan bağışıklık mikroçevresi, tümör mikroçevresinin önemli bir unsurudur [51]. Tümör mikroçevresi, yalnızca bağışıklık hücrelerinin varlığıyla değil, bu hücrelerin işlevsel durumları ve salgıladıkları moleküllerle de şekillenmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, bağışıklık hücrelerinin tümöre doğrudan saldırmak yerine, bazı durumlarda hücre dışı matrisin yeniden şekillenmesi, anjiyogenez ve epitel-mezenkimal geçiş (EMT) gibi süreçleri tetikleyerek tümör ilerlemesine katkı sağlayabileceğini göstermiştir. Bu bağlamda, bağışıklık sisteminin tümöre yönelik yanıtı yalnızca hücresel kompozisyonla değil, hücrelerin aktivasyon düzeyleri ve tümörle kurduğu çift yönlü etkileşimle birlikte değerlendirilmelidir [52]. Tümörle ilişkili bağışıklık hücreleri tümör önleyici ve tümör destekleyici bağışıklık hücreler olmak üzere iki türe ayrılabilmektedir. Tümörü önleyici bağışıklık hücreleri temel olarak efektör T hücreleri (CD8+ sitotoksik T hücreleri ve efektör CD4+ T hücreleri dahil), doğal öldürücü (NK) hücreler, dendritik hücreler (DC'ler), M1-polarize makrofajlar ve N1-polarize nötrofillerden oluşmaktadır. Tümörü önleyen bağışıklık hücreleri dışında, başlıca düzenleyici T hücreleri (Treg'ler) ve miyeloid türevli baskılayıcı

hücrelerden (MDSC'ler) oluşan çok sayıda tümörü destekleyen bağışıklık hücresi bulunmaktadır [53].

Over kanserinde tümör mikroçevresi, özellikle stromal hücrelerle zenginleşmiş yapısıyla, hastalığın progresyonu ve kötü prognozla yakından ilişkilidir. Tümör hücreleri tarafından salınan TGF-β, PDGF ve FGF-2 gibi faktörler, stromal hücrelerin kanserle ilişkili fibroblastlara dönüşümünü tetikleyerek anjiyogenez, invazyon ve tedavi direnci gibi süreçleri desteklemektedir. MMP-2 ve MMP-9 gibi matris metalloproteinazların stromal hücrelerde artmış ekspresyonu, ileri evre hastalık ve düşük sağkalım oranı ile ilişkilendirilmiştir [54]. Kanser ilişkili fibroblastlar ve tümör ilişkili makrofajlar (TAM) gibi TME bileşenlerinin over kanseri hücrelerinin metabolizmasını, invazyon kapasitesini ve immün kaçış yeteneğini artırdığı gösterilmiştir. Özellikle piruvat dehidrojenaz kinaz 1'in (PDK1) CAF kaynaklı aktivasyonu ve TAM'lerin VEGF ve TGF-β gibi faktörlerle anjiyogenezi tetiklemesi, TME'nin hastalığın agresifliğini belirleyen temel unsurlardan biri olduğunu ortaya koymaktadır [55].

1.5 Yüksek Dereceli Seröz Over Kanserinde İlaç Direnci

İleri evre yumurtalık kanseri hastalarında, cerrahi ve birinci basamak karboplatin-paklitaksel tedavisi sonrası tedaviye yanıt oranı, %50-81 civarındadır. Ancak, hastaların %70-80'inde, yaklaşık 16 ay içinde nüks görülmekte ve tedavi direnci gelişmektedir. Bu durum, direnci öngörme, nüksü geciktirme ve sağkalımı iyileştirme ihtiyacını vurgulamaktadır [56]. HGSOC'da ilaç direnci, ilaç dışa atımı (effluks), hücre zarı taşınımı, DNA hasarı onarımı, kodlamayan RNA'ların rolü ve tümör mikroçevresinin bağışıklık kaçışına etkisi dahil olmak üzere birçok mekanizmayı kapsamaktadır [57].

İlk tanımlanan çoklu ilaç direnci taşıyıcısı olan ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcısının (ABCB1/P-glikoprotein/MDR1), kanser hücrelerinden antikanser ilaçların dışarı atılmasını sağladığı belirtilmiştir. Paklitaksel, bu taşıyıcının ana substratıdır. Bakır taşıyıcısı CTR1 ile ATP7A ve ATP7B gibi effluks taşıyıcılarının da cisplatin direnciyle ilişkili olduğu gösterilmiştir [58]. Sodyum pompaları, bakır iyonu ve organik katyon taşıyıcıları gibi SLC süper ailesi taşıyıcıları ise ilaç alımını düzenlemekte; örneğin SLC31A1 platin türevlerinin hücre içine alınmasını

sağlamaktadır. Over kanserinde düşük SLC22A2 ekspresyonu, platin alımının azalması yoluyla dirençle ilişkilendirilebilmektedir [59].

Yüksek dereceli seröz over kanseri hastalarında ilaç direnci, genetik bozukluklar ve tümör hücrelerinin çeşitliliğiyle de ilişkilidir. Homolog rekombinasyon onarımı sistemi, özellikle BRCA1-2 gen kusurlarıyla bozulmakta; bu durum platin ve PARP inhibitörlerine duyarlılık sağlasa da, tedavi sırasında BRCA geninde ortaya çıkan ikincil mutasyonlarla onarım sistemi yeniden çalışmaya başlayabilir ve bu da edinilmiş ilaç direncine yol açabilmektedir. Ayrıca kanser kök hücreleri, değişken ve esnek doğaları sayesinde epigenetik değişikliklerle tedaviye uyum sağlayabilmekte ve ilaç direncinin oluşmasında önemli bir rol oynamaktadır [60]. EHMT1/2'nin aşırı ekspresyonu PARP inhibitörlerine direnç sağlamaktadır ve KRAS amplifikasyonu BRCA2 eksikliğinde dirençle ilişkilidir. Ayrıca mTOR yolak aktivasyonu FANCD2'yi artırarak platin duyarlılığını etkilemektedir. Bu mekanizmalar, epigenetik modifikasyonların ilaç direncini düzenlemede kritik bir rol oynadığını göstermektedir [57].

Yüksek dereceli seröz over kanserinde, farklı lncRNA'ların ekspresyon profilleri prognoz ve nüksün yanı sıra platin bazlı kemoterapiye yanıt ile de güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir. Bu imza, RUNX1-IT1, MALAT1, H19 ve HOTAIRM1 gibi iyi bilinen kanser ilişkili lncRNA'ları ve iki daha az tanımlanmış transkripti (LOC100190986 ve AL132709.8) içerir; söz konusu lncRNA'lar tedaviye dirençlilik ile de bağlantılıdır. Ayrıca, WT1-AS'in p53 yolunu miRNA aracılığıyla baskılaması, lncRNA'ların doğrudan ilaç direnci mekanizmalarına katkıda bulunduğunu göstermektedir [61].

1.6 Yüksek Dereceli Seröz Over Kanseri İlişkili Sinyal Yolları

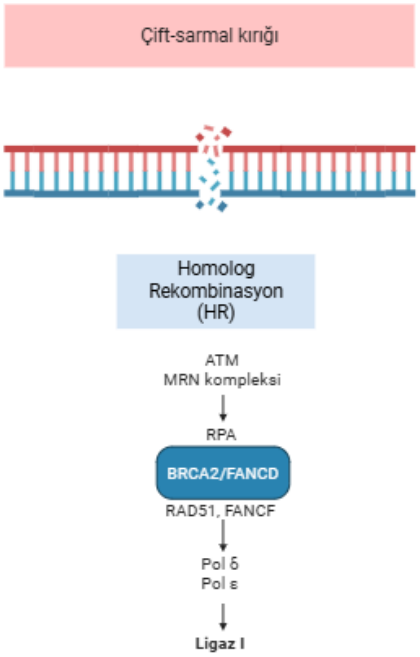
Yüksek dereceli seröz over kanseri ile ilişkili başlıca onkojenik sinyal yolları arasında; DNA onarım mekanizmaları (TP53, BRCA1/2), PI3K-AKT-mTOR, RAS, transforme edici büyüme faktörü-β (TGF-β) ve NOTCH sinyal yolları, hücre döngüsü düzenleyicileri (Rb1, CCNE1, CDKN2A) ile immün mikroçevre ve interferon yanıtı (özellikle IFNε) yer almaktadır [62].

1.6.1 DNA Onarım Mekanizmaları

Hücre sağkalımı, DNA replikasyonu, onarımı ve hücre döngüsünün düzenlenmesi gibi süreçleri yöneten DNA hasar yanıtı (DDR) mekanizması aracılığıyla genomik stabilitenin korunmasına bağlıdır [63]. HGSOC'nin genomik ayırt edici özellikleri arasında, somatik TP53 mutasyonları, germline ve somatik BRCA1/2 mutasyonları, homolog rekombinasyon (HR) eksikliği ve genomik instabilite yer almaktadır [64]. HR eksikliği, bir hücrenin homolog rekombinasyon ile çift sarmallı DNA kırıklarını etkili bir şekilde onaramamasıyla karakterize edilmektedir [65].

TP53, DNA hasarı, onkogenlerin aktivasyonu ve hipoksi gibi çeşitli dış veya iç streslere yanıt vermedeki rolü nedeniyle "genomun koruyucusu" olarak adlandırılmaktadır [66, 67]. HGSOC'de mutant p53, onkojenik PAX8 tarafından transkripsiyonel olarak upregüle edilmektedir. İşlevsel olarak, mutant p53, yabanıl tip represyon kaybı veya fonksiyon kazanımı aktiviteleri yoluyla proliferasyon, invazyon ve metastazı teşvik eden PLAC1 ve Notch3 gibi genleri aktive ederek onkogenezi yönlendirmektedir. Mutant p53, β-arrestin1 ve YAP ile kompleks oluşturarak TEAD aracılığıyla transkripsiyonel hedefleri aktive ederken; ACP6 enzimini baskılayarak lipid metabolizmasını ve hücresel invazyonu da düzenleyerek kanserin ilerlemesine farklı yönlerden katkı sağlamaktadır [68].

BRCA1 ve BRCA2 genleri tümör baskılayıcılar olarak sınıflandırılmaktadır ve genomik bütünlüğü korumak için HR yoluyla çift sarmallı DNA (dsDNA) kırıklarının onarımında rol almaktadır. Replikasyon proteini A (RPA), tek sarmallı DNA uçlarını kaplayarak bu kırık uçları stabilize eder. BRCA2, RPA'nın RAD51 proteini ile yer değiştirmesini kolaylaştırarak tek sarmallı DNA üzerinde RAD51 filamentlerinin oluşmasını sağlamaktadır. Bu filament, homolog bir DNA dizisini tanımakta ve onarımı başlatmaktadır (Şekil 1.2) [69]. Ayrıca, BRCA1/2 transkripsiyonel ko-regülasyonu, kromatin şekillenmesinde ve hücre döngüsü kontrolünde yer almaktadır [70]. Yumurtalık kanserinde BRCA1/2 için germline patojenik varyant prevalansı %15 civarındadır [71].



Şekil 1.2 BRCA2 ve homolog rekombinasyondaki rolü [72] (BioRender.com ile oluşturulmuştur)

1.6.2 PI3K-AKT-mTOR Sinyal Yolu

Fosfatidilinositol 3-kinazlar (PI3K'lar), hücre çoğalması, büyüme, hayatta kalma, hareketlilik ve metabolizmayı içeren birçok fizyolojik işlevi ve hücresel süreci kontrol eden bir lipid kinaz ailesidir. PI3K yolunun aşırı aktivasyonu, insan tümörlerinde sıkça görülmektedir ve çoğunlukla genetik veya epigenetik değişikliklerle protein tirozin fosfotaz ve tensin geninin (Phosphatase and Tensin Homolog, PTEN) somatik kaybından kaynaklanmaktadır. PI3K sinyalizasyonu reseptör tirozin kinazların aktivasyonu veya PI3K izoformlarındaki değişikliklerle de aktive edilebilmektedir [73].

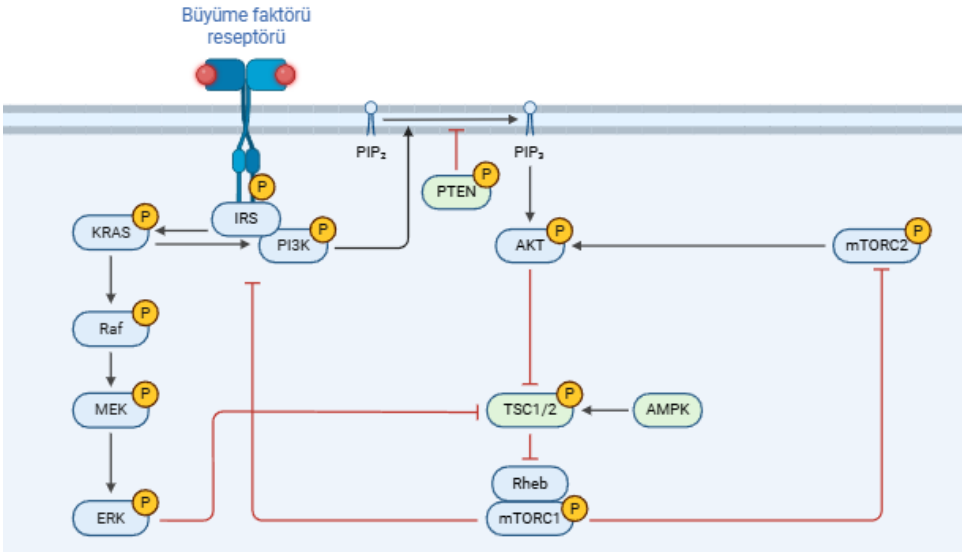
PI3K-AKT-mTOR sinyal yolunun, tümör mikro çevresinde bağışıklık hücrelerinin (örneğin B ve T lenfositleri, doğal öldürücü hücreler, makrofajlar ve MDSC'ler) farklılaşması, aktivasyonu ve migrasyonu üzerinde belirleyici rol oynadığı bilinmektedir. Bu yolak, bağışıklık sisteminin tümöre karşı verdiği yanıtı şekillendirmenin yanı sıra, tümör damar oluşumunu artırarak anjiyogenezi desteklemekte ve stromal fibroblastların tümör büyümesini teşvik eden faktörleri salgılamasını sağlayarak tümör gelişimine katkıda bulunmaktadır [74].

Fosfatidilinositol 3-kinaz tarafından başlatılan sinyalleri entegre eden merkezi bir serin/treonin kinaz olan AKT, hücre çoğalması, döngü progresyonu, apoptozun

baskılanması, protein sentezi ve hücresel büyüme gibi birçok biyolojik süreci düzenleyen aşağı akış hedeflerini aktive etmektedir [75]. Bu hedefler arasında özellikle dikkat çeken mTOR, kanserin ilerlemesi ve metastatik potansiyelinin artırılmasında önemli görevler üstlenmektedir [76]. Ayrıca, AKT'nin aşırı aktivasyonu, kemoterapiye karşı direnç gelişimi ile ilişkilendirilmekte olup, bu nedenle hem tanısal bir biyobelirteç hem de terapötik bir hedef olarak değerlendirilmektedir [77].

Fosfatidilinositol 3-kinaz izoformları, farklı genler tarafından kodlanan katalitik ve düzenleyici alt birimlerden oluşmaktadır. p110α ve p110β tüm dokularda eksprese edilirken, p110δ ve p110γ özellikle lökositlerde ve hematopoetik sistemde ifade edilir; sınıf II PI3K'ler yalnızca katalitik alt birim içerirken, sınıf III PI3K tek izoform olan Vps34'ten oluşmaktadır [78].

PI3K-AKT-mTOR sinyal yolunun aktivasyonu fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfatın (PIP2), PI3K tarafından fosfatidilinozitol-3,4,5-trisfosfata (PIP3) dönüştürülmesiyle başlamaktadır. PIP3, AKT'nin plazma zarına bağlanmasını sağlamaktadır ve burada fosfoinositid bağımlı kinaz-1 (PDK1) aracılığıyla fosforile edilerek kısmen aktif hale getirilmektedir. Aktif AKT, PRAS40 ve TSC2'yi fosforile ederek mTOR kompleksi 1 (mTORC1) aktivasyonuna neden olur; bu kompleksin hedefleri arasında 4E-BP1 ve S6K1 yer alır ve böylece protein sentezi ile hücre proliferasyonu desteklenir [79]. AKT ayrıca mTORC1'i doğrudan fosforile ederek veya TSC1/2 kompleksini inhibe ederek dolaylı yoldan aktive eder. mTOR kompleksi 2 (mTORC2), Ser473'te AKT'yi fosforile ederek PI3K yolu üzerinde bir pozitif geri bildirim döngüsü oluşturur. Ayrıca bu sinyal yolu, PTEN ve INPP4B gibi fosfatazların PIP3'ü inaktif formlara dönüştürmesiyle negatif olarak düzenlenmekte ve AKT aktivasyonu engellenmektedir (Şekil 1.3) [80].



Şekil 1.3 PI3K-AKT-mTOR sinyal yolu (BioRender.com ile oluşturulmuştur)

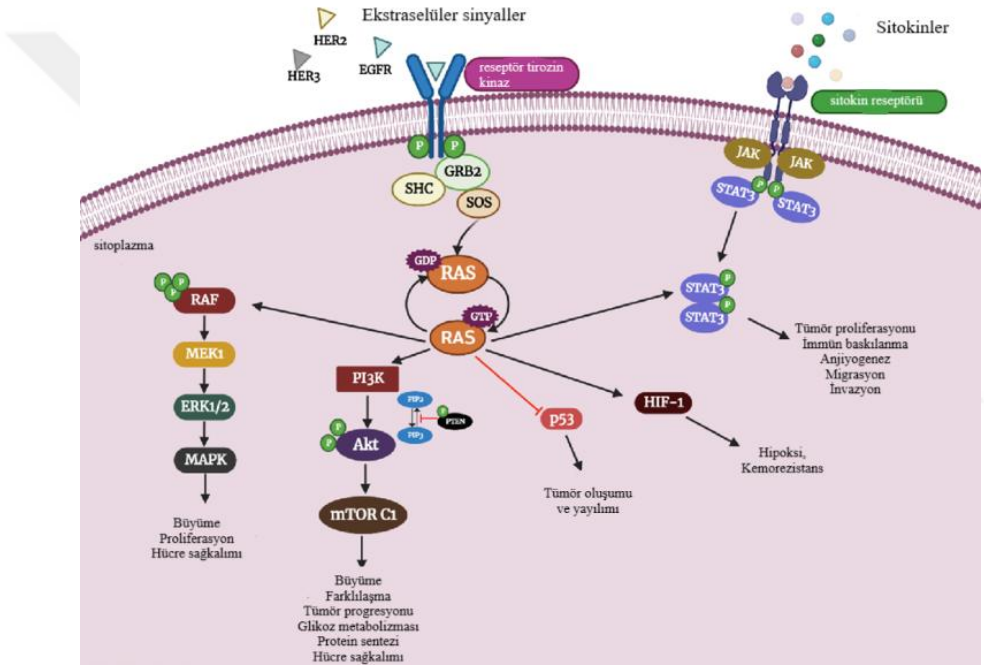
Over kanserine yönelik yapılan çalışmalar, ileri evre hastaların asit ve doku örneklerinde p-AKT, p-p70S6K, p-4EBP1 ve p-S6 gibi PI3K-AKT-mTOR sinyal yolu bileşenlerinin artan fosforilasyonunu göstermiş olup bu disregülasyonun hücre proliferasyonu, migrasyonu ve kemoterapiye direnci desteklediğini ortaya koymuştur. Hücre kültürü çalışmalarında, mTORC1'in mTORC2'ye göre daha kritik bir role sahip olduğu ve hem mTOR hem de AKT hedeflemesinin, Raptor veya Rictor knockdown ile hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca, AKT inhibisyonunun kemoterapiye dirençli HGSOC hücrelerinde apoptozu yeniden tetikleyerek platine duyarlılığı geri kazandırabilmesi sayesinde mTOR ve AKT yolaklarının standart kemoterapi ile kombinasyonunun umut verici bir strateji olduğu ileri sürülmüştür [81].

Yüksek dereceli seröz over kanserlerin önemli bir kısmında PI3K/AKT/mTOR yolu, PIK3CA (%17), AKT1 (%3), AKT2 (%6) genlerindeki kopya sayısı değişiklikleri ve PTEN delesyonu (%7) gibi genetik değişiklikler yoluyla deregülasyona uğramaktadır [62].

1.6.3 RAS Sinyal Yolu

Ras gen ailesi, farklılaşma, hücre iskeleti organizasyonu ve protein transferi de dahil olmak üzere birçok hücresel sürecin düzenlenmesinden sorumlu olan küçük GTP bağlayıcı proteinleri kodlamaktadır. İnsan hücrelerindeki onkojenik Ras genleri arasında, H-ras, N-ras ve K-ras bulunmaktadır [82]. RAS ailesi, büyüme

faktörlerinin reseptör tirozin kinazlara (RTK), G proteinine bağlı reseptörlere (GPCR), sitokin reseptörlerine ve hücre dışı matriks reseptörlerine bağlanmasıyla aktive edilmektedir. Bu bağlanma RTK'nın otofosforilasyonunu tetiklemekte ve büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2 (GRB2) adaptör proteininin bağlanmasına yol açmakta, ardından GRB2, guanin nükleotid değişim faktörü olan SOS proteinlerini plazma membranına getirir. SOS gibi guanin nükleotid değişim faktörleri (guanine nucleotide-exchange factors, GEF), RAS'ı inaktif GDP bağlı formdan aktif GTP bağlı forma geçirirken, GTPaz aktive edici proteinler (GAP'ler) olan RASA1 ve SPRED1 gibi proteinler bu süreci tersine çevirerek RAS aktivitesini düzenlemektedir (Şekil 1.4)[83].



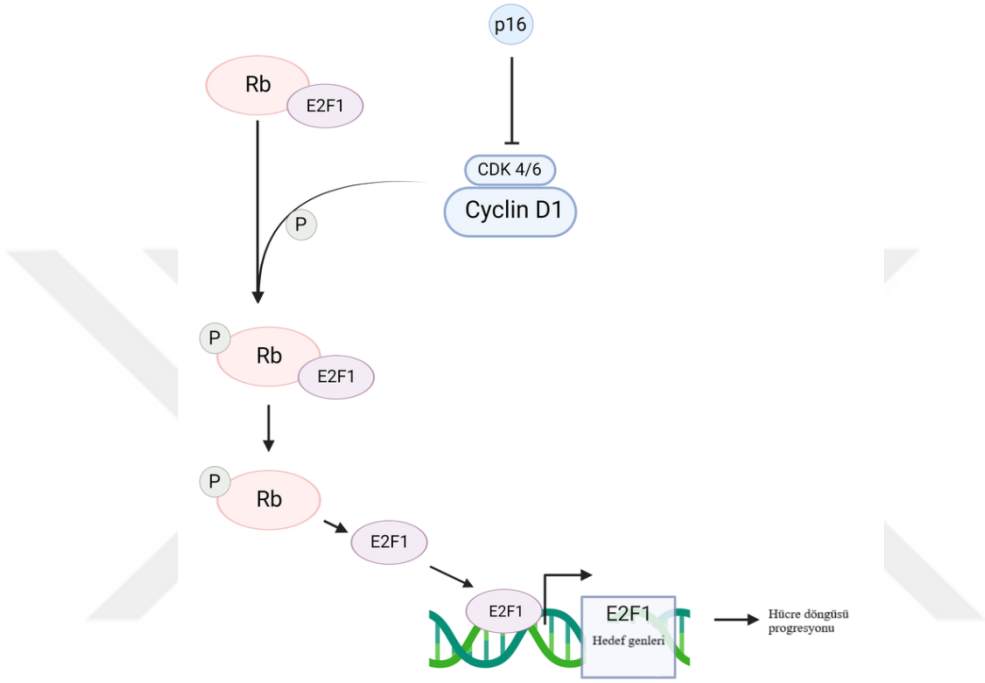
Şekil 1.4 RAS sinyal yolu [84]

Yüksek dereceli seröz over kanseri hastalarına ait doku örneklerinde, RAS yolak bileşenleri olan KRAS, NRAS ve BRAF genlerinde mutasyonlar saptanmıştır. Bu mutasyonlar sıklıkla TP53 mutasyonları ile birlikte görülmekte olup, RAS/RAF yolak aktivasyonu ile tümör gelişiminde kooperatif bir rol oynayabilmektedir. HGSOC alt tipinde KRAS mutasyonları %5,9 oranında görülürken, NRAS mutasyonları %1'den düşük sıklıkta rapor edilmiştir [84].

1.6.4 Hücre Döngüsü Düzenleyicileri

Hücre döngüsü, siklin bağımlı kinaz (CDK)-siklin kompleksleri ve kontrol noktaları ile düzenlenen bir dizi koordineli olayla gerçekleşir; bu mekanizmalar

DNA hasarına yanıt vererek hücre bölünmesini durdurabilmektedir [85]. Hücre döngüsü G1, S, G2 ve M olmak üzere dört fazdan oluşmaktadır. G1 fazında mitojenik sinyaller D tipi siklinlerin (D1, D2, D3) üretimini artırır ve bunlar CDK4/6 ile kompleks oluşturarak retinoblastoma proteinini (Rb) fosforile eder. Fosforile Rb, E2F transkripsiyon faktörlerini serbest bırakmakta ve hücrenin S fazına geçmesine olanak sağlamaktadır (Şekil 1.5) [86].



Şekil 1.5 Retinoblastoma proteini ve siklin etkileşimleri [87]

S fazında siklin E ve A, CDK2'yi aktive ederek DNA replikasyonunu başlatır ve G2/M geçişinde siklin A-CDK1 ve siklin B-CDK1 kompleksleri mitozu düzenler. Siklin B-CDK1 kompleksi, mitotik süreçleri başlatmak için çeşitli proteinleri fosforile eder. CDK aktivasyon kinazı (CAK) ise siklin-CDK komplekslerini aktif hale getirerek hücre döngüsünün ilerlemesini destekler [88].

Kanserin temel özelliklerinden birini oluşturan proliferatif sinyalizasyon sürekliliği, hücrelerin durmaksızın bölünmesine neden olmaktadır [85]. Proto-onkogenlerin kazanımına (gain-of-function) ve tümör baskılayıcı genlerin kaybına (loss-of-function) neden olan mutasyonlar, hücre çoğalmasının kontrolsüz hale gelmesine yol açmaktadır [89].

Hücre döngüsünde görev alan CCNE1, CDC20 ve CDCA8 gibi genlerin de içinde bulunduğu 26 genin, HGSOC hastalarının %5'inden fazlasında amplifiye olduğu

saptanmış; bu genlerin hem tanı hem de nüks gelişimiyle ilişkili olabileceği belirtilmiştir [90].

1.6.5 TGF- β Sinyal Yolu

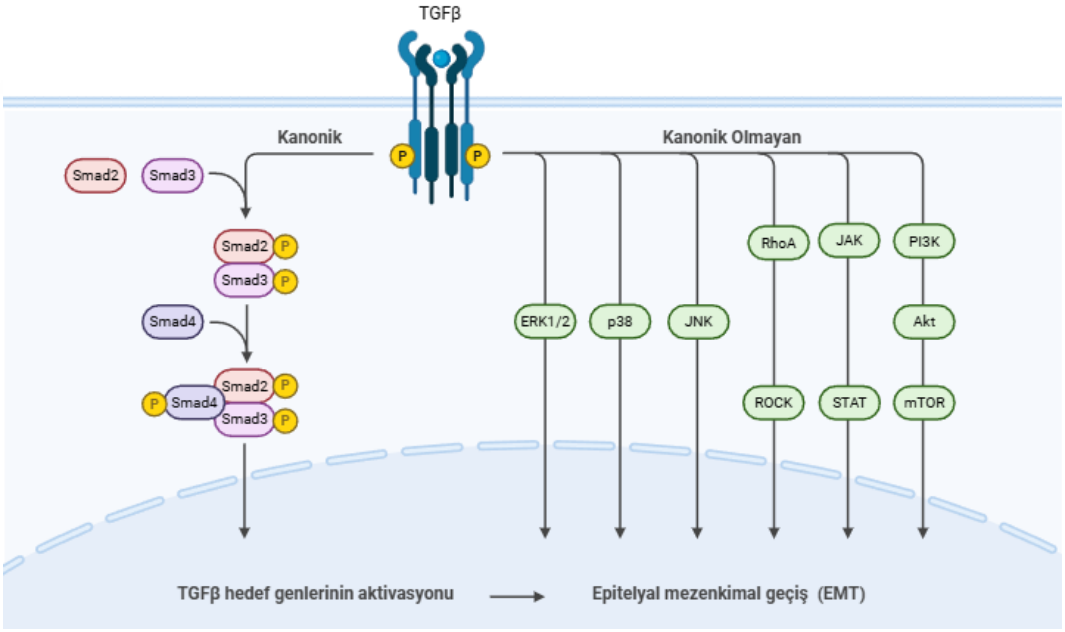
TGF-β, bağ dokusu homeostazı, immün yanıt ve hücre farklılaşması gibi pek çok biyolojik süreçte rol oynayan önemli bir sitokindir. Biyolojik aktivitesi, latent (gizli, inaktif) kompleks yapısından aktif forma dönüşmesiyle gerçekleşmektedir. Bu süreçte, integrinler aracılığıyla gerçekleşen aktivasyon en iyi tanımlanan mekanizmalardan biri olup; asit-baz değişimleri, reaktif oksijen türleri (ROS), TSP-1 ve proteazlar gibi faktörlerle gerçekleşen integrin bağımsız yollar da etkili olmaktadır [91].

TGF-β sinyal kaskadı, aktive edilmiş bir hücre dışı TGF-β ligandının, TGF-β tip II reseptörü (TβRII) ve TGF-β tip I reseptörünü (TβRI) bir kompleks oluşturmak üzere bir araya getirmesiyle başlatılmaktadır [92]. TGF-β sinyal yolunun kanonik düzenleyicileri olan Smad proteinleri, R-SMAD (SMAD1, 2, 3, 5, 8), Co-SMAD (SMAD4) ve inhibitör SMAD'ler (SMAD6, 7) olmak üzere üç alt gruba ayrılmaktadır. R-SMAD'ler, reseptör aracılı fosforilasyon sonrası SMAD4 ile kompleks oluşturarak nükleusa taşınmakta ve hedef genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir. Bu süreç, farklı R-SMAD'lerin aktivasyonunu içerirken; SMAD6/7 ile birlikte SKI ve SKIL gibi negatif düzenleyiciler, bu sinyalizasyonu inhibe edebilmektedir [93].

TGF-β reseptörleri, Smad proteinleri ile doğrudan etkileşime girmeden, sinyalizasyonu düzenleyen bazı proteinler (TAK1, MEKK1 gibi) yoluyla da sinyal iletimini gerçekleştirebilir [94]. TGF-β reseptörleri tarafından fosforilasyon veya doğrudan etkileşim yoluyla aktive edilen bu Smad dışı (kanonik olmayan) yolaklar, MAP kinaz (MAPK) yolaklarının çeşitli uzantılarını, Rho benzeri GTPaz sinyal yolaklarını ve PI3K-AKT yolaklarını içermektedir [95].

Gelişim sürecinde ve çeşitli morfogenetik olaylar sırasında, epitel hücreleri, adherens bağlantılarının kaybı, aktin iskeletinin yeniden düzenlenmesi ve E-cadherin ekspresyonunun azalması ile karakterize edilen epitelden mezenkimal geçiş (EMT) adı verilen bir süreçten geçmektedir. Artan TGF-β sinyalizasyonunun, kanser hücrelerinde EMT'yi tetikleyerek invazyonu ve metastazı kolaylaştırdığı; ayrıca anjiyogenezi artırarak migrasyona uğrayan

mezenkimal hücrelerin tümör mikroçevresinden uzaklaşıp yayılmasına olanak sağladığı gösterilmiştir (Şekil 1.6) [96]. TGF-β1 tarafından AKT sinyalinin aktivasyonunun hücre proliferasyonunu teşvik ettiği literatürde bildirilmiştir. Ayrıca TGF-β, miR-216a ve miR-217'nin ekspresyonunu artırarak Smad7 ve PTEN'in baskılanmasına neden olmakta ve PI3K-AKT yolunun aşırı aktivasyonuna sebep olmaktadır [97]. TGF-β reseptörleri MMP'leri, p38 MAPK ve Çinko parmak E-box bağlayıcı homeobox 1 (Zinc finger E-box-binding homeobox 1, ZEB1), ZEB2, Snail ve Slug'u aktive ederek EMT'ye yol açmakta, MAPK sinyal yolu aracılığıyla hedef gen ifadesini düzenleyebilmektedir [98].

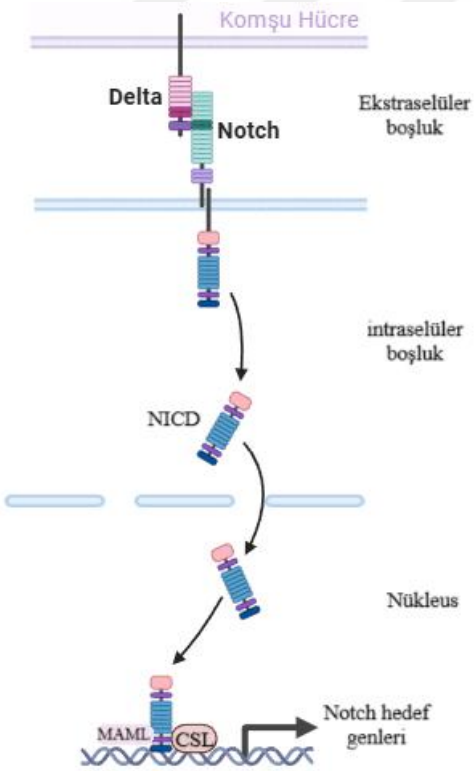


Şekil 1.6 TGF-β sinyalizasyonun kanonik ve kanonik olmayan yolları [99] (BioRender.com ile oluşturulmuştur)

Over kanserinde TGF-β sinyalizasyonunun, EMT ve SMAD bağımlı ya da SMAD bağımlı olmayan yolaklar aracılığıyla invazyonu artırdığı ve kök-benzeri özelliklerin kazanımını desteklediği gösterilmiştir. Over kanseri hücreleri tarafından salgılanan TGF-β1, peritonel mezotelyal hücrelerde fibronektin ekspresyonunu indükleyerek kanser hücrelerinin kolonizasyonunu kolaylaştırmaktadır [100]. TGF-β yolağı ayrıca TME'de bağışıklığı baskılamakta ve kemorezistansa katkıda bulunmaktadır [59].

1.6.6 Notch Sinyal Yolu

Notch sinyal yolu, iki komşu hücre arası temasa bağımlı bir mekanizmaya sahiptir; bir hücre Notch reseptörünü (Notch1-4), diğeri ise ligandı (Jagged1/2 veya Delta-like) taşımaktadır [101, 102]. Ligand ve reseptörün etkileşimi, Notch reseptöründe ardışık iki proteolitik kesime (S2 ve S3) yol açar; bu kesimler ADAM proteazları ve γ-sekretaz kompleksi tarafından gerçekleştirilir ve sonunda Notch intraselüler domain (NICD) ortaya çıkar [101]. NICD nükleusa geçerek CSL (CBF1/RBP-J/Su(H)/Lag-1) isimli transkripsiyon faktörleriyle kompleks oluşturur ve gen ekspresyonunu başlatır [101, 103]. Bu kompleks, HES ve HEY gibi hedef genlerin transkripsiyonunu uyararak hücre farklılaşması gibi süreçleri düzenlemektedir (Şekil 1.7) [103].



Şekil 1.7 Notch sinyalizasyonunun aktivasyonu [104] (BioRender.com ile oluşturulmuştur)

Notch reseptörleri sentez sonrası, golgide çeşitli glikozilasyon işlemlerinden geçerek sinyalin gücünü ve bağlama özgüllüğünü ayarlayan bir yapı elde etmektedir. Ayrıca, ligand sunan hücrede ligand, endositoz yoluyla hücre içine alınarak sinyalin başlatılmasına katkı sağlamaktadır [101, 102]. Notch sinyal yolundaki mutasyonlar ve anormal aktivasyon, birçok kanserde tümör baskılayıcı

ya da onkojenik bir rol oynayabilmektedir [105]. Özellikle, akciğer, karaciğer ve kolorektal kanser türlerinde Notch'un onkojenik etkileri gösterilmiştir [106].

Notch sinyal yolu, over kanserinde hücre proliferasyonu, invazyon, anjiyogenez ve kemorezistans gibi süreçleri destekleyen kritik bir sinyal yoludur. Notch2, Notch3, MAML1 ve ADAM17'nin yüksek ekspresyonu ileri FIGO evresi, nüks ve kötü prognozla bağlantılı bulunmuştur. Ek olarak, over kanserinde Notch yolu, VEGF–VEGFR eksenine bağlı anjiyogenez süreciyle de ilişkilidir; özellikle DLL4 ve Notch1 ekspresyonundaki artışın VEGFR1 ve VEGFR2 düzeylerindeki yükselme ile paralellik göstermesi, bu moleküller arasında anlamlı bir ilişki olduğu göstermiştir [107]. Kanser Genom Atlası (The Cancer Genome Atlas Program, TCGA) verilerine göre Notch sinyal yolu HGSOC vakalarının %22'sinde deregülasyon göstermektedir ve Notch3 mRNA seviyeleri vakaların %63'ünde benign tümörlere kıyasla artmıştır. Yüksek Notch3 seviyeleri kemorezistans ve kötü bir genel sağkalım ile ilişkilendirilmiştir [62].

1.6.7 İnterferon Yanıtı

İnterferonlar (IFN'ler), yumurtalık kanseri hücrelerinde hem doğrudan antitümöral etkiler hem de bağışıklık sistemini modüle edici roller üstlenmektedir. IFN-β'nin TRAIL ligandını aktive ederek ölüm reseptörleri yoluyla apoptozu indüklediği, IFN-γ'nın ise p53/p21 ekseni üzerinden hücre döngüsünü durdurup sitotoksisiteyi artırdığı gösterilmiştir. Ancak bu sitokinlerin etkileri bağlama bağımlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir; bazı IFN sinyallizasyon yolları, tümör hücrelerinde proliferasyonu tetikleyebilir veya PD-L1 ekspresyonunu artırarak bağışıklıktan kaçış mekanizmalarını devreye sokabilir [108].

Farelerle yapılan bir çalışmada, IFNε uygulamasının over kanseri modeli olan ID8 hücrelerini taşıyan hayvanlarda peritondaki CD4+, CD8+ T hücreleri ve NK hücrelerinin aktivasyonunu artırdığı gösterilmiştir [109]. Over kanserinde CD8+ lenfositler tarafından salgılanan IFN-γ'nın, tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunu artırarak tümör büyümesini teşvik ettiği bildirilmiştir. JAK1/STAT1/IRF1 yolakları aracılığıyla gerçekleşen bu süreç, over kanserinde interferonların hem anti-tümör bağışıklığı aktive eden hem de immün kaçışı destekleyen çift yönlü (dual) rolünü vurgulamaktadır [110].

1.7 İlaç Yeniden Konumlandırma ve Pirfenidon'un Antikanser Potansiyeli

1.7.1 İlaç Yeniden Konumlandırma

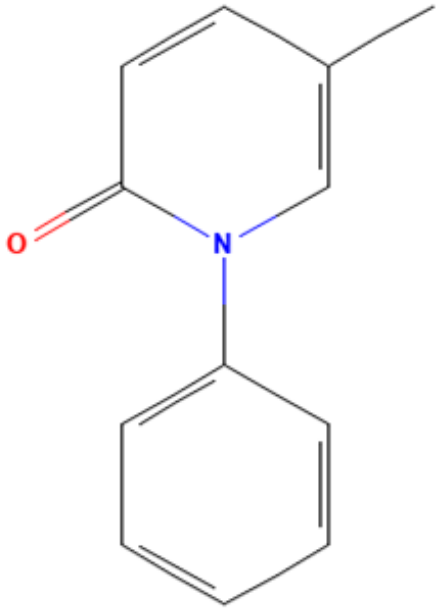
İlaç yeniden konumlandırma (drug repurposing), mevcut bir ilacın ilk onaylandığı hastalık dışında yeni bir hastalık için geliştirilmesi ve bu sayede ilacın yeniden onay alarak hastalara daha kolay ulaşması, tedavi sürecinde daha net bilgiler ve rehberlik sunulmasıdır [111]. Yeni bir ilaç geliştirme sürecinin, yüksek maliyet, uzun zaman ve başarısızlık oranın yüksek olması nedeniyle sınırlılıkları bulunmakta ve süreç yavaş ilerlemektedir [112, 113]. Bu duruma karşılık ilaç yeniden konumlandırma, daha düşük maliyet, daha kısa geliştirme süresi ve daha az riskle yeni tedavi alanları sunarak ilaç geliştirmede etkili bir alternatif oluşturmaktadır [113]. İlaç yeniden konumlandırma, sadece eski ilaçlara yeni hedefler bulmak değil; ilacın hastalıkla ne kadar ilgili olduğu, yan etkilerin kabul edilebilirliği ve ilacın yasal durumu gibi pek çok faktörün değerlendirilmesini gerektirmektedir [114].

Kanser tedavisinde ilaç yeniden konumlandırma, onkoloji dışı ilaçların kanser hücrelerine karşı kullanılmasıyla daha hızlı ve düşük maliyetli tedavi seçenekleri sunmaktadır. Bu ilaçlar, apoptozu indükleme, tümör proliferasyonunu ve metastazını engelleme, bağışıklık sistemini aktive etme gibi çeşitli mekanizmalarla etkili olabilmektedir [115]. Kanser tedavisinde kullanılan yeniden konumlandırılmış ilaçlara bir örnek olan Thalidomide, 1953'te bulantı önlemeye yönelik onaylanmıştır ancak doğum kusurlarına yol açtığı için 1963'te piyasadan çekilmiştir [116]. Daha sonra multipl miyelom hastalarında etkili olduğu gösterilerek, 2006 yılında FDA (Food and Drug Administration) tarafından dexamethasone ile birlikte multipl miyelom tedavisi için kullanımı onaylanmıştır [116, 117].

1.7.2 Pirfenidon ve Antikanser Potansiyeli

Pirfenidon, kronik seyirli, akciğer fonksiyon kaybıyla karakterize ve bireyin yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen bir hastalık olan hafif-orta şiddetteki idiyopatik pulmoner fibrozis tedavisinde kullanılan, oral yolla uygulanan bir

piridin türevidir (Şekil 1.8) [118]. Pirfenidon için önerilen doz, günde üç kez 801 mg olacak şekilde (toplam 2403 mg/gün) uygulanmaktadır [119].



Şekil 1.8 Pirfenidon'un iki boyutlu yapısı [120]

Pirfenidon'un glioblastoma, pankreas ve akciğer kanseri gibi çeşitli malignitelerde TGF-β1 ve TGF-β2 ekspresyonunu baskıladığı, bu yolla glikoliz ve EMT gibi tümör progresyonuna katkı sağlayan mekanizmaları inhibe ettiği gösterilmiştir [121-123]. Ayrıca kaspaz-3 aracılı apoptozu tetiklediği ve matriks metalloproteinaz (MMP) düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir [122, 124]. Ayrıca, Pirfenidon'un tümör mikroçevresinde kanserle ilişkili fibroblastların oluşumunu baskılayarak stromal-tümör etkileşimini bozduğu ve TGF-β'nın yanısıra α-SMA, kolajen I, PD-L1 ve CCL17 gibi pro-tümörijenik genlerin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Bu etkiler aracılığıyla Pirfenidon; proliferasyon, bağ doku sertliği, immünsüpresyon, ilaç direnci, EMT ve metastaz gibi kötü prognozla ilişkili süreçlerin önüne geçme potansiyeli taşımaktadır [125]. OVCAR8 hücre hattından türetilmiş ksenograft modellerde TGF-β inhibitörü Galunisertib ile birlikte uygulandığında, fibrotik tümör mikroçevresiyle ilişkili FAP ve COL11A1 gibi biyobelirteçlerin baskılandığı ve bu etkinin EMT'yi ve invazyon potansiyelini azalttığı raporlanmıştır [126]. Pirfenidon, halihazırda onaylı bir ilaç olması nedeniyle Pirfenidon, geleneksel ilaç geliştirme sürecine kıyasla toksisite, zaman ve maliyet açısından önemli avantajlar sunmaktadır [127].

1.8 Doğal Kaynaklı Bileşikler ve Metilhirokinonun Antikanser Potansiyeli

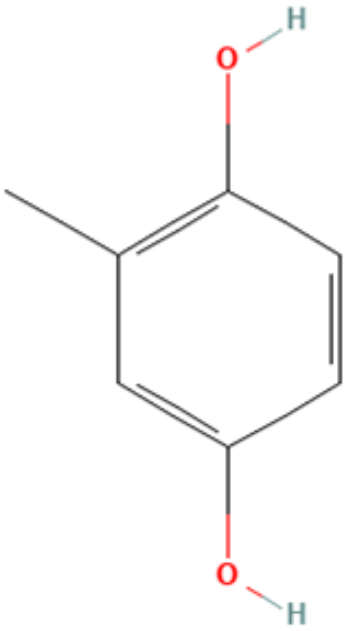
1.8.1 Doğal Kaynaklı Bileşikler ve Kanser Tedavisindeki Potansiyeli

Son yıllarda, doğal kaynaklı bileşikler, kanserin önlenmesinde ve tedavi süreçlerinde kullanım açısından giderek artan bir ilgi odağı haline gelmiştir. Bakteriler, bitkiler ve deniz organizmalarından elde edilen bu bileşikler, doğal bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Geniş kimyasal çeşitlilikleri, özgün yapısal özellikleri ve düşük toksisite profilleri nedeniyle biyolojik açıdan etkin maddeler olarak dikkat çekmekte ve kanser ilaçlarının geliştirilmesinde önemli bir rol üstlenmektedir [128]. Doğal kaynaklı bileşikler, hücre çoğalmasını baskılayabilmekte, hücre döngüsünü düzenleyebilmekte ve PI3K, matris metaloproteinazlar, Ras-Raf-MEK-ERK, toll benzeri reseptör (TLR) ile AKT gibi tümör gelişiminde rol oynayan çeşitli sinyal yolaklarını hedefleyerek hem kemoprevensiyon hem de kemoterapi açısından umut vaat eden tedavi seçenekleri sunmaktadır [129].

Su ortamları, karasal ekosistemlere kıyasla henüz yeterince keşfedilmemiş biyolojik çeşitliliğe sahip olmaları nedeniyle ilaç keşfi çalışmalarında öncelikli alanlardan biri olmuştur [130]. Kanser tedavisinde onaylanmış ilk deniz kaynaklı bileşik olarak bilinen Sitarabin (Ara-C), ilk kez bir deniz süngerinden izole edilmiş ve DNA polimeraz aktivitesini engelleyerek kanser hücrelerini öldürmesiyle tanınmıştır. 1969 yılında FDA tarafından lösemi tedavisinde kullanım için onaylanmıştır [131]. Bu ilaç ardından marine kaynaklı başka ilaçlar da kanser tedavisine yönelik kullanım için onay almıştır. Eribulin mesilat, mikrotübüllere bağlanarak hücre bölünmesini engeller ve apoptozu başlatır. Brentuksimab vedotin ise CD30 pozitif lenfoma hücrelerine yönelik bir antikor-ilaç konjugatı olarak mikrotübül oluşumunu engeller ve hücre döngüsünü durdurur. 2015 yılında yumuşak doku sarkomu ile yumurtalık kanseri tedavisi için FDA onayı alan Trabektedin (Yondelis), DNA'ya bağlanarak çift zincir kırıklarına yol açarak ve mikrotübül yapısını bozarak aktivite göstermektedir [132].

1.8.2 Metilhidrokinon ve Antikanser Potansiyeli

Marine kaynaklı bir bileşik olan metilhidrokinon, deniz yosununun simbiyotik mantarı olan Aspergillus'tan elde edilmektedir (Şekil 1.9).



Şekil 1.9 Metilhidrokinonun iki boyutlu yapısı [133]

Yapılan çalışmalarda, metilhidrokinonun hem insan vasküler endotel hücrelerinde hem de kolorektal kanser hücrelerinde anti-anjiyojenik özellikler sergilediği raporlanmıştır [134]. Bu etkilerin, endotel hücrelerinde vasküler endotalyel büyüme faktörü (VEGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) tarafından uyarılan AKT sinyal yolunun baskılanmasıyla bağlantılı olduğu bildirilmiştir [135]. Ayrıca, β-katenin aktivitesinin inhibisyonu ve Ras-Raf-MEK-ERK yolu gibi anjiyogenezde önemli rol oynayan sinyal yollarının aşağı regülasyonu ile bu bileşiğin anjiyogenez sürecine müdahale ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, metilhidrokinonun MMP'lerin hem ekspresyonunu hem de enzimatik aktivitesini azalttığı da literatürde yer almaktadır [134]. Hidrokinon türevi olması dolayısıyla, metilhidrokinonun çeşitli serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerine karşı elektron transferi yapabilme potansiyeli taşıdığı düşünülmektedir [136]. Molekülün yapısında bulunan iki hidroksil grubunun, serbest radikalleri uzaklaştırma kapasitesine katkı sağladığı öngörülmektedir [137].

1.9 Kombinasyon Tedavilerinin Kanser Tedavisindeki Önemi

Kombinasyon tedavisi, yani aynı semptom veya hastalık için iki veya daha fazla ilacın birlikte kullanılması, tek bir ilacın uygulanmasının yetersiz bir terapötik yanıt verdiği durumlarda sıklıkla uygulanan bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir [138]. Kanser tedavisinde, iki veya daha fazla terapötik ajanın bir arada kullanılması, tümör hücrelerini besleyen veya çoğalmalarını sürdüren farklı yolakları eş zamanlı hedefleyerek monoterapilere kıyasla çok daha güçlü ve sinerjik bir antitümör etki sağlar. Monoterapilerin, hızlı bölünen hücreler arasından hem tümör hem de sağlıklı hücreleri non-selektif olarak hedef alması, kemoterapinin saç folikülleri, gastrointestinal mukozası, eritrosit ve lökosit gibi dokularda ciddi yan etkilere yol açmasına neden olur. Kombinasyon terapilerinde ise sinerjistik etki sayesinde her bir ilacın dozu düşürülebilmektedir. Böylece hem antitümör etkinlik artmakta hem de sistemik toksisite, yani sağlıklı dokulara verilen zarar, önemli ölçüde azalmaktadır [139, 140].

Sitotoksik ajanlarla VEGFR, EGFR, MAPK, PI3K veya mTOR hedefleyici ilaçların eş-zamanlı uygulanması, tek başına uygulanan stratejilere kıyasla geliştirilmiş antitümör etkinlik sunmak üzere birçok klinik çalışmada test edilmiştir [141]. Over kanseri tedavisinde, artmış DNA hasarının açığa çıkardığı neoantijenlerin immün yanıtı güçlendirmesi sebebiyle DNA onarım inhibitörleri ile immün kontrol noktası blokajını kapsayan kombinasyonlar geliştirilmiştir. Bunun yanı sıra, PARP inhibitörleri, PD-1/PD-L1 veya CTLA-4 blokajı ve gerektiğinde antianjiyogenik ajanları içeren çoklu yolak modülasyonu stratejileri, tümör mikroçevresi ve direnç mekanizmalarını bütünsel olarak hedeflemeyi amaçlamaktadır. Böylelikle, tedavi protokolü hastanın özelliklerine göre en uygun doz ve ajan kombinasyonuyla ayarlanabilir ve yanıtı öngören biyobelirteçler kullanılarak hangi hastaların bu stratejiye en iyi yanıtı vereceği belirlenebilecektir [142].

1.10 Caov-3 Hücre Hattı ve Özellikleri

Caov-3, 1976 yılında 54 yaşındaki yumurtalık kanseri hastasının yumurtalığından izole edilen epitelyal morfolojiye sahip bir hücre hattıdır [143]. Hücre hattının karakteristik özelliklerine Tablo 1.1'de yer verilmiştir.

Tablo 1.1 Caov-3 hücre hattı özellikleri

Organizma	*Homo sapiens* (insan)
Doku	Over (yumurtalık)
Yaş	54
Cinsiyet	Kadın
Morfoloji	Epitelyal
Büyüme Özellikleri	Adherent
Hastalık	Adenokarsinom
Etnik Köken	Beyaz

Bu tezin temel amacı, onaylı bir ilaç olan Pirfenidon, hidrokinon türevi metilhidrokinon ve bu iki bileşiğin ikili kombinasyonunun, yüksek dereceli seröz yumurtalık kanseri üzerinde antikanser potansiyelinin in vitro olarak değerlendirilmesidir. Yapılan literatür taramaları ve biyoinformatik analizler sonucunda, Pirfenidon'un glikoliz ve epitalyel mezenkimal geçişin baskılanması, kaspaz ilişkili apoptozun indüklenmesi ve VEGF sekresyonunun azaltılması özellikleriyle over kanseri tedavisine yönelik potansiyel taşıdığı öngörülmüş, tümör mikroçevresi sınırlamalarını aşmak amacıyla antianjiyojenik özelliği bilinen, AKT ekspresyonunu baskılayan ve doğal kaynaklı bir bileşik olan metilhidrokinon ile sinerjik kombinasyon çalışmaları yapılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, Caov-3 hücre hattı kullanılarak, Pirfenidon, metilhidrokinon ve ikili kombinasyon uygulamasının, hücre canlılığı, apoptoz ve koloni oluşumu üzerindeki etkileri incelenmiştir.

2
MATERYAL-METOT

2.1 Materyal

Tez çalışmasında kullanılan cihazlara Tablo 2.1'de, kimyasal malzemeler ve kitlere Tablo 2.2'de, sarf malzemelere Tablo 2.3'te yer verilmiştir.

Tablo 2.1 Kullanılan cihazların listesi

Cihaz	**Marka/Model**
-80°C Dondurucu	Thermo Fisher Scientific Forma 700 series
Biyogüvenlik Kabini	Hedlab XPROII
CO_2 İnkübatör	Biosan, ES 20
Etüv	Memmert
Faz Kontrast Mikroskop	Olympus CKX4
Floresans Faz-Invert Mikroskop	Zeiss Axio Vert
Hassas Terazi	Shimadzu
Microplate Okuyucu	BioTek PowerWave XS2 veya BioTek Epoch 2
Mini Santrifüj Cihazı	Hermle Z 206 A
Nanodrop	Thermo Scientific NanoDrop One Microvolume
Otoklav	Hirayama
Saf Su Cihazı	Sartorious Wall Mounted Arium Pro Ultrapure Water System
Santrifüj	Beckmann Coulter Allegra X-30 R

Tablo 2.1 Kullanılan cihazların listesi (Devamı)

pH metre	Hanna
UV-Vis Spektrofotometre	Shimadzu UV-1800
Vorteks	Velp Scientifica

Tablo 2.2 Kullanılan kimyasal malzemeler ve kitlerin listesi

Ürün	Firma	Ürün Kodu
Annexin V-FITC Early Apoptosis Detection Kit	Abcam	ab14085
Fetal Bovine Serum	Gibco	A5256701
Fiksaitf solüsyon	Thermo Fisher Scienific	J61984.AP
Kristal viyole	SIGMA ALDRICH	V5265
Metilhidrokinon	SIGMA ALDRICH	112968-250G
PBS, pH 7.4	Gibco	10010015
Penicilin-Streptomycin (10,000 U mL)	Gibco	15140122
Pirfenidon	MEDCHEM	HY-B0673-1
RPMI Medium 1640	Gibco	11875093
Trypsin 0.25 EDTA	Gibco	25200056
WST-1 Assay Kit	Abcam	ab65473

Tablo 2.3 Kullanılan sarf ve malzemelerin listesi

Ürün	Marka
2 ml steril Eppendorf tüp	NEST
2 ml steril cryo tüp	NEST
15 ml steril santrifüj tüp	NEST
50 ml steril santrifüj tüp	NEST
1 ml steril serolojik pipet	NEST
5 ml steril serolojik pipet	NEST

Tablo 2.3 Kullanılan sarf ve malzemelerin listesi (Devamı)

10 ml steril serolojik pipet	NEST
12-well steril plate	NEST
96-well steril plate	NEST
25 cm² filtre kapaklı steril kültür kabı	NEST
75 cm² filtre kapaklı steril kültür kabı	NEST

2.2 Biyoinformatik Çalışmalar

2.2.1 Diferansiyel Ekspresyon Analizinde Kullanılan Programlar ve Araçlar

2.2.1.1 R ve RStudio

Biyoinformatik analizlerde yaygın olarak kullanılan R programlama dili, istatistiksel hesaplamalar ve görselleştirme için özel olarak geliştirilmiş açık kaynaklı bir platformdur. Kullanıcılar tarafından geliştirilen paketlerin paylaşımı zamanla kolaylaşmış, 2001 yılında başlatılan Bioconductor projesi ise özellikle omik verilerin analizi için binlerce araca ev sahipliği yapar hâle gelmiştir. Görselleştirme konusunda öne çıkan ggplot2 ve tidyverse paketleri, RStudio adlı entegre geliştirme ortamı (IDE) ile desteklenerek, veri sunumunda hem estetik hem de işlevsel bir yaklaşım sağlamış ve R ekosisteminin kullanıcı dostu bir analiz platformuna dönüşmesine katkı sağlamıştır [144]**.**

2.2.1.2 Limma & voom

Diferansiyel gen ekspresyon analizi, R yazılımıyla limma & voom paketi aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Voom yöntemi, log sayımlarının ortalama-varyans ilişkisini tahmin etmekte, her gözlem için bir hassasiyet (ağırlık) değeri oluşturmakta ve bunları limma paketinin empirik Bayes temelli istatistiksel analizine entegre etmektedir [145].

2.2.1.3 Görselleştirmede Kullanılan Araçlar

Görselleştirmeler, R programında yer alan ggplot2, ggpubr, pheatmap ve EnhancedVolcano paketleri aracılığıyla yapılmıştır. Analiz sonuçları, Temel Bileşen Analizi (Principal component analysis, PCA), MA plot, volcano plot ve ısı haritası gibi grafiklerle desteklenmiştir.

2.2.1.4 Zenginleştirme Analizlerinde Kullanılan Araçlar

Anlamlı bulunan genlerin hücresel bağlamda hangi biyolojik süreçlerde, moleküler fonksiyonlarda görev aldığı, Gen Ontolojisi (GO), Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi (KEGG) ve Reactome analizleri ile incelenmiştir. GO, gen ve gen ürünlerinin işlevlerine dair yapısal ve hesaplanabilir bilgiler sunan, yaşam bilimlerinde yaygın olarak kullanılan bir kaynaktır [146]. KEGG, genetik bilgileri hücresel süreçlerle ilişkilendirerek gen işlevlerinin sistematik analizini sağlayan kapsamlı bir veri tabanıdır. Genom verileri GENES, hücresel yolaklar PATHWAY ve kimyasal bileşikler ile enzim reaksiyonları ise LIGAND veritabanlarında saklanmaktadır [147]. Reactome, sinyal iletimi, DNA replikasyonu, metabolizma ve diğer hücresel süreçlerin moleküler ayrıntılarını tutarlı bir veri modeliyle sunan, kapsamlı ve etkileşimli bir bilgi kaynağıdır. Hem biyolojik süreçlerin arşivi hem de gen ekspresyonu veya mutasyon verileri gibi büyük veri kümelerinde işlevsel ilişkileri ortaya çıkarmaya yönelik bir analiz aracıdır [148].

2.2.2 Örneklerin Dağılımının Görselleştirilmesi

Örneklerin genel dağılımının görselleştirilmesi amacıyla PCA ve örnek kümelemesi (hierarchical clustering) yöntemleri kullanılmıştır. MA-plot limma paketinin plotMA() fonksiyonu ile oluşturulmuştur.

2.2.3 Diferansiyel Ekspresyon Analizi

Yüksek dereceli seröz over kanseri ve sağlıklı over dokusuna ait gen ekspresyon verilerine, sırasıyla Kanser Genom Atlası (The Cancer Genome Atlas Program, TCGA) ve Genotip-Doku İfadesi (Genotype-Tissue Expression, GTEx) projesinden, recount3 aracılığıyla erişilmiştir [149]. Çalışmada HGSOC verileri için TCGA veri setleri, sağlıklı örneklere ait veriler için ise GTEx veri setleri kullanılmıştır [150, 151]. Bu gruplar arası gen ekspresyon farkları incelenmiştir. Diferansiyel gen ekspresyonu analizi, limma paketi içerisinde yer alan linear modeling ve empirik Bayes yöntemleri kullanılarak, voom dönüşümü ile gerçekleştirilmiştir. Anlamlı genler $|\log2FC| > 1$ ve adj. p-value < 0.05 eşiklerine göre belirlenmiştir. Diferansiyel ekpresyon analizi sonuçlarının

görselleştirilmesinde, EnhancedVolcano, ggplot2, ggpubr kullanılmıştır [152, 153].

2.2.4 Isı Haritasının (Heatmap) Oluşturulması

Diferansiyel eksprese olmuş en anlamlı ilk 50 gene ait ısı haritası (heatmap) pheatmap ile oluşturulmuştur [154]. Isı haritaları, gen ekspresyon analizlerinde veri görselleştirme ve kalite kontrol amacıyla yaygın olarak kullanılan araçlardır [155].

2.2.5 Zenginleştirme Analizleri

Diferansiyel olarak ifade edilen genlerin, etkin oldukları biyolojik süreçleri, moleküler fonksiyonları ve sinyal yolu düzeyindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla Gene Ontology (GO) ve Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) veri tabanları kullanılarak zenginleştirme analizleri, clusterProfiler paketi yapılmıştır [156]. GO ve KEGG analizlerine ek olarak Reactome analizi de yapılmıştır [157].

2.2.6 PI3K-AKT-mTOR Sinyal Yoluna Ait Ekspresyon Profili

Bu çalışmada asıl odaklanılan sinyal yolu olan PI3K-AKT-mTOR sinyal yolu özelinde daha ayrıntılı analizler gerçekleştirilmiş olup bu yolla ilişkili genlerin etkileşim ağı Cytoscape yazılımı ile görselleştirilmiştir. Cytoscape, biyomoleküler etkileşim ağlarını gen ekspresyon verileri ve diğer moleküler durumlarla entegre etmek için geliştirilmiş açık kaynaklı bir yazılımdır. Özellikle protein-protein ve genetik etkileşim veritabanlarıyla birlikte kullanıldığında, ağların görselleştirilmesi ve işlevsel analizinde güçlü bir araç olarak karşımıza çıkmaktadır [158].

2.2.7 Ağırlıklı Gen Eşekspresyon Ağı Analizi

Ağırlıklı Gen Eşekspresyon Ağı Analizi (WGCNA), biyolojik olarak önemli ko-ekspresyon modüllerini ve çekirdek genleri hedef özellikler/fenotiplerle ilişkilendirerek tanımlamayı sağlamaktadır. WGCNA R paketi, ağırlıklı korelasyon ağı analizinin gerçekleştirilmesi için kullanılan kapsamlı bir R fonksiyonları koleksiyonudur. Paket, ağ oluşturma, modül algılama, gen seçimi, topolojik özelliklerin hesaplanması, veri simülasyonu ve görselleştirme için fonksiyonlar içermektedir [159]. Bu analizle, yüksek dereceli seröz over kanseri

fenotipi ile yüksek anlamlılık gösteren genlerin ağırlıklı olduğu modül belirlenmiş ve modül içerisindeki PI3K–AKT–mTOR yolağında anlamlı değişim gösteren çekirdek genler tanımlanmıştır.

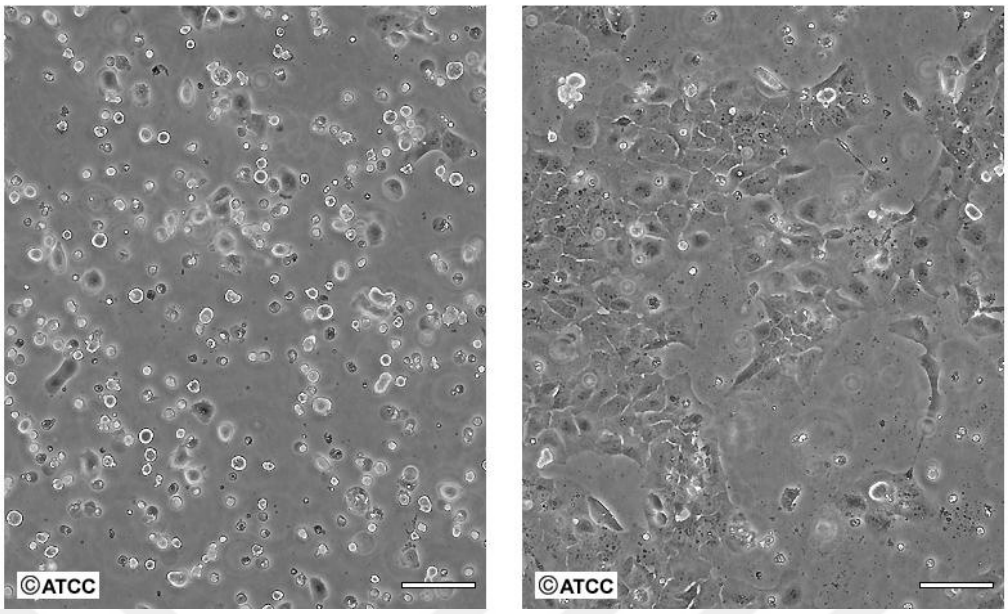
2.2.8 Moleküler Docking Analizleri

Ligand molekülleri Pirfenidon [120] ve metilhidrokinon [133] ile birlikte hedef proteinler olarak seçilen PIK3CA (8EXV) [160], AKT1 (3O96) [161], AKT2 (3D0E) [162], mTOR (4JT5) [163], PDK1 (1OKZ) [164] proteinlerinin üç boyutlu yapıları, PubChem ve RCSB Protein Data Bank (PDB) veritabanlarından temin edilmiştir [165]. Ligand molekülünün "pdbqt" formatına dönüştürülmesi için OpenBabel 3.1.1 yazılımı kullanılmıştır [166]. Moleküler docking analizleri, AutoDock 4.2.6 (Scripps Research Institute, ABD) programı aracılığıyla yürütülmüştür [167]. Docking işlemlerinde kullanılan grid parametreleri, proteinlerin aktif bölgelerini tamamen kapsayacak şekilde ayarlanmıştır. Aktif bölgelerin tespiti için CASTp (Computed Atlas of Surface Topography of Proteins) ve PyMol (DeLano Scientific LLC, ABD) yazılımlarından yararlanılmıştır [168]. Docking sonucunda elde edilen veriler "pdbqt" formatında kaydedilmiş ve bu sonuçların görselleştirilmesi Discovery Studio Visualizer 2025 Client (Dassault Systèmes, ABD) programı ile gerçekleştirilmiştir.

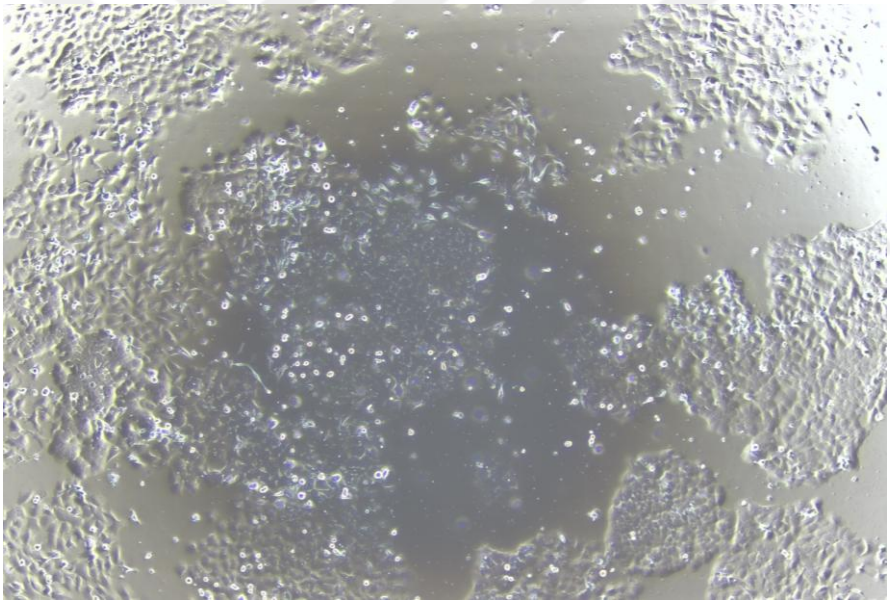
2.3 Hücre Kültürü Çalışmaları

2.3.1 Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları

Hücre kültürü çalışmalarında, deney grupları için Caov-3 yüksek dereceli seröz yumurtalık kanseri hücre hattı kullanılmıştır (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2).

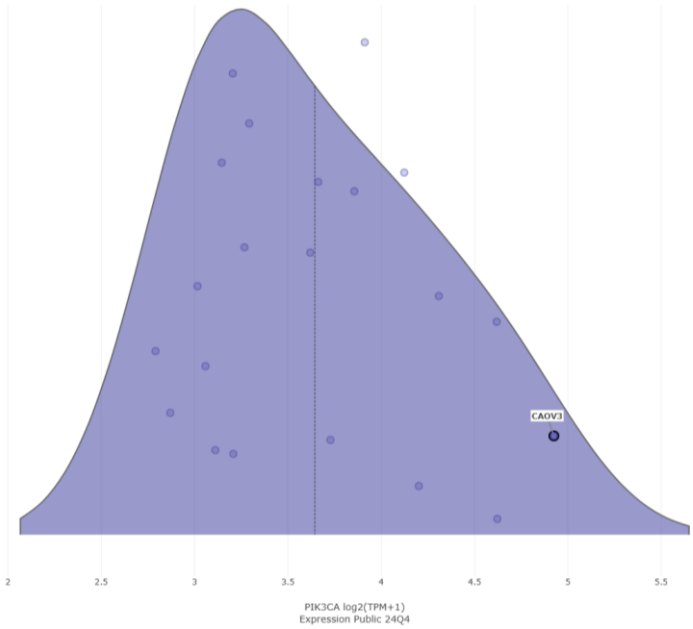


Şekil 2.10 Caov-3 hücre hattı mikroskop görüntüsü (https://www.atcc.org)

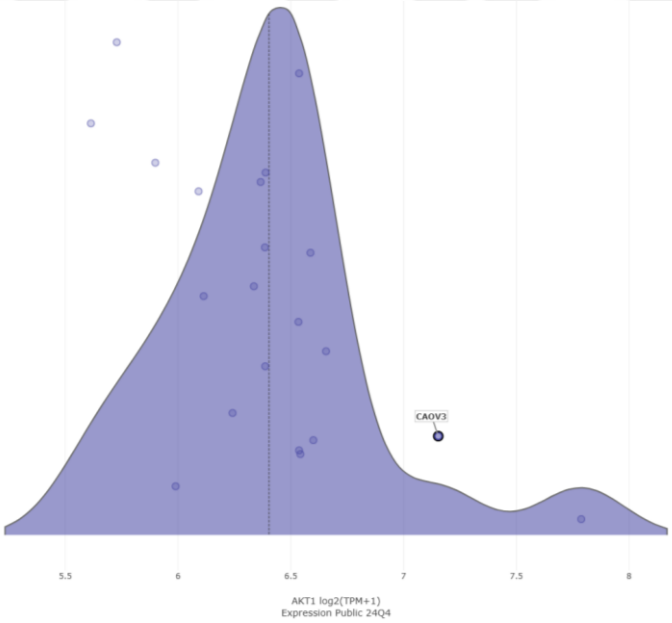


Şekil 2.11 Caov-3 hücre hattı mikroskop görüntüsü (4x objektif)

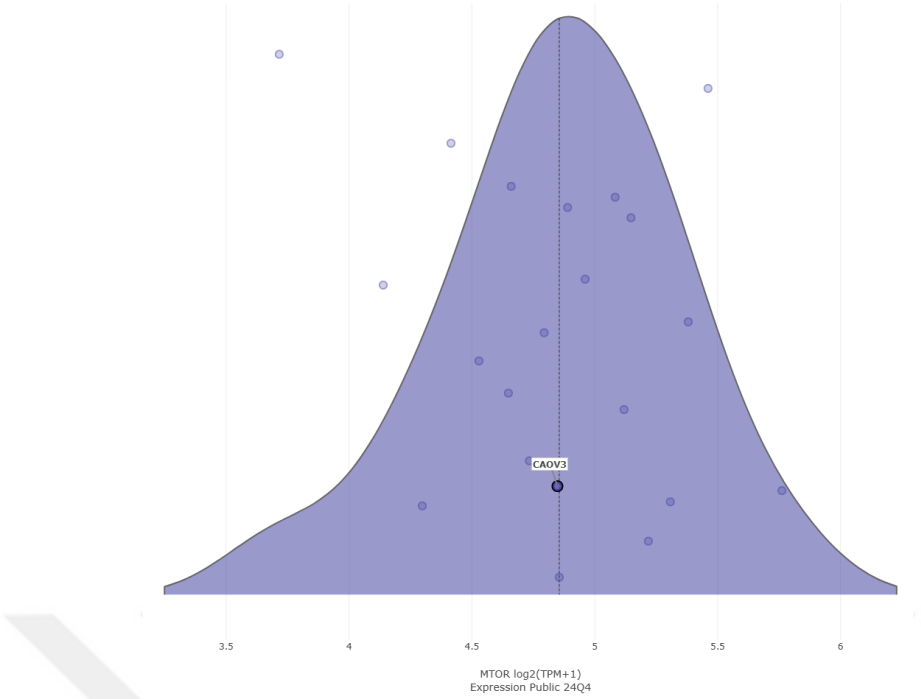
Caov-3 hücre hattı, DepMap Portal (The Cancer Dependency Map Project, Broad Institute, ABD) üzerinden elde edilen gen ekspresyon verileri doğrultusunda seçilmiştir (https://depmap.org/portal). Bu hücre hattı, PI3K alfa, AKT1 ve mTOR proteinlerini eksprese eden genlerin (PIK3CA, AKT1 ve MTOR) ifadesi açısından, diğer HGSOC hatlarına kıyasla ortalama veya ortalamanın üzerinde ekspresyon düzeyleri sergilemektedir (Şekil 2.3, Şekil 2.4 ve Şekil 2.5) [169]. Bu nedenle, PI3K-AKT-mTOR sinyal yoluna yönelik deneysel çalışmalarda uygun bir hücre hattı olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 2.12 Caov-3 hücre hattının, diğer yüksek dereceli seröz over kanseri hücre hatlarına kıyasla PIK3CA ekspresyon seviyesi



Şekil 2.13 Caov-3 hücre hattının, diğer yüksek dereceli seröz over kanseri hücre hatlarına kıyasla AKT1 ekspresyon seviyesi



Şekil 2.14 Caov-3 hücre hattının, diğer yüksek dereceli seröz over kanseri hücre hatlarına kıyasla mTOR ekspresyon seviyesi

Hücreler, Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC) protokollerine uygun olacak şekilde, 37°C sıcaklıkta, %95 hava ve %5 karbondioksit (CO_2) atmosfer koşullarında inkübe edilmiştir (https://www.atcc.org).

2.3.2 Tam Besiyeri Hazırlanması

Hücrelerin kültüre edileceği tam besiyerinin hazırlanmasında, Caov-3 hücre hattı için, Roswell Park Memorial Institute (RPMI) kültür ortamı kullanılmıştır. 50 mL tüplerde, %10 fetal sığır serum (FBS) ve %1 oranda Penisilin-Streptomisin (10,000 U mL) içerecek besiyeri, RPMI kültür ortamı ile 50 mL'ye tamamlanmıştır.

Besiyeri bileşenlerinin optimal dağılımını sağlamak amacıyla, kültür ortamına konulacak serum ve antibiyotik hem çözdürüldükten sonra hem de tüpte tam besiyeri hazırlandıktan sonra pipetaj yapılmıştır. Tam besiyerine, hücrelere verilmeden önce de pipetaj yapılarak bileşenlerin çökmemesi sağlanmıştır.

Hazırlanan tam besiyerleri sonraki kullanımlar için +4°C'de, tüplerin ağız kısımları parafilmlenmiş şekilde muhafaza edilmiştir. FBS ve antibiyotik alikotlanarak ve parafilmlenerek -20°C'de, RPMI kültür ortamı ise +4°C'de parafilmlenerek saklanmıştır.

2.3.2.1 Dondurulmuş Hücrelerin Çözdürülerek Hücre Kültür Kabına Ekilmesi

Tam besiyeri, 37°C'ye sıcaklığa ulaşması amacıyla su banyosunda bekletilmiştir. Ardından Caov-3 hücrelerini içeren kryotüp azot tankından çıkarılmıştır. Kryotüp, 37°C sıcaklıktaki su banyosunda, kapak kısmı suya değdirilmeden, hızlı bir şekilde (yaklaşık 2 dakika içinde) çözdürülmüştür. Hücreler tamamen çözüldükten sonra kryotüp su banyosundan çıkarılmış ve %70 etanol ile spreylenerek dekontaminasyon sağlanmıştır. Devam eden aşamalar aseptik koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Kryotüp içeriği, 5 mL tam besiyeri içeren 15 mL santrifüj tüpüne aktarılmış ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre peleti, tam besiyeri ile yeniden süspanse edilmiştir. Süspansiyon, 25 cm^2 veya 75 cm^2'lik kültür kaplarına aktarılmıştır. Aktarım işlemi sonrası hücreleri morfoloji ve homojen dağılımları açısından faz-kontrast mikroskobu ile incelenmiştir. Hücreler, 37°C sıcaklıkta, %5 CO_2 içeren hava atmosferinde, inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücrelerin tutunma durumu ve canlılığı, 24 saat sonra kontrol edilmiştir. Hücreler günlük olarak takip edilmiş olup bir sonraki pasaja kadar 1-2 günde bir besiyeri değiştirilmiştir.

2.3.3 Hücrelerin Büyütülmesi ve Pasajlanması

Her bir hücre kültürü aynı ortam ve koşullar altında büyütülmüştür. Besiyeri ortamı 3 günde bir fosfat buffer saline (PBS) ile yıkama sonrası taze besiyeri ile değiştirilmiştir. Hücre kültür kabındaki hücreler %80 yoğunluğa ulaştıklarında, besiyeri atılarak PBS ile yıkama yapılmıştır. Ardından hücre kültür kabına tripsin-EDTA ilave edilmiş ve 3-4 dakika boyunca inkübatörde bekletilmiştir. Hücreleri kaldırma işleminin başarılı olup olmadığı mikroskopta incelenmiş ve gerekli görülürse bekleme süresi uzatılmıştır. Hücre kültür kabı kabine alındıktan sonra tripsin-EDTA inaktivasyonu için konulan tripsin-EDTA miktarının en az iki katı besiyeri hücre kültür kabına aktarılmıştır. Serolojik pipet ile hücre kültür kabı içeriği tüpe aktarılacak santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası oluşan peletin aksi yönünde sıvı kısım boşaltılmış, hücrelerin üzerine besiyeri eklenmiş ve pipetaj yapılarak hücre kültür kaplarına aktarılmıştır. Pasaj işlemleri bu şekilde gerçekleştirilerek alt kültürler oluşturulmuştur. Hücre hatları, 100 U/ml penisilium/streptomisin ve %10 fetal FBS içeren RPMI-1640 medyum içeren tam besiyeri ortamında, %5 CO_2, 37^oC ortamda inkübe edilmiştir. Hücre canlılık ve

çoğalma periyotları ile kontaminasyon riskleri günlük olarak inverted mikroskop ile takip edilmiştir.

2.3.4 Hücrelerin Dondurulması

Hücrelerin dondurulması için işlem öncesinde dondurma solüsyonu, %10 DMSO ve %90 FBS içerecek şekilde hazırlanmıştır. Dondurma solüsyonu kullanılana kadar +4°C'de bekletilmiştir. Hücreler tripsin ile muamele edilip inkübatörde bekletilmiştir. Hücrelere, tam büyüme medyumu ilave edilmiştir. Toplam hücre sayısı ve canlılık oranı, tripan mavisi ile boyama yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Hücre süspansiyonu, 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant, hücre pelletini bozmadan çekilerek atılmıştır. Hücre pelletleri, soğuk dondurma medyumunda süspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonu, steril kryotüplere aktarılırken homojen bir dağılım sağlanması için nazikçe pipetaj yapılmıştır. Hücreler, kontrollü bir hızla, dakikada yaklaşık 1°C düşecek şekilde yavaşça dondurulmuştur. Bu işlem, kryotüplerin izopropanol içeren bir hazneye yerleştirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Kryotüpler gece boyunca -80°C'de saklanmıştır. Daha sonra dondurulmuş hücreler sıvı azota aktarılmıştır.

2.3.5 Sitotoksisite Analizi

Deneysel çalışmalarda kullanılan etken maddelerin sitotoksik dozlarının belirlenmesi amacıyla hücrelere çeşitli doz aralıkları uygulanmıştır. Hücreler, 96 kuyucuklu platelerin her bir kuyucuğunda 1×10^4 hücre olacak şekilde ekildikten sonra %10 FBS içeren RPMI-1640 besiyerinde 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından etken maddelere yönelik doz-yanıt eğrileri elde etmek üzere:

Pirfenidon: 100–6000 μM aralığındaki (100, 300, 500, 800, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000 μM),

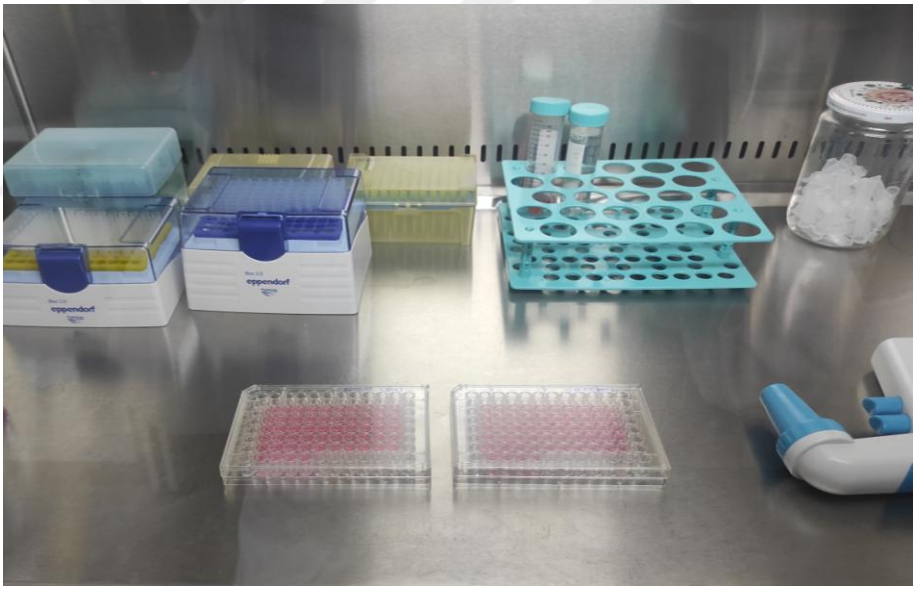
Metilhidrokinon: 10–200 μM aralığındaki (10, 20, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 μM) konsantrasyonlarda hücrelere uygulanmıştır. Kontrol grubundaki hücrelere sadece besiyeri uygulanmış ve her doz 4 tekrarlı olacak şekilde uygulanmıştır. Deney düzeneği, ayrı günlerde gerçekleştirilen üç bağımsız çalışma ile tekrarlanmıştır.

2.3.5.1 MTT ile Pirfenidon ve Metilhidrokinonun Sitotoksik Dozlarının Belirlenmesi

MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi, aktif metabolizmaya sahip canlı hücrelerin MTT'yi formazana indirgemesi sonucu oluşan formazan miktarının ölçümüne dayanan, yaygın olarak kullanılan bir hücre canlılığı testidir [170].mPirfenidon, metilhidrokinon ve ikili kombinasyonun, Caov-3 over kanseri hücreleri üzerinde oluşturduğu sitotoksik etkiler, MTT ile belirlenmiştir.

MTT Genel Protokolü:

- Her bir kuyucuğa 10.000 hücre içerecek şekilde 96-well plate için ekim yapılmış; toplam 100 µL kültür ortamı eklenmiştir. Hücrelere, belirlenen doz aralıklarında etken madde uygulanmış veya kontrol olarak besiyeri kullanılmıştır (Şekil 2.6).



Şekil 2.15 MTT için hücre ekimi

- Hücreler, 24 ve 48 saat süreyle standart kültür koşullarında inkübe edilmiştir.
- MTT solüsyonunun hazırlanması amacıyla 6 mg toz MTT tartılmış, 10 mL fenol kırmızısı içermeyen DMEM içerisinde çözdürülmüştür.
- Kuyucuklardan besiyeri çekilmiş ve her kuyucuğa 50 µL MTT solüsyonu ilave edilmiştir.

- Reaktifle muamele edilen plakalar 4 saat süreyle inkübe edilmiş; MTT içeren kuyucuklara 100 µL DMSO eklenmiş ve 5 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Ardından içeriğin homojen karışımı için plaka 5 dakika boyunca mikroplate okuyucu kullanılarak çalkalanmıştır.
- Kontrol ve ilaç uygulanmış kuyucuklarının absorbansı, mikroplate okuyucuda 540–570 nm dalga boyunda ölçülmüştür.
- Kültür ortamına ait arka plan absorbansı (blank) ortalama değerden çıkarılarak düzeltilmiş absorbans değerleri elde edilmiştir.
- Düzeltilmiş absorbans değerleri kullanılarak (2.1)'deki formül ile sitotoksisite yüzdesi hesaplanmıştır:

$$\%\mathbf{Sitotoksisite} = \mathbf{100} \times \frac{(\mathbf{A_{Kontrol}} - \mathbf{A_{Örnek}})}{\mathbf{A_{Kontrol}}} \qquad (2.1)$$

$A_{Kontrol}$: Kontrol grubunun düzeltilmiş ortalama absorbansı

$A_{Örnek}$: İlaç uygulanmış grubun düzeltilmiş ortalama absorbansı

2.3.5.2 MTT ile Pirfenidon ve Metilhidrokinon İkili Kombinasyonunun Sinerjistik Dozunun Doğrulanması

Etken maddelerin tek başına uygulanması ile elde edilen IC_{50} değerleri, Pirfenidon ve metilhidrokinon ikili kombinasyonuna ait sinerjik dozun belirlenmesi için de kullanılmıştır.

2.3.6 Pirfenidon ve Metilhidrokinon İkili Kombinasyonunun Sinerjik Dozunun Belirlenmesi

Metilhirokinon ve Pirfenidon ikili kombinasyonunun sinerjik etki gösteren dozları, Chou ve Talalay'ın kütle etki yasasının medyan etki prensibinden türetilen kombinasyon indeksi (CI) metodolojisi ve çoklu ilaç kombinasyonu yanıt verilerinin etkileşimli analizi ve görselleştirilmesini sağlayan bir web uygulaması olan SynergyFinder 3.0 kullanılarak değerlendirilmiştir [171]. Uygulamaya doz ve yanıt verilerini içeren bir matris yüklenmiştir. Sinerji skorlarının hesaplanmasında Bliss modeli kullanılmıştır. Bliss modeli, ilaçların birleşik etkilerini değerlendirmek için en yaygın olarak kullanılan modellerden biridir. Bu model, ilaçların birbirinden bağımsız biçimde etki ettiğini, fakat etkilerinin birleşerek

ortak bir biyolojik yanıt oluşturduğunu varsayan olasılıksal bir temele dayanmaktadır [172].

Kombinasyon indeksi metodolojisine göre; kombinasyon indeksi değeri 1'den küçük ise kombinasyonda sinerjik etkiyi, CI değeri 1'e eşit ise aditif etkiyi, CI değeri 1'den büyük ise antagonistik etkiyi işaret etmektedir [173]. CI değerleri, (2.2)'deki formül ile hesaplanmıştır.

$$CI = \frac{Kombinasyonda\ kullanılan\ doz\ [Metilhidrokinon\ (\mu M)]}{IC50\ dozu\ [Metilhidrokinon\ (\mu M)]} + \frac{Kombinasyonda\ kullanılan\ doz\ [Pirfenidon\ (\mu M)]}{IC50\ dozu\ [Pirfenidon\ (\mu M)]} \quad (2.2)$$

Kombine dozun belirlenmesi amacıyla, MTT çalışmaları ile elde edilen, Pirfenidon, metilhidrokinon ve ikili kombinasyona ait toksik doz verileri kullanılmıştır. Pirfenidon ve metilhidrokinon ikili kombinasyon dozu öncelikle daha geniş bir aralık olacak şekilde IC50 ve üst-alt dozlar şeklinde taranmıştır (Pirfenidon: 60-2000 µM, Metilhidrokinon: 10-320 µM). Pirfenidon için seçilen 6 doz, metilhidrokinon için seçilen 6 doz ile kombine edilerek toplamda 36 doz uygulanmıştır. Bir sonraki doz taramasında daha düşük doz aralıkları seçilerek CI değerinin 1'den küçük elde edileceği bir sinerjik dozun belirlenmesine odaklanılmıştır. Bu amaçla Pirfenidon için sırasıyla, 250, 300, 350, 400, 500 ve 550 µM dozları seçilmiş; metilhidrokinon için ise 30, 35, 40, 50, 55 ve 60 µM dozları kullanılmıştır. Toplamda 36 doz kombinasyon olarak uygulanmıştır. İkili kombinasyon dozlarının hazırlanması amacıyla tekli dozlar iki kat konsantrasyonda hazırlanıp diğer etken maddenin iki kat konsantrasyonda hazırlanmış dozu ile eşit hacimde, aynı tüp içerisinde birleştirilmiştir.

Kombinasyon indeksi belirlendikten sonra, sinerjik etki görülen dozlarda Pirfenidon ve metilhidrokinon kombinasyonu Caov-3 hücre hattına uygulanmış ve diğer tüm deneysel çalışmalarda da bu doz kullanılmıştır.

2.3.7 Koloni Oluşturma Deneyi

Koloni oluşturma deneyi, tek bir hücrenin bir koloni halinde büyüme yeteneğine dayanan bir in vitro hücre sağkalım testidir. Testin amacı, popülasyondaki her

hücrenin “sınırsız” bölünme geçirme kabiliyetini değerlendirmektir. Koloni oluşturma deneyi, sitotoksik ajanların etkinliğini belirlemek için uygulanabilmektedir [174]. Uygulama aşamasında hücreler, 6 kuyucuklu mikroplatelerin her bir kuyucuğunda 500.000 hücre ve 3 mL besiyeri olacak şekilde ekilmiştir. Bu hücrelere, Pirfenidon, metilhidrokinon ve ikili kombinasyon dozu IC50 değerlerinde ve kombinasyon dozlarında, tekli ve kombine şeklinde uygulanmıştır. Doz uygulamasından 48 saat sonra hücreler toplanmış ve sayılmıştır. Hücreler, her bir kuyucukta 500 hücre olacak şekilde ekilmişltir. Her bir grup için 3 tekrar olacak şekilde planlanmıştır. Hücrelerin 7-8 bölünme için büyümesine sağlamak amacıyla hücreler, 37°C, %5 CO_2 ortam koşullarında, yaklaşık 15 gün boyunca inkübe edilemiştir. Mevcut besiyeri, her üç günde bir taze besiyeri ile değiştirilmiştir. Hedeflenen sürenin sonunda hücreler, oda sıcaklığındaki PBS ile yıkanmış ve soğuk metanol kullanılarak 15 dakika boyunca fikse edilmiştir. Bu adımı takiben hücreler, %0.2 kristal viyole ile 15 dakika muamele edilmiştir. Boyama işleminin ardından, boya kalıntılarının temizlenmesi amacıyla distile su ile 3-4 kez yıkama işlemi yapılmıştır. Boyama sonrası oluşan koloniler Image J programı ile sayılmış olup koloni sayılarına ait grafikler Graphpad Prism 10 ile oluşturulmuştur [175].

2.3.8 Annexin V-FITC Erken Apoptoz Testi

Propidium iyodür (PI) ve floresan izotiyosiyanat (FITC)-konjuge Annexin V (Annexin V-FITC) kullanımı apoptozun progresyonunu gözlemlemek için standart bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Erken aşamadaki apoptotik hücreler Annexin V için pozitif ve PI için negatif (Annexin V-FITC+/PI-) iken geç aşamadaki apoptotik hücreler hem Annexin V, hem de PI için pozitiftir (Annexin V-FITC+/PI+) [176]. Erken apoptoz sırasında, fosfatidilserin isimli bir fosfolipid, plazma membranının sitozolik tarafından hücresel yüzeye transloke olmaktadır. Annexin V proteini, fosfatidilserine karşı yüksek afinite, özgüllük ve duyarlılık göstermekte olduğundan erken apoptozun bir belirteci olarak değerlendirilmektedir. Annexin V, propidyum iyodür gibi hücre zarının bütünlüğünü belirleyen reaktiflerle birlikte kullanılmaktadır [177].

Pirfenidon ve metilhidrokinonun IC50 dozları ile kombinasyonda kullanılan dozlarıyla ikili kombinasyon uygulamasının apoptoz üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla Annexin V-FITC Erken Apoptoz Tespit Kiti (Abcam, ab14085) ve kite

ait floresan mikroskopi protokolü kullanılmıştır. Kit, Annexin V-FITC konjugatı, bağlayıcı tampon çözelti ve Propidium iyodür çözeltisini içermektedir.

Protokol:

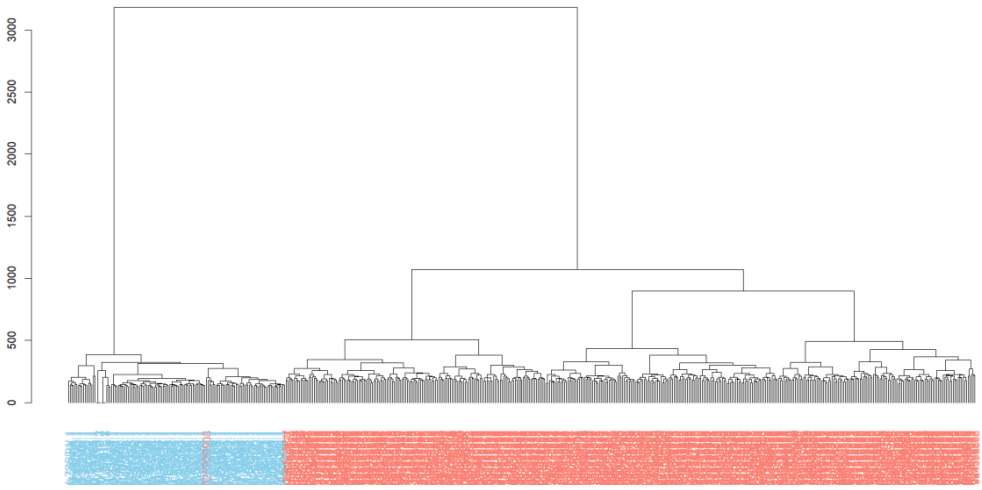
- Hücreler her bir kuyucukta 5 x 10^5 hücre olacak şekilde 6'lı well plate kuyucuklarına yerleştirilen lamel üzerine ekilmiştir.
- Ekimden 24 saat sonra hücrelere, pirfenidon ve metilhidrokinonun IC50 dozlarıyla kombinasyonda kullanılan tekli dozlar ile ve belirlenen ikili kombinasyon dozu uygulanmıştır.
- İlaç uygulamasında 48 saat sonra 500 µl Bağlanma Tamponu, 5 µl Annexin V-FITC II ve 5 µl propidyum iyodür II eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika karanlıkta bekletilmiştir.
- Boyaların eklenmesi ve inkübasyonundan sonra, lamel bir lam üzerine ters çevirilmiştir.
- Hücreler, FITC ve Texas Red için çift filtre kullanılarak floresan mikroskobu ile görüntülenmiştir.

3
BULGULAR

3.1 Biyoinformatik Çalışmalara Ait Bulgular

3.1.1 Örneklerin Dağılımının Görselleştirilmesi

Kanser Genom Atlası üzerinden erişilen veri setlerinden, over kanseri için "TCGA-OV" veri seti seçilmiştir. Bu veri seti, 422 birincil (primary) tümör ve 7 nüks etmiş tümör verisi içermektedir. Elde edilen veri setinden birincil tümör verileri ile çalışmaya devam edilmiş, peritoneal/retroperitoneal 5 örnek çıkarılmıştır. 417 over kanseri örneği, diferansiyel gen ekspresyon analizinde kullanılmıştır. Sağlıklı örneklere ait veri setleri, GTEx'in over verisi üzerinden seçilmiş olup 130 örnek içermektedir. Örneklerin "HGSOC" ve "Normal" olmak üzere dağılımına Şekil 3.1'de yer verilmiştir. Kırmızı kısım HGSOC örneklerini, mavi kısım normal over örneklerini temsil etmektedir.

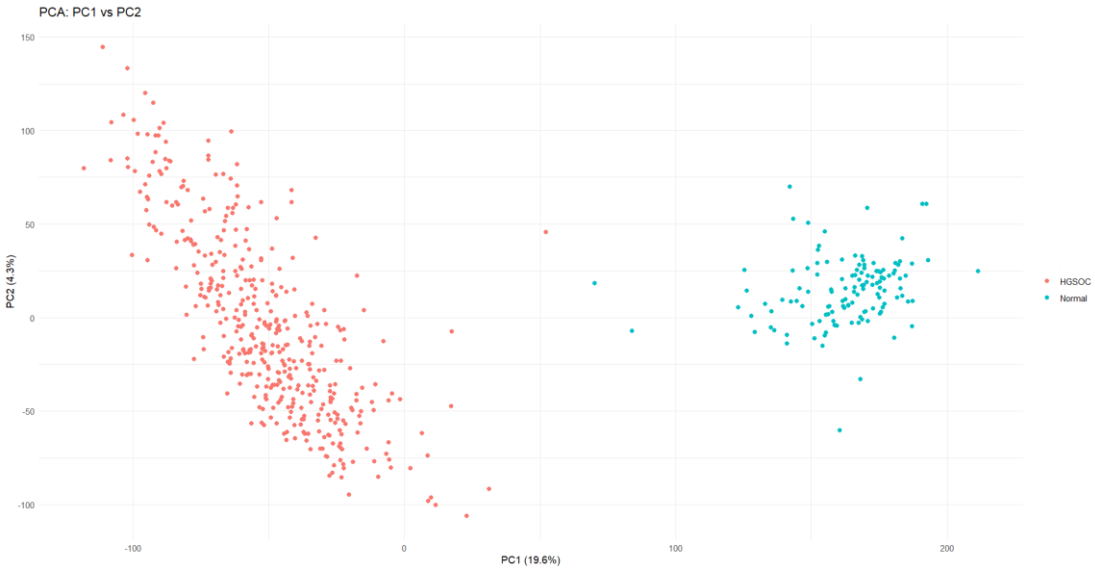


Şekil 3.16 Örneklerin gruplara göre dağılımı

3.1.2 Diferansiyel Ekspresyon Analizi

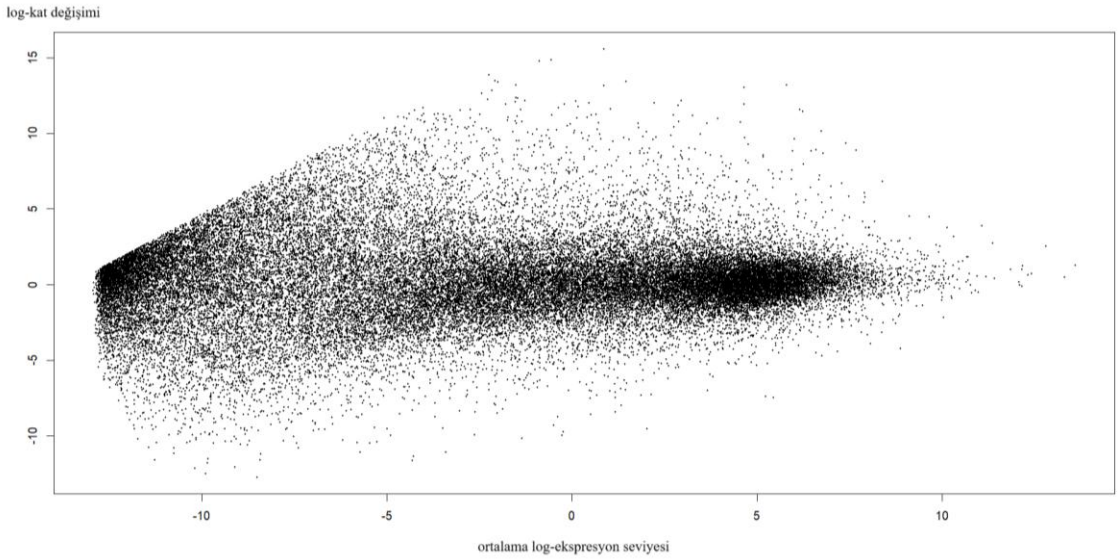
Diferansiyel ekspresyon analizi sonucunda, up-regüle gen sayısı 14674, down-regüle gen sayısı 12082 ve ekspresyonunda değişiklik bulunmayan gen sayısı 18295 olarak bulunmuştur.

Temel Bileşen Analizi, iki grubun gen ekspresyon seviyelerindeki farklılığı görselleştirmiştir. HGSOC örnekleri kırmızı noktalar şeklinde, normal over örnekleri mavi noktalar şeklinde gösterilmiştir (Şekil 3.2).



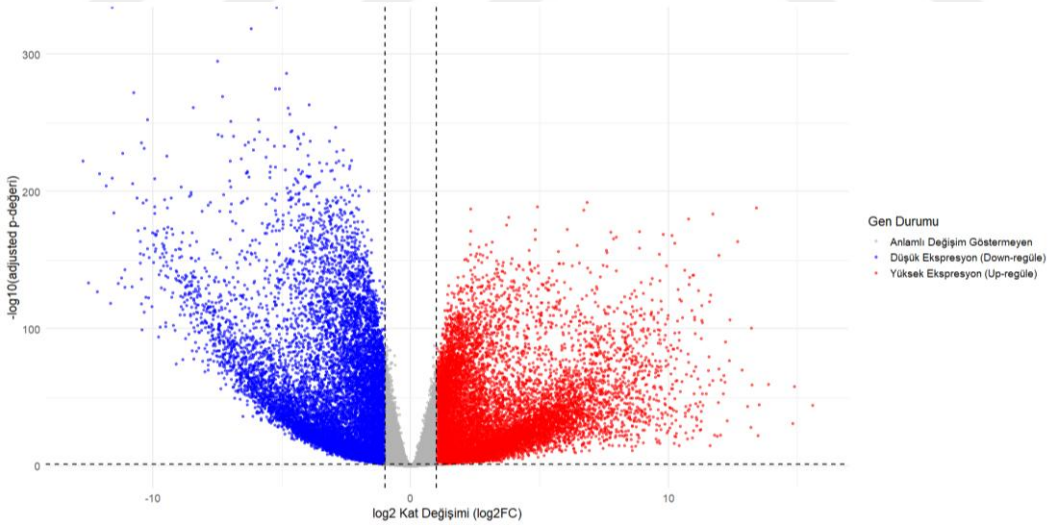
Şekil 3.17 Örneklerin temel bileşen analizine göre dağılımları

İki grup arasındaki gen ekspresyon farkları, Minus-average (MA) plot ile Şekil 3.3'te gösterilmiştir. MA plot, genellikle iki koşul veya iki örnek grubu arasındaki gen ekspresyon düzeylerini karşılaştırmak amacıyla kullanılan görselleştirme araçlarıdır. Bu grafiklerde dikey eksen, genlerin logaritmik ifade düzeyleri arasındaki farkı (log2(fold-change), yani "M" değeri-Minus), yatay eksen ise genlerin logaritmik ortalama ifade düzeyini ("A" değeri -Average) temsil eder. Y eksenine yakın genler her iki grupta benzer düzeyde ifade edilirken, pozitif logFC değerine sahip genler HGSOC'da daha yüksek ifadeye sahip olup negatif logFC değerine sahip genler ise normal dokuda daha yüksek ifadeye sahiptir.



Şekil 3.18 Minus-average grafiği

X ekseninde log2FC değerlerini, Y ekseninde genlerin istatistiksel anlamlılık düzeyini ifade eden değerleri gösteren Volkan (volcano) Plot ile analiz sonucunda elde edilen genler görselleştirilmiştir (Şekil 3.4). Kırmızı noktalar HGSOC için down regüle olan genleri, maviler ise up regüle olan genleri temsil etmektedir. Yeşil noktalar, anlamlı değişim göstermeyen genleri göstermektedir.

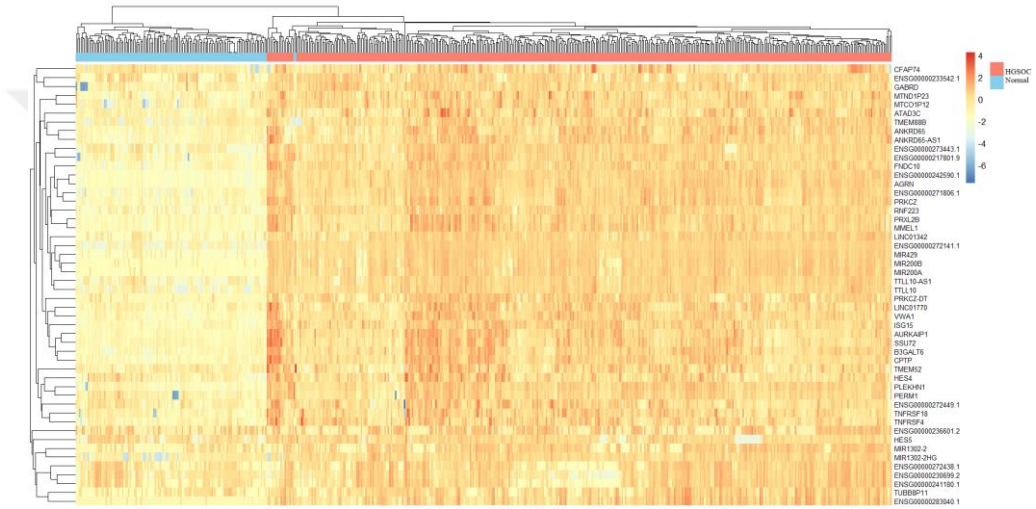


Şekil 3.19 Volkan plot

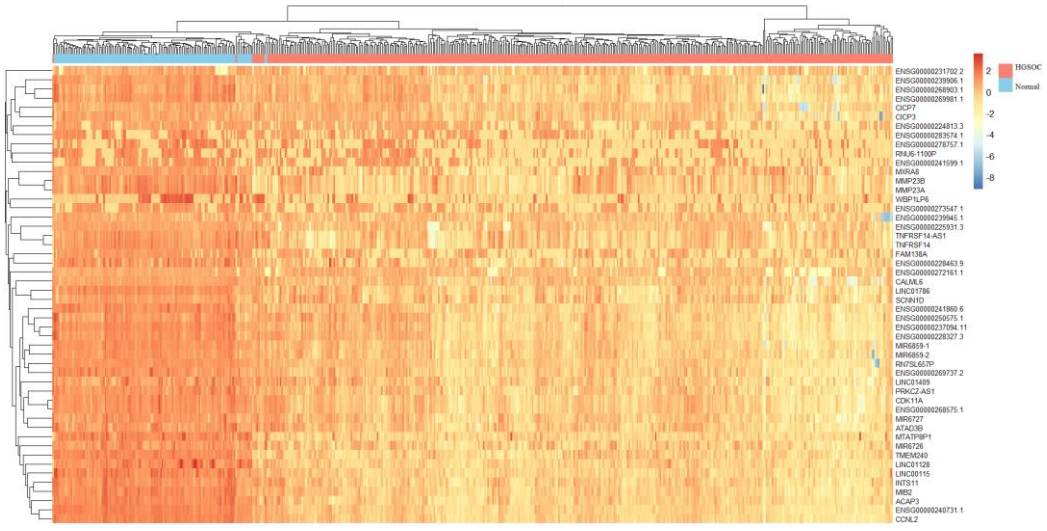
3.1.3 Isı Haritaları (Heatmap)

Diferansiyel ekspresyon analizinde en çok farklılık gösteren ilk 50 gen, en çok up regüle ve down regüle olanlar şeklinde iki ayrı ısı haritasında (heatmap) gösterilmiştir (Şekil 3.5 ve Şekil 3.6). Ensembl id formatındaki gen isimleri, gen

sembollerine dönüştürülmüş, eşleşme bulunamayan genler ensemble id formatında bırakılmıştır. Örneklerin kümelenişine göre pembe kısım HGSOC örneklerini, mavi kısım normal over örneklerini temsil etmektedir. HGSOC örnekleri için, ekspresyonu artmış genleri gösteren ısı haritasında koyulaşan kırmızı renkler artan ekspresyonu temsil ederken koyulaşan mavi renkler düşen ekspresyonu temsil etmektedir. Ekspresyonu azalmış genleri gösteren ısı haritasında ise normal over örneklerinde daha yüksek ekspresyon sarı-turuncu renklerle, HGSOC'da daha düşük ekspresyon daha açık turuncu veya maviye dönük renklerle gösterilmiştir.



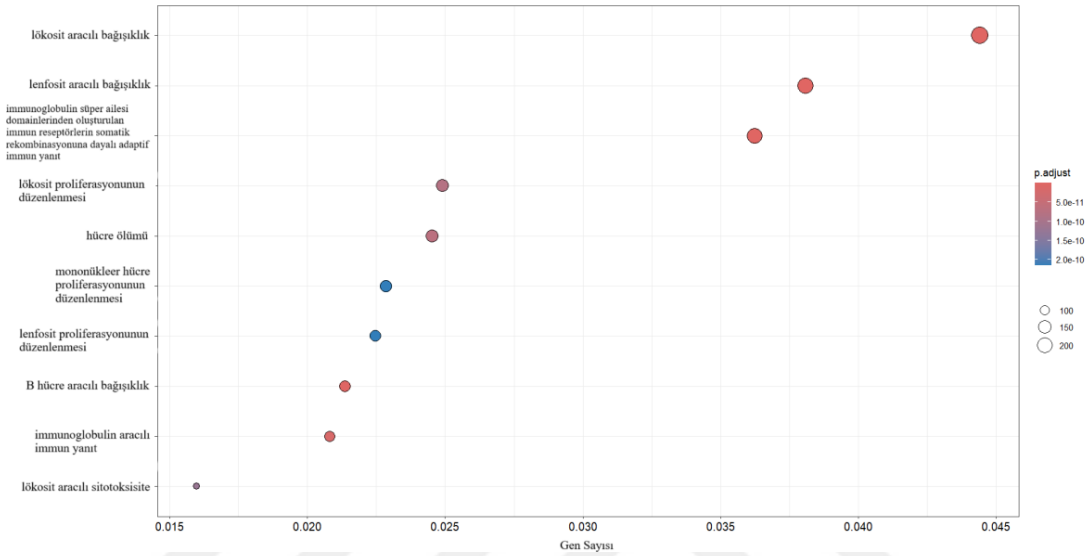
Şekil 3.20 Diferansiyel eksprese olmuş genlerden ilk 50 up regüle gene ait ısı haritası



Şekil 3.21 Diferansiyel eksprese olmuş genlerden ilk 50 down regüle gene ait ısı haritası

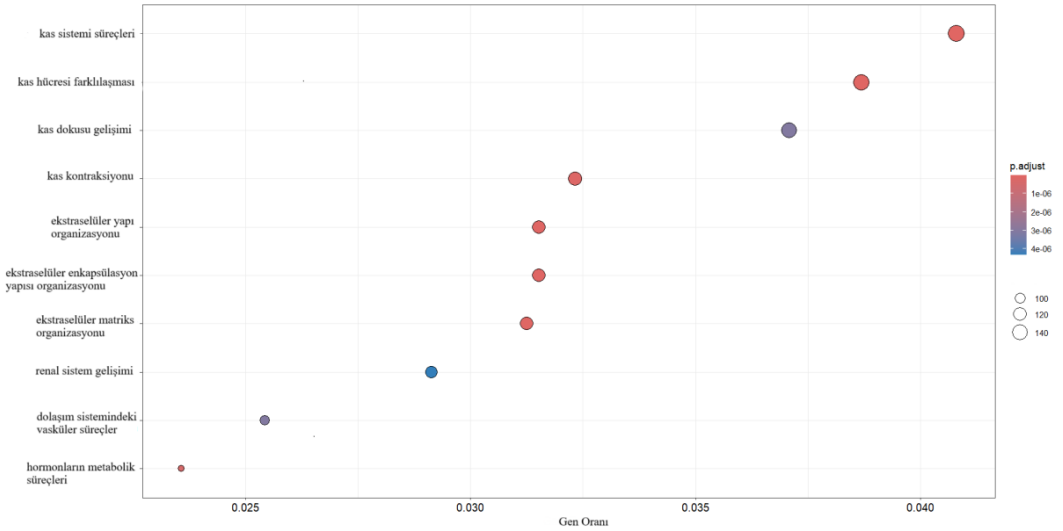
Gen Ontolojisi zenginleştirme analizlerininin biyolojik prosesler modülünde (GO BP), HGSOC örneklerinde bağışıklıkla ilişkili genlerin regülasyınunun artmış olduğu görülmüştür (Şekil 3.7).

3.1.4 Zenginleştirme Analizleri



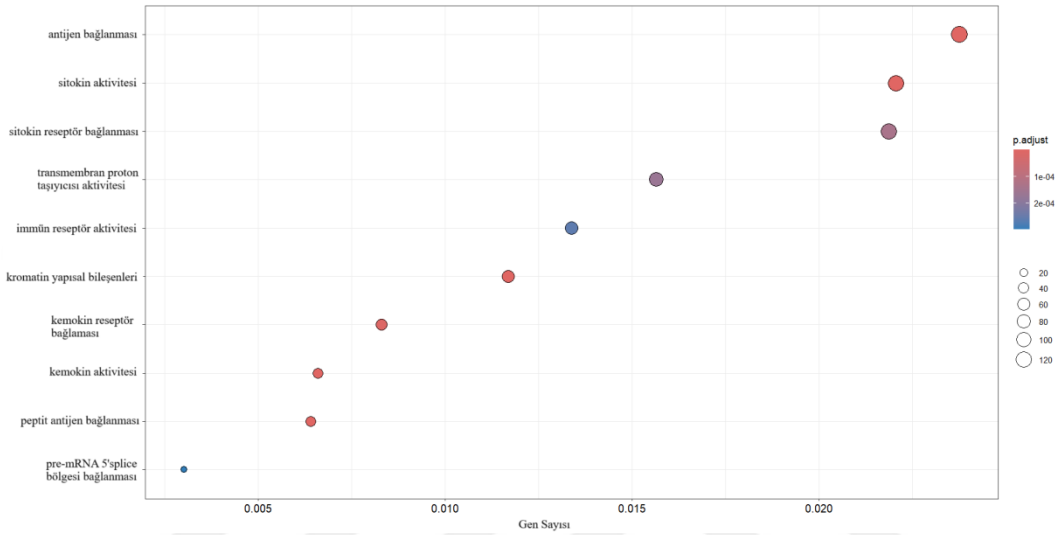
Şekil 3.22 Regülasyonu artmış genlerin Gen Ontolojisi Biyolojik Proses ile zenginleştirilmesi

Down regüle genlere ait GO biyolojik prosesler modülünde ise ekstraselüler yapı organizasyonu süreçlerinde anlamlı değişimler görülmüştür (Şekil 3.8).



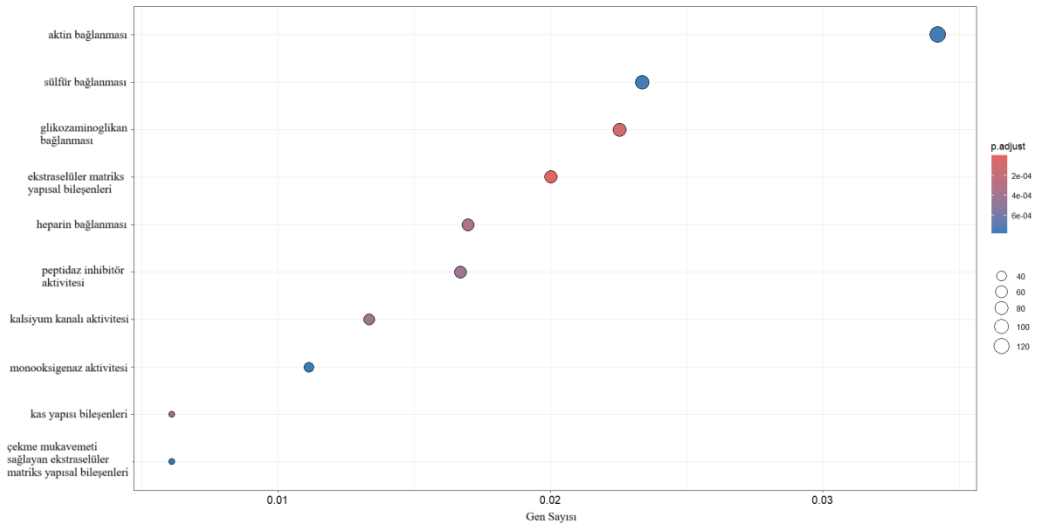
Şekil 3.23 Regülasyonu azalmış genlerin Gen Ontolojisi Biyolojik Proses ile zenginleştirilmesi

Gen Ontolojisi moleküler fonksiyon (GO MF) analize göre, HGSOC'da up regüle olan genler, antijen bağlanması, sitokin aktivitesi, immün reseptör aktivitesi ve kemokin reseptör bağlanması gibi biyolojik fonksiyonlarla ilişkilendirilmiş olup analiz sonuçları, immün yanıtla ilişkili işlevlerde anlamlı bir artış olduğunu vurgulamaktadır (Şekil 3.9). Bu bulgular, biyolojik prosesler modülüne yönelik sonuçlarla da paralellik göstermektedir.



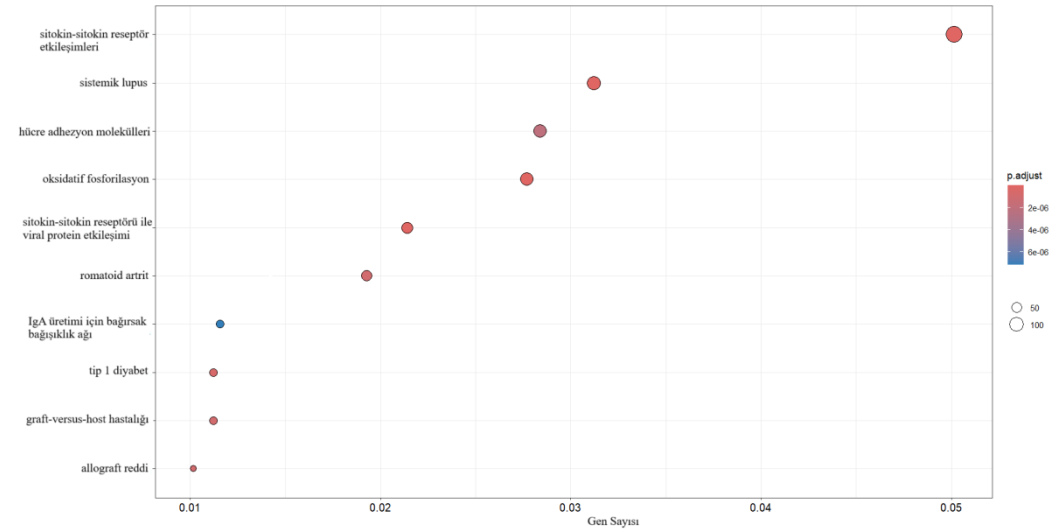
Şekil 3.24 Regülasyonu artmış genlerin Gen Ontolojisi Moleküler Fonksiyon ile zenginleştirilmesi

Down regüle genlerle yapılan GO MF analizi de GO BP analizi ile uyumluluk göstermekte, bu genlerin özellikle aktin bağlanması, ekstraselüler matriksin yapısal bileşenleri, kalsiyum kanalı aktivitesi, heparin bağlanması ve peptidaz inhibitör aktivitesi ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bu genlerin, hücre iskeleti, ekstraselüler matriks ve iyon kanalı işlevlerinde zenginleştiği belirlenmiştir (Şekil 3.10).



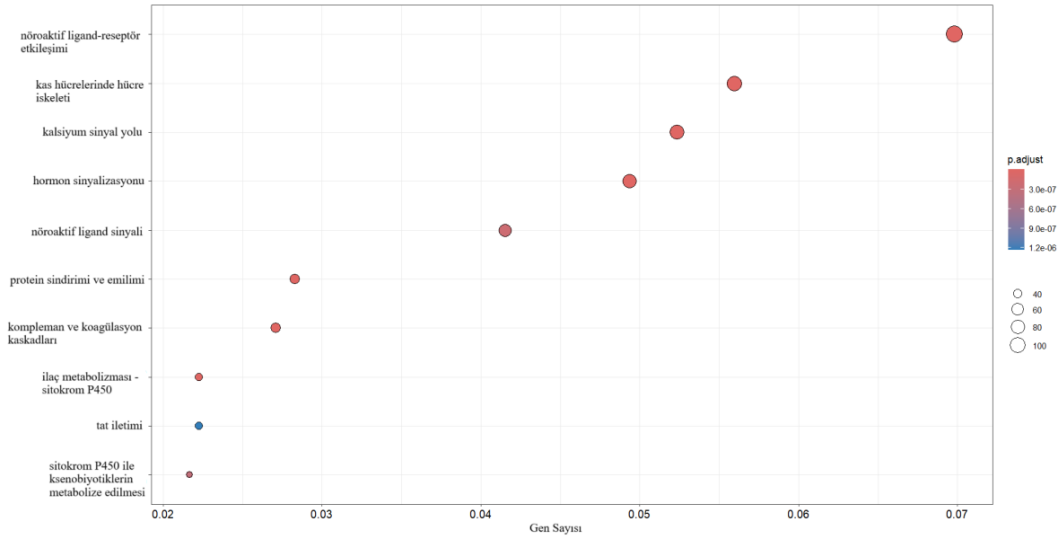
Şekil 3.25 Regülasyonu azalmış genlerin Gen Ontolojisi Moleküler Fonksiyon ile zenginleştirilmesi

Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi analizleri, up regüle olan genlerin bağışıklık sistemi aktivitesi ve hücre sinyalizasyonu ile ilişkili yollarda zenginleştiğini göstermektedir (Şekil 3.11).



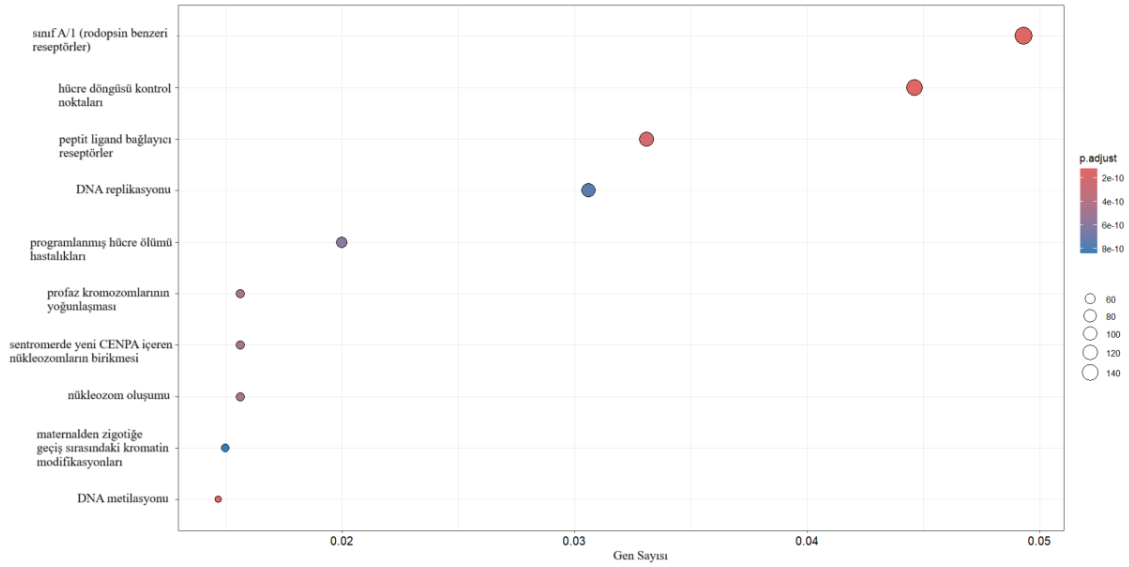
Şekil 3.26 Regülasyonu artmış genlerin Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi ile zenginleştirilmesi

Down regüle genlerin KEGG analizleri ise, bu genlerin özellikle nöroaktif ligand-reseptör etkileşimleri, kas hücre iskeleti, kalsiyum sinyal yolakları, hormon sinyalizasyonu, ilaç metabolizması (özellikle sitokrom P450 ile) gibi süreçlerde yer aldığını ortaya koymuştur (Şekil 3.12).



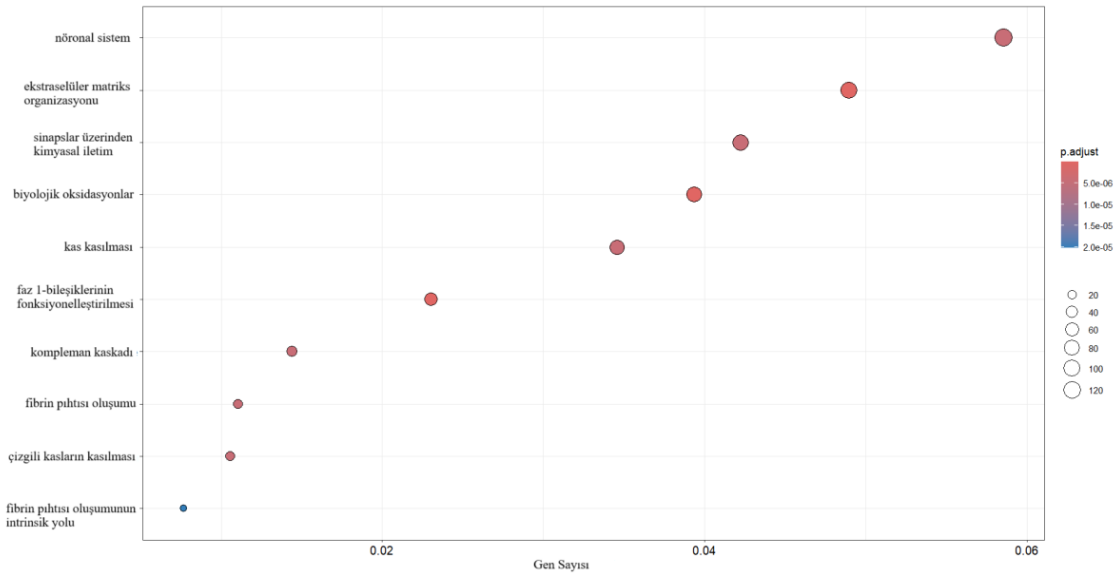
Şekil 3.27 Regülasyonu azalmış genlerin Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi ile zenginleştirilmesi

Reactome analizine göre up regüle genler başta hücre döngüsü kontrol noktaları, DNA replikasyonu, programlanmış hücre ölümü ile ilişkili hastalıklar, nükleozom oluşumu, DNA metilasyonu ve peptit-ligand bağlayıcı reseptörler gibi yollarla ilişkilendirilmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.28 Regülasyonu artmış genlerin Reactome ile zenginleştirilmesi

Reactome analizindeki down regüle genler ise nöronal sistem, kas kasılması, ekstrasellüler matriks organizasyonu, biyolojik oksidasyonlar, koagülasyon yolları gibi biyolojik sistem veya süreçler ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.29 Regülasyonu azalmış genlerin Reactome ile zenginleştirilmesi

Yüksek dereceli seröz over kanseri ve normal over örneklerinde PI3K-Akt-mTOR sinyal yolunun aktivite seviyeleri Şekil 3.15'teki grafikte karşılaştırılmıştır. Şekilde ortalama Z-skorları verilmiş olup bu sinyal yolunun tümör dokusunda anlamlı şekilde aktivitesinin arttığı gösterilmiştir.

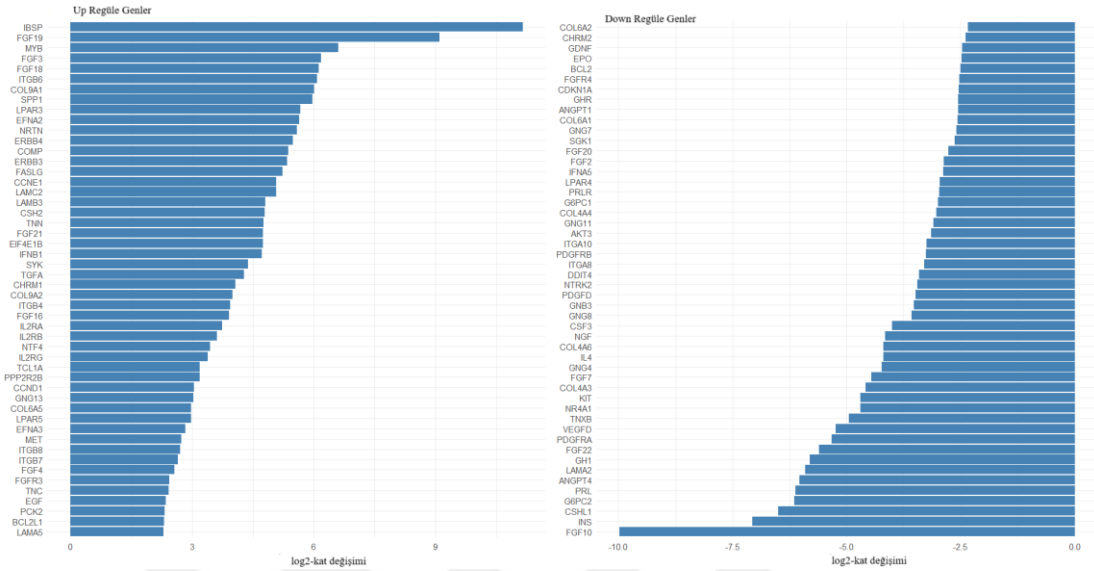
3.1.5 PI3K-AKT-mTOR Sinyal Yolu İlişkili Ekspresyon Profili



Şekil 3.30 PI3K-AKT-mTOR sinyal yolunun değişen ekspreyon seviyeleri

KEGG Pathway üzerinden belirlenen PI3K-AKT-mTOR sinyal yolu ilişkili genler arasından ekspresyon seviyelerinde en anlamlı değişiklik görülen genlere Şekil 3.16'da yer verilmiştir. Soldaki genler up regüle olmuş genleri, sağ taraftaki genler ise down regüle olmuş genleri temsil etmektedir. Up regüle genler arasında

IBSP, FGF19, FGF18, OSM, SPOCK1, EPHA3 gibi genler ön plana çıkmaktayken down regüle olan genler arasında FGF10, GPC3, CHRDL2, PDGFRA, ANGPTL2 gibi genler yer almaktadır.



Şekil 3.31 PI3K-AKT-mTOR ilişkili genlerin ekspresyonundaki değişimler

PI3K-AKT-mTOR sinyal yoluna ait genlerin ekspresyon profili değişimlerini ifade eden logFC, P-value, adj.P.Val değerleri verilmiştir (Tablo 3.1).

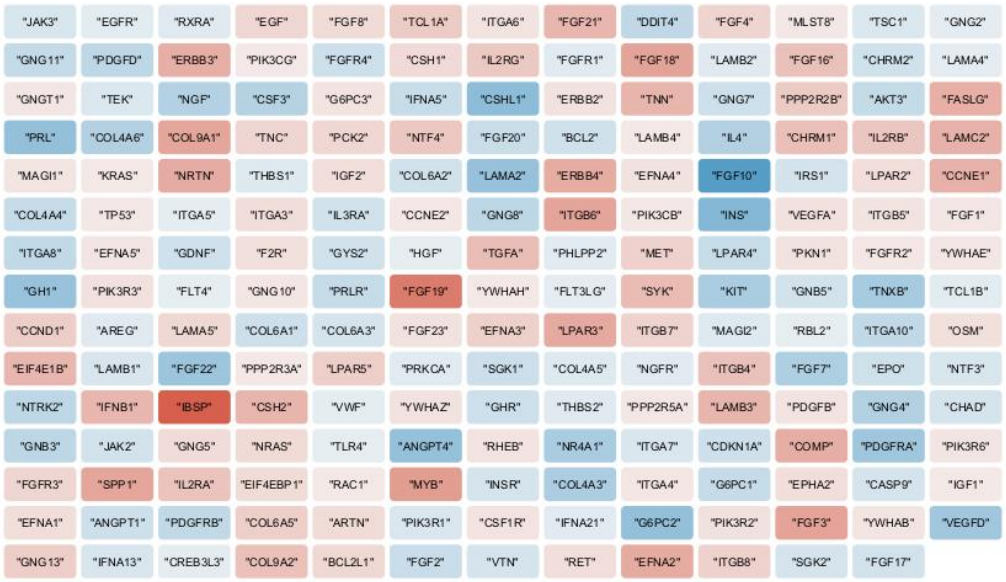
Tablo 3.1 PI3K-AKT-mTOR sinyal yolu genlerinin ekspresyon profili ve istatistiksel bulgular

GEN	logFC	P.Value	adj.P.Val
NRAS	2.1016	7.96×10^{-117}	2.30×10^{-115}
EIF4EBP1	2.0076	2.46×10^{-61}	1.72×10^{-60}
PIK3R2	1.5458	1.05×10^{-69}	9.04×10^{-69}
RHEB	1.3946	3.59×10^{-62}	2.56×10^{-61}
MLST8	1.0913	1.18×10^{-51}	6.49×10^{-51}
PIK3CB	1.0769	4.73×10^{-47}	2.32×10^{-46}
KRAS	1.0267	1.20×10^{-25}	3.34×10^{-25}
RPS6KB2	0.6916	6.95×10^{-29}	2.13×10^{-28}
AKT1	0.6848	3.32×10^{-24}	8.89×10^{-24}
RPTOR	0.4791	1.60×10^{-15}	3.31×10^{-15}
MTOR	0.3437	1.20×10^{-6}	1.81×10^{-6}
MAPK3	0.3413	8.59×10^{-9}	1.41×10^{-8}
MAP2K2	0.2875	1.78×10^{-7}	2.76×10^{-7}
HRAS	0.2610	8.78×10^{-5}	1.21×10^{-4}
MAPK1	0.1449	0.01390	0.01677
PRKAA2	0.1440	0.28547	0.30821
MAP2K1	0.08221	0.09290	0.10519

Tablo 3.1 PI3K-AKT-mTOR sinyal yolu genlerinin ekspresyon profili ve istatistiksel bulgular (Devamı)

PRKAA1	−0.06997	0.18936	0.20821
PIK3CA	−0.2188	3.83×10^{-5}	5.37×10^{-5}
PIK3CD	−0.2213	0.003747	0.004696
AKT2	−0.2220	0.001316	0.001693
TSC2	−0.2338	1.21×10^{-4}	1.66×10^{-4}
PTEN	−0.4299	3.25×10^{-8}	5.21×10^{-8}
BRAF	−0.6283	1.40×10^{-45}	6.64×10^{-45}
RAF1	−0.7404	5.07×10^{-64}	3.80×10^{-63}
RPS6KB1	−0.8001	3.94×10^{-51}	2.14×10^{-50}
RICTOR	−1.1869	1.27×10^{-99}	2.31×10^{-98}
TSC1	−1.6794	1.10×10^{-130}	4.68×10^{-129}
PIK3R1	−1.8194	1.08×10^{-72}	1.00×10^{-71}
AKT3	−3.1511	1.01×10^{-132}	4.59×10^{-131}

Yüksek dereceli seröz over kanseri ile ilişkili genlerin ekspresyon değişimlerine renk kodlu olarak Şekil 3.17'de yer verilmiştir. Koyu kırmızı tonlardan açık maviye doğru değişen renkler; up regüle olan genlerden, down regüle olan genlere doğru bir renk geçişini temsil etmektedir. Özellikle FGF ailesi ve ekstrasellüler matriksle ilişkili genlerin regülasyonunun değiştiği görülmektedir.



Şekil 3.32 PI3K-AKT-mTOR ilişkili genlerin ekspresyonundaki değişimlerin renk kodlu gösterimi

3.1.6 Ağırlıklı Gen Eşekspresyon Ağı Analizi

Ağ tabanlı analizler sonucunda, HGSOC fenotipi ile en güçlü ilişkiyi gösteren

modül olarak turkuaz modül belirlenmiştir. Modüldeki ekspresyon seviyelerinde anlamlı değişiklikler bulunan genlerin analiziyle, PI3K-AKT-mTOR yolağında fonksiyonel açıdan belirleyici konumda olan çekirdek genlerin saptanması sağlanmıştır. Bu sonuçlar, PI3K–AKT–mTOR sinyalizasyonunun HGSOC için kritik bir transkripsiyonel düğüm noktası oluşturduğunu ortaya koymaktadır (Tablo 3.2). kME, bir genin modülle olan ilişkisini gösteren değerdir; yüksek kME değerine sahip genler modülün çekirdek genleri olarak kabul edilmektedir [178].

Tablo 3.2 PI3K-AKT-mTOR sinyal yolu ve turkuaz modül ilişkisi

GEN	kME_turquoise	logFC
NRAS	0.834759044	2.1016
TSC1	-0.824463898	-1.6794
AKT3	-0.788484263	-3.1511
RICTOR	-0.751572797	-1.1869
EIF4EBP1	0.715580793	2.0076
RHEB	0.712068504	1.3946
PIK3R2	0.695926059	1.5458
PIK3R1	-0.666253775	-1.8194
RAF1	-0.651107764	-0.74038
MLST8	0.645417637	1.0913
PIK3CB	0.607996146	1.0769
RPS6KB1	-0.587497536	-0.8001
BRAF	-0.578454565	-0.6283
RPS6KB2	0.533894663	0.69161

3.1.7 Moleküler Docking Çalışmaları

Ligand moleküllerinden biri olan Pirfenidon'un hedef proteinlerle oluşturmuş olduğu komplekslere ait bilgiler ve docking skorlarına Tablo 3.3'te yer verilmiştir.

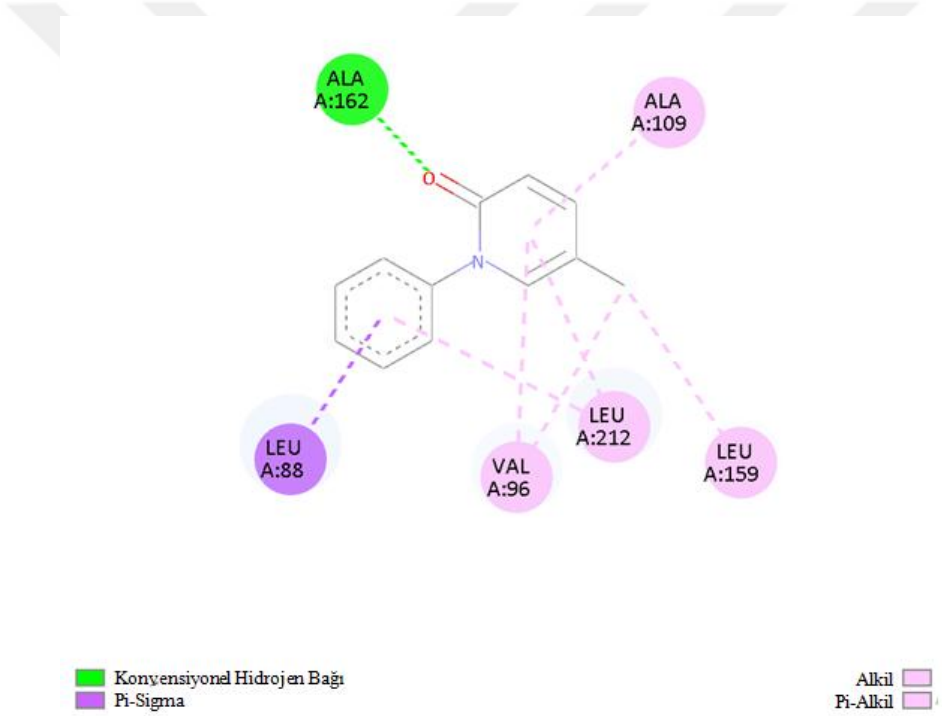
Tablo 3.3 Pirfenidon'un oluşturduğu komplekslere ait docking skorları

Kompleks	Skor (En düşük bağlanma enerjisi)	Ortalama Bağlanma Enerjisi
Pirfenidon-PI3K alfa	-7.32 kcal/mol	-7.27 kcal/mol

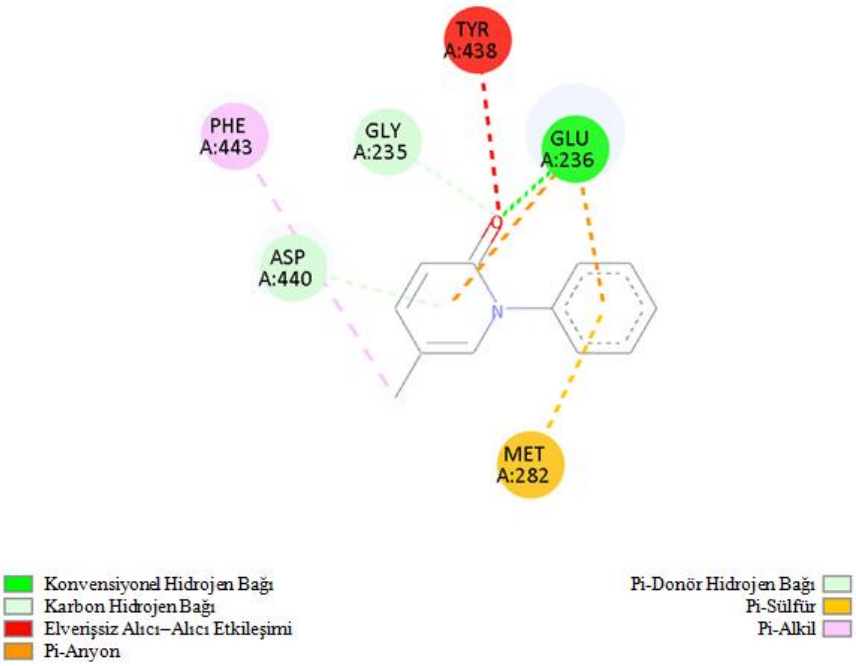
Tablo 3.3 Pirfenidon'un oluşturduğu komplekslere ait docking skorları (Devamı)

Pirfenidon-AKT1	-7.21 kcal/mol	-7.17kcal/mol
Pirfenidon-AKT2	-6.77 kcal/mol	-6.73kcal/mol
Pirfenidon-mTOR	-7.01kcal/mol	-7.0 kcal/mol
Pirfenidon-PDK1	-6.71 kcal/mol	-6.66 kcal/mol

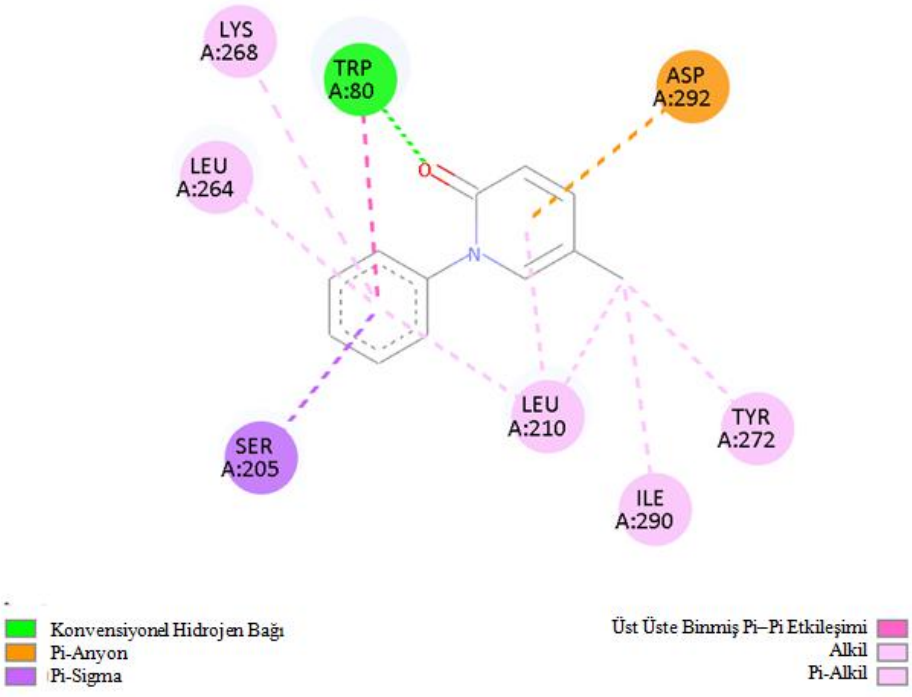
Pirfenidon, kompleksler ile konvansiyonel hidrojen bağları, çeşitli pi ve alkil bağları oluşturmuştur (Şekil 3.18-3.22). Pi, sülfür ve sigma etkileşimleri görülmüştür.



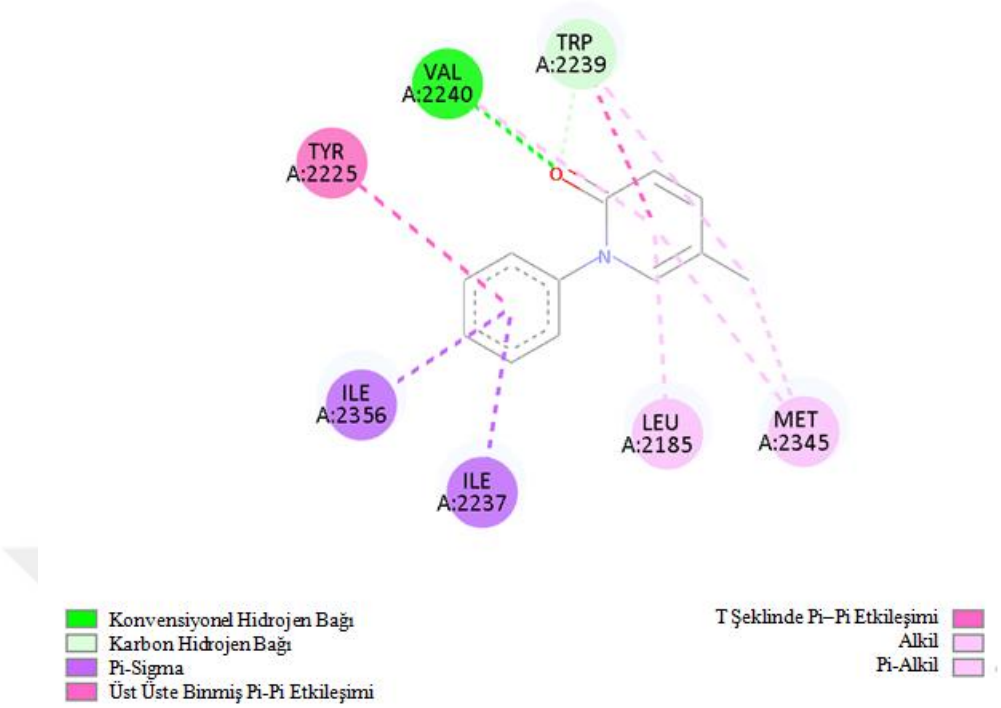
Şekil 3.33 Pirfenidon-PI3K alfa kompleksi



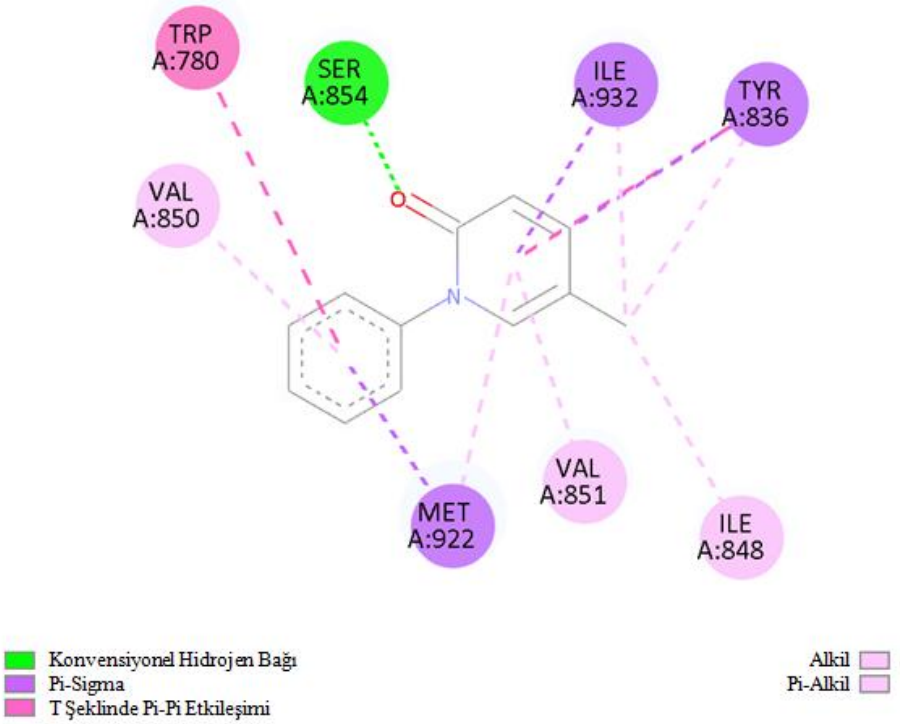
Şekil 3.34 Pirfenidon-AKT1 kompleksi



Şekil 3.35 Pirfenidon-AKT2 kompleksi



Şekil 3.36 Pirfenidon-mTOR kompleksi



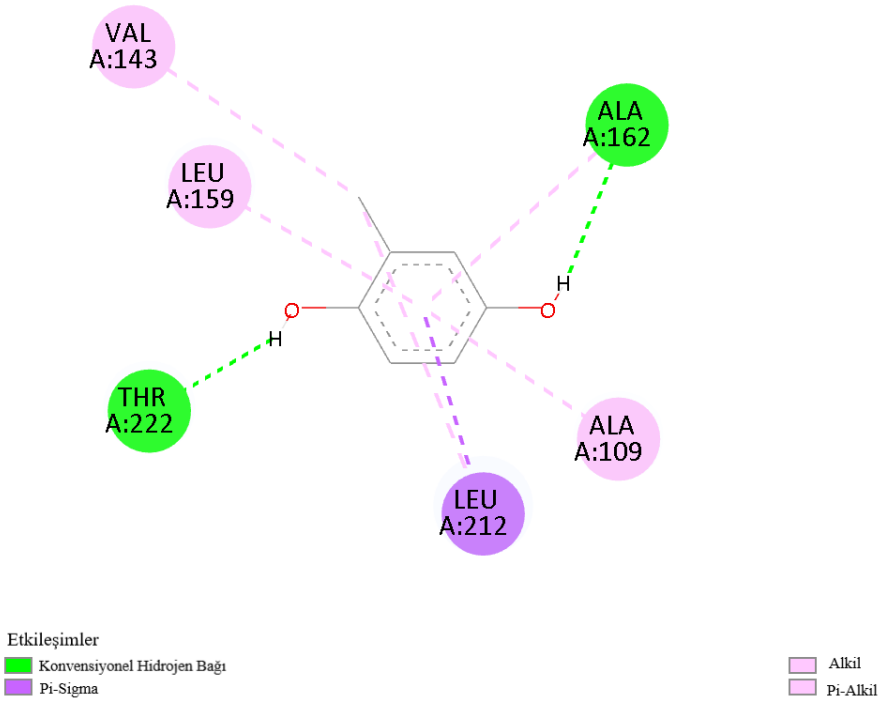
Şekil 3.37 Pirfenidon-PDK1 kompleksi

Metilhidrokinon ligandıyla oluşturulan komplekslere ait bilgililere ve docking skorlarına Tablo 3.4'te yer verilmiştir.

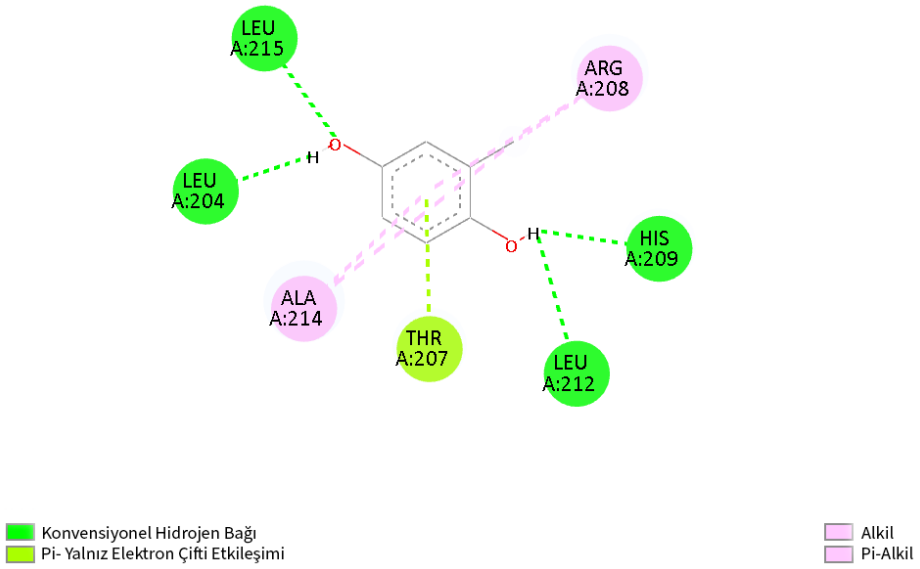
Tablo 3.4 Metilhidrokinonun oluşturduğu komplekslere ait docking skorları

Kompleks	Skor (En düşük bağlanma enerjisi)	Ortalama Bağlanma Enerjisi
Metilhidrokinon-PI3K alfa	-6.16 kcal/mol	-6.14 kcal/mol
Metilhidrokinon-AKT1	-5.83 kcal/mol	-5.78 kcal/mol
Metilhidrokinon-AKT2	-6.69 kcal/mol	-6.60 kcal/mol
Metilhidrokinon-mTOR	-5.39 kcal/mol	-5.35 kcal/mol
Metilhidrokinon-PDK1	-5.56 kcal/mol	-5.55 kcal/mol

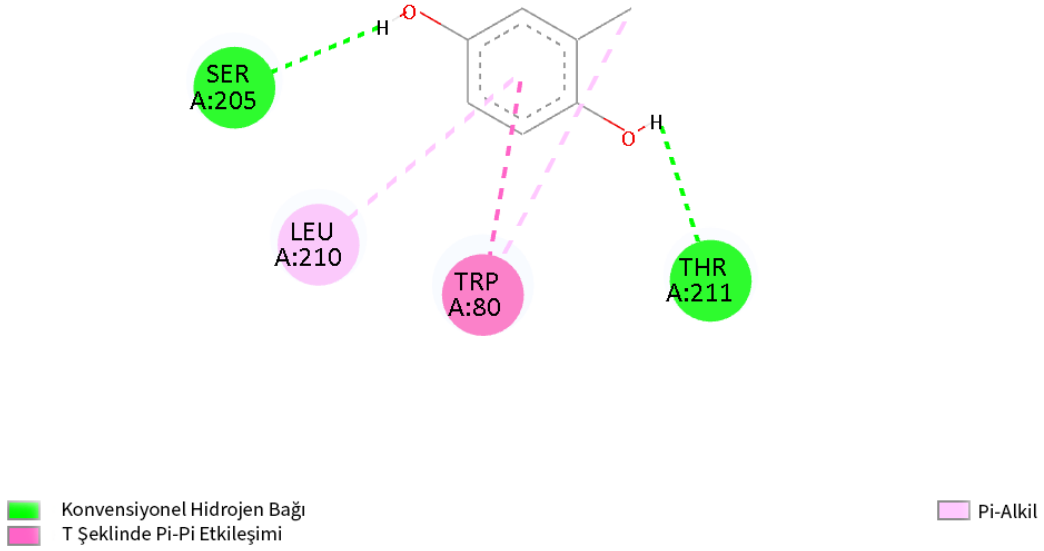
Metilhidrokinonun, kompleksler ile konvansiyonel hidrojen bağları, çeşitli pi, sülfür ve alkil bağları oluşturduğu gözlemlenmiş, kompleklerin iki boyutlu görsellerine Şekil 3.23-3.27'de yer verilmiştir.



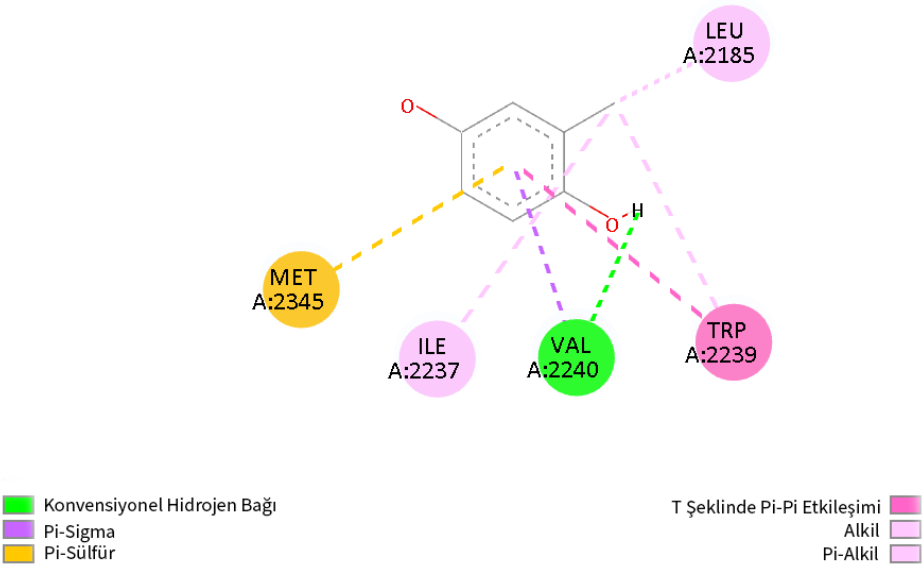
Şekil 3.38 Metilhidrokinon-PI3K alfa kompleksi



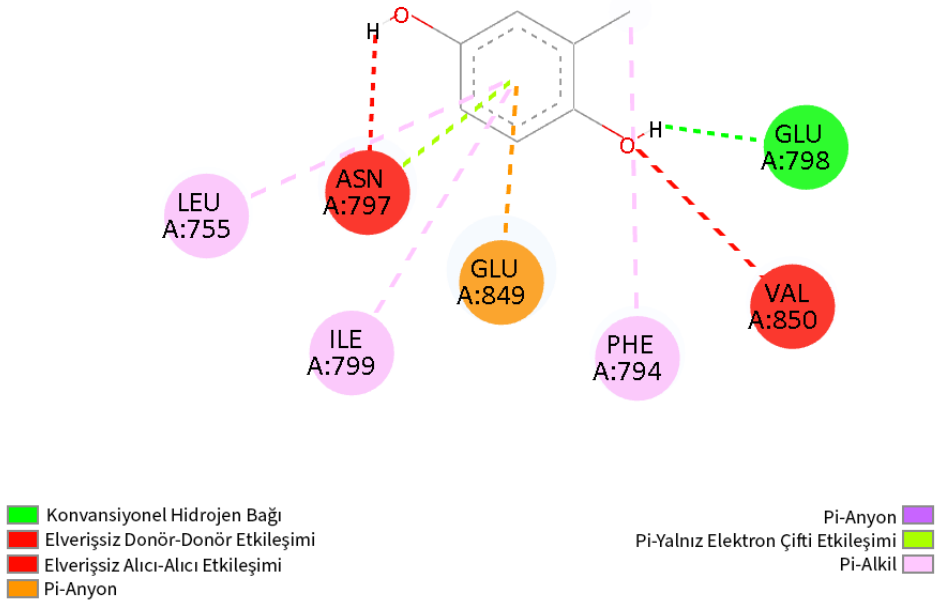
Şekil 3.39 Metilhidrokinon-AKT1 kompleksi



Şekil 3.40 Metilhidrokinon-AKT2 kompleksi



Şekil 3.41 Metilhidrokinon-mTOR kompleksi

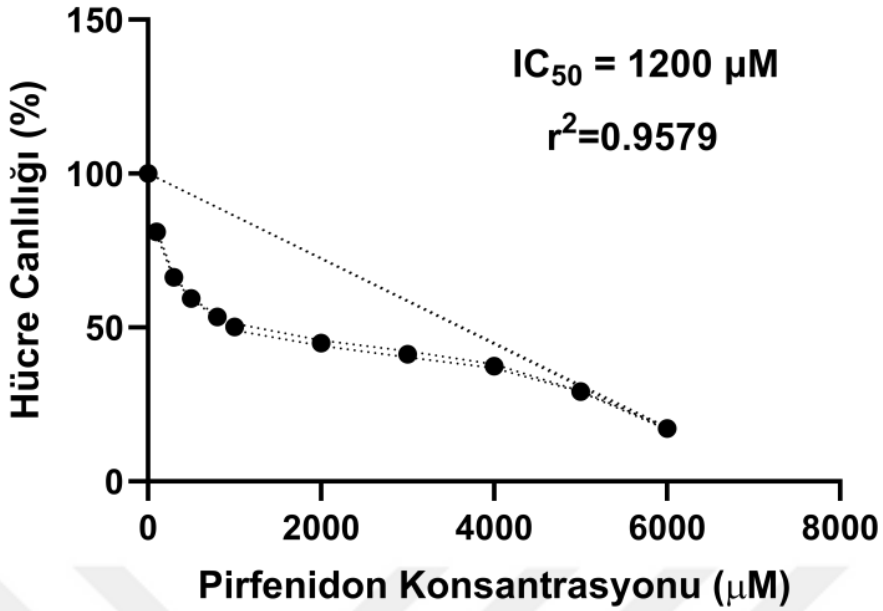


Şekil 3.42 Metilhidrokinon-PDK1 kompleksi

3.2 Hücre Kültürü Çalışmaları

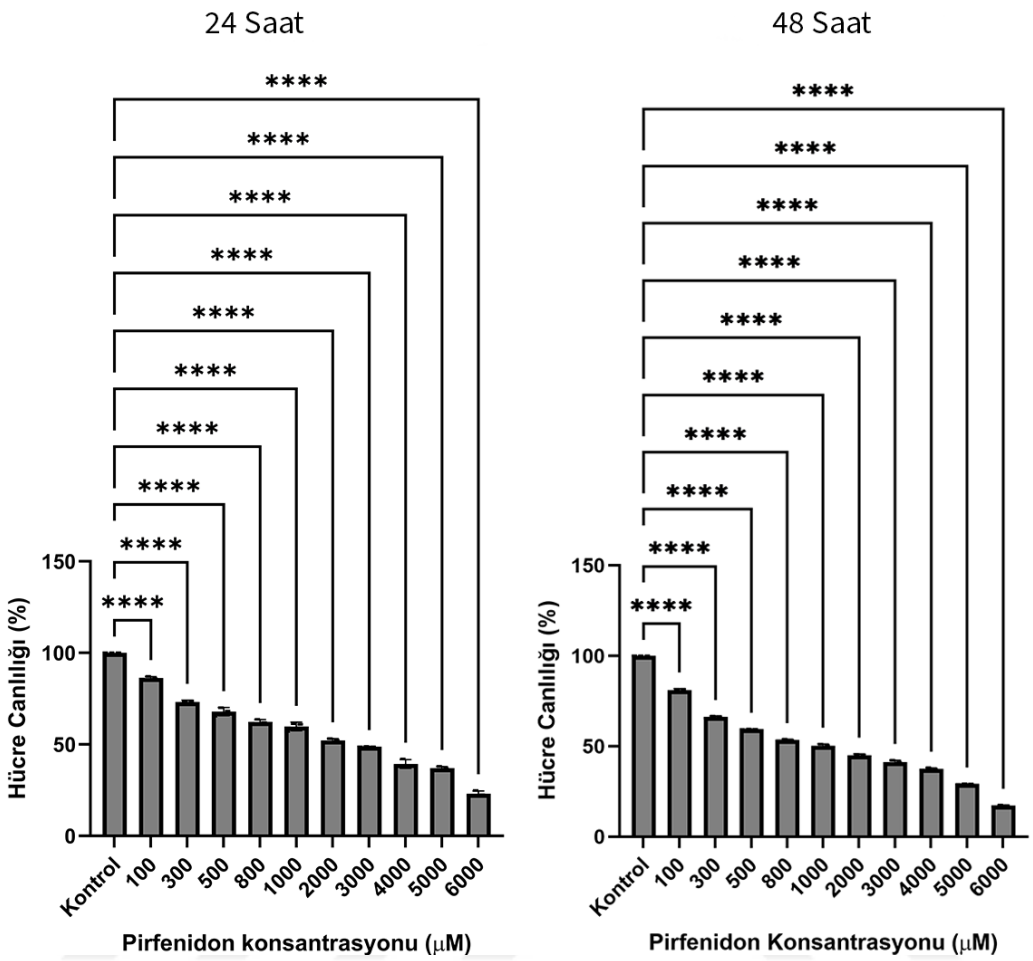
3.2.1 Sitotoksisite Analizi

MTT sonuçlarının değerlendirilmesi ve IC50 grafiklerinin çizilmesi amacıyla GraphPad Prism 10 kullanılmıştır Pirfenidonun IC50 değeri 1200 µM olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.28). IC50 hesabının güvenilirliği determinasyon katsayısı (R^2 = 0.9579) değeri ile desteklenmiştir.



Şekil 3.43 Pirfenidonun hücre canlılığına etkisi ve IC50 dozu

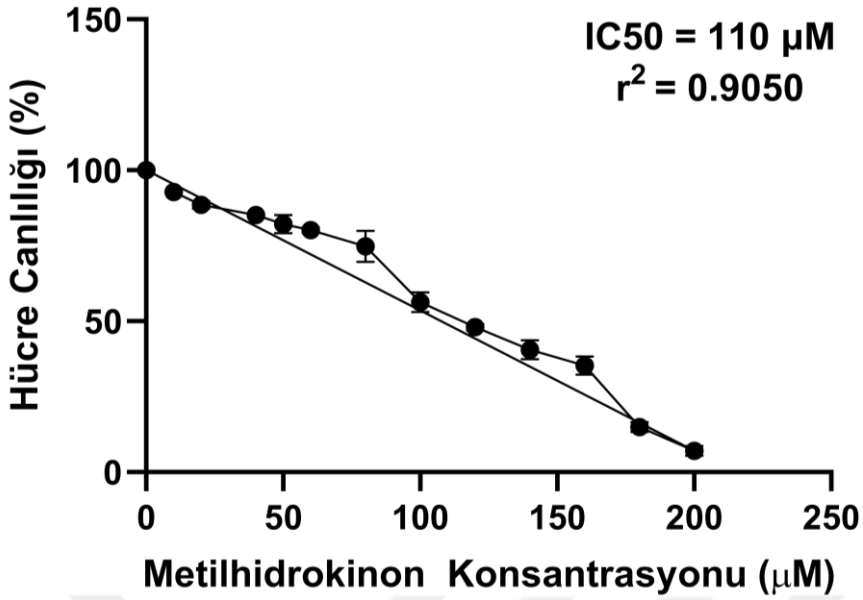
Veriler, üç bağımsız deneyden elde edilen ortalama ± SD şeklinde ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiş; gruplar arasındaki farklar çift yönlü ANOVA ($\alpha = 0.05$) ve Dunnett Testi ile değerlendirilmiştir. Grupların kontrol grubuna karşı karşılaştırılması hedeflendiğinden, çoklu karşılaştırmalarda, Dunnett post hoc testi tercih kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyleri; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, **P<0.0001 olarak gösterilmiştir. Pirfenidonun artan dozlarına göre değişen hücre canlılığı, 24 ve 48 saatlik maruz kalım sürelerine göre görselleştirilmiştir (Şekil 3.29).



Şekil 3.44 Pirfenidonun artan konsantrasyonlarının, hücre canlılığına 24 ve 48 saatlik etkisi

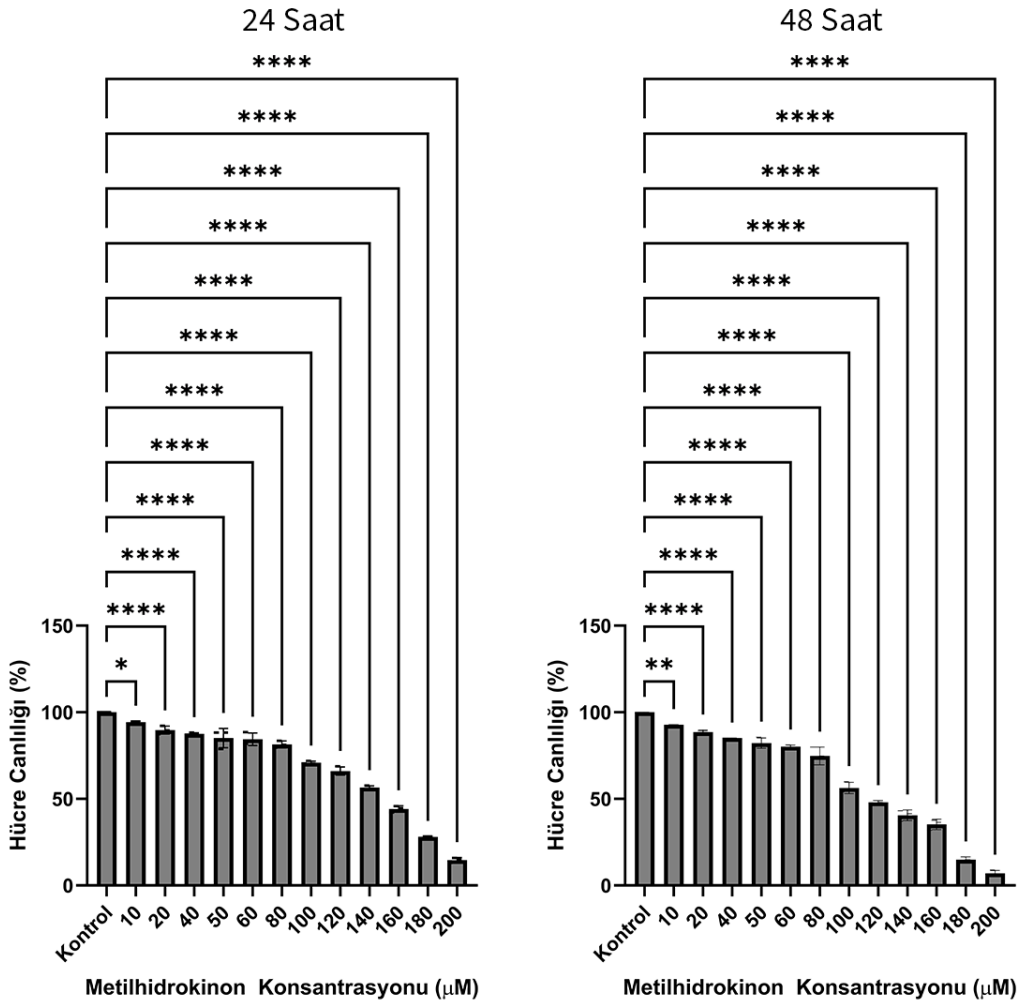
Pirfenidon uygulamasının hem 24, hem 48 saatlik inkübasyon süresinde, kontrol grubuna kıyasla tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma oluşturduğu görülmüştür (****, P<0.0001). Her iki zaman noktasında da Pirfenidon'un hücre canlılığını doza bağımlı olarak inhibe ettiği; ayrıca aynı dozun 48 saatlik inkübasyonun, 24 saate oranla daha güçlü bir inhibisyon oluşturduğu görülmüştür. Bu bulgular, Pirfenidon'un Caov-3 hücrelerinde hem doza hem zamana bağlı olarak güçlü sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Metilhidrokinonun IC50 değeri 110 μM olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.30). R^2 değeri 0.9050 olarak elde edilmiştir.



Şekil 3.45 Metilhidrokinonun hücre canlılığına etkisi ve IC50 dozu

Metilhidrokinonun artan konsantrasyonlarının, 24 ve 48 saatlik uygulama sonucunda hücre canlılığına etkisi Şekil 3.31'deki grafik ile görselleştirilmiştir.



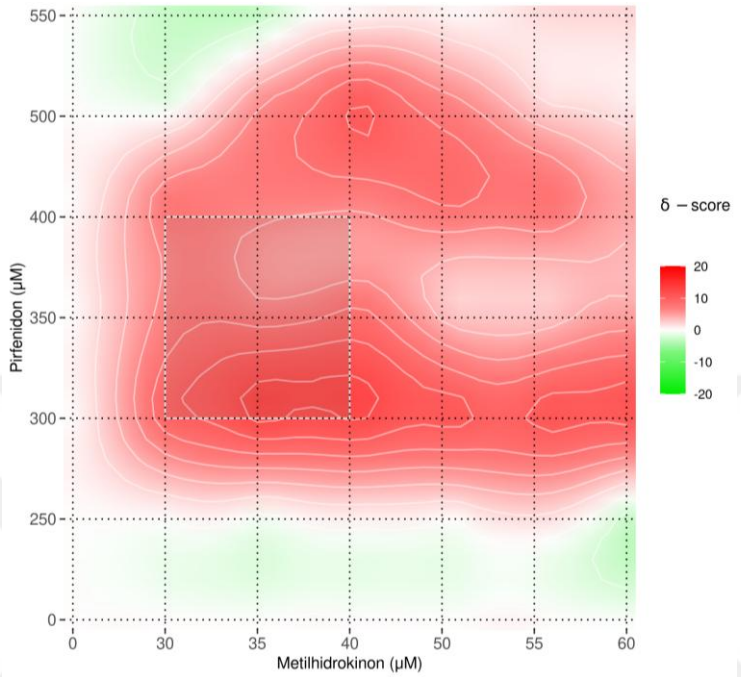
Şekil 3.46 Metilhidrokinonun artan konsantrasyonlarının, hücre canlılığına 24 ve 48 saatlik etkisi

Metilhidrokinon için gerçekleştirilen iki yönlü ANOVA analizi sonucunda, Dunnett testine göre, 24 saatlik inkübasyonda, 10 μM dozu dahil olmak üzere tüm metilhidrokinon dozları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde, 10 μM dozlardaki inhibisyonun anlamlılığı, diğer gruplara oranla daha düşük olsa da anlamlıdır. Doz arttıkça kontrol ile uygulanan doz arasındaki inhibisyon farkının, kademeli olarak yükseldiği görülmüştür. 48 saatlik uygulamada, dozların genel etkisinin daha belirgin olduğu saptanmıştır.

3.2.2 Pirfenidon ve Metilhidrokinon İkili Kombinasyonunun Sinerjik Dozunun Synergy Finder ile Belirlenmesi

Pirfenidon ve metilhidrokinon ikili kombinasyonunun sinerjik dozunun belirlenmesinde Synergy Finder'a kombinasyon ilaç dozları ve gerçekleştirilen MTT sonuçlarına göre bu dozların hücre canlılığına etkisi yüzdesel olarak tablo

şeklinde girilmiştir. Bliss metot kullanılmış ve genel sinerji skoru 4.50, en sinerjik bölgenin skoru ise 8.72 olarak belirlenmiştir. Şekil 3.32'deki ısı haritasında ikili kombinasyon dozları görülmekte olup kırmızı bölgeler sinerjiyi, yeşil bölgeler ise antagonistik etkiyi temsil etmektedir.



Şekil 3.47 Sinerji skorlarına ait ısı haritası

Isı haritasında özellikle 35–50 µM metilhidrokinon ve 300–400 µM pirfenidon aralığında δ-skor değerleri +10 civarına ulaştığı görülmektedir.

Isı haritasındaki genel skor dağılımına göre kombinasyon skorunun çoğunlukla pozitif yönde olduğu, dolayısıyla metilhidrokinon ve Pirfenidon ikili kombinasyonunun aditif veya sinerjik etki yarattığı sonucu çıkarılmaktadır.

Pirfenidon ve metilhidrokinon ikili kombinasyonunun uygulanan tüm dozlarına ait sinerji skorları ve inhibisyon değerleri Tablo 3.5'te verilmiştir. Tablodaki veriler sinerji skoruna göre büyükten küçüğe doğru olacak şekilde sıralanmıştır.

Tablo 3.5 Pirfenidon ve metilhidrokinon ikili kombinasyonunun sinerji skorları

Pirfenidon Konsantrasyonu (µM)	**Metilhidokinon Konsantrasyonu (µM)**	**İnhibisyon Yüzdesi**	**Sinerji Skoru**
300	35	44,9	13,3943953

Tablo 3.5 Pirfenidon ve metilhidrokinon ikili kombinasyonunun sinerji skorları (Devamı)

300	40	44,49	12,8891789
300	60	45,81	12,0983027
300	50	43,23	11,3365627
300	55	43,09	11,1640498
500	40	49,23	10,5232876
300	30	42,12	9,96878177
400	50	41,46	8,68725729
350	40	44,69	8,36687617
400	55	41,08	8,21900796
400	30	40,78	7,84933743
400	35	39,94	6,81425997
350	30	43,37	6,74032587
500	50	45,8	6,29672124
400	40	39,48	6,24743184
350	35	42,95	6,22278713
500	35	45,57	6,01330717
400	60	40,02	4,50933709
350	60	42,95	3,94717416
550	55	47,02	2,68627247

Tablo 3.5 Pirfenidon ve metilhidrokinon ikili kombinasyonunun sinerji skorları (Devamı)

350	55	39,89	2,4521478
350	50	39,61	2,10712198
250	55	40,45	1,78674086
500	55	41,84	1,41707034
550	60	47,4	1,13322048
250	40	39,61	0,7516634
500	60	42,91	0,56218658
250	30	39,05	0,06161175
0	0	0	0
250	0	39	0
300	0	34,03	0
350	0	37,9	0
400	0	34,41	0
500	0	40,69	0
550	0	44,84	0
0	30	8,32	0
0	35	11,48	0
0	40	13,56	0
0	50	7,09	0

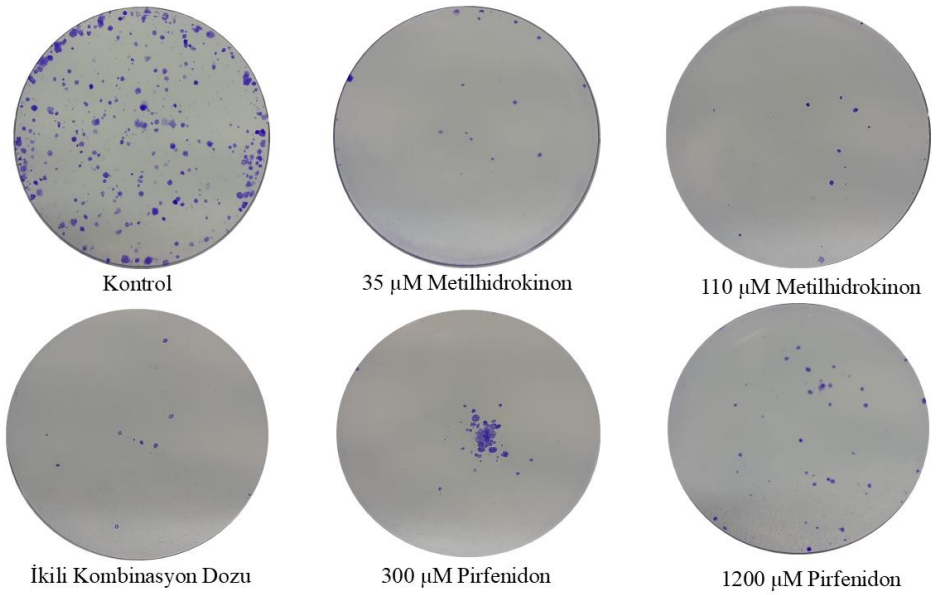
Tablo 3.5 Pirfenidon ve metilhidrokinon ikili kombinasyonunun sinerji skorları (Devamı)

0	55	18,64	0
0	60	21,26	0
250	50	38,98	-0,0246447
550	50	44,43	-0,50521638
250	35	38,43	-0,70237399
550	40	43,75	-1,34313623
500	30	39,33	-1,6758397
550	30	42,68	-2,66162776
250	60	37,24	-4,40403794
550	35	41,23	-4,44836862

Tablodaki değerlere göre en yüksek sinerji skoru olan (13,3943953) 300 μM Pirfenidon ve 35 μM metilhidrokinon dozları ikili kombinasyon dozu olarak belirlenmiş olup belirlenen bu doz, koloni oluşumu deneyi ve apoptoz testi için sinerjik doz olarak kullanılmıştır. Belirlenen ikili kombinasyon dozunun CI değeri 0,542 olarak hesaplanmıştır.

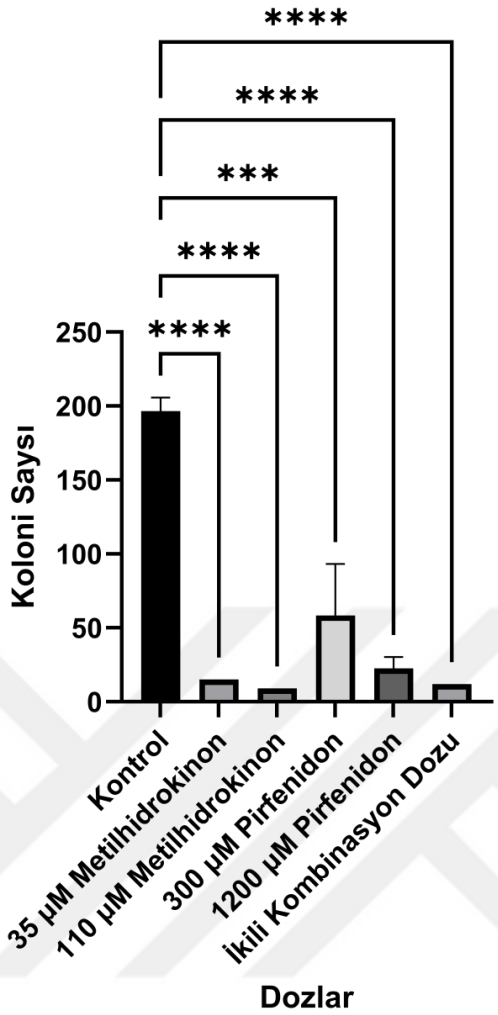
3.2.3 Koloni Oluşturma Deneyi

Koloni oluşturma deneyine ait görsellere Şekil 3.33'te yer verilmiştir.



Şekil 3.48 Değişen dozlara göre oluşan koloniler

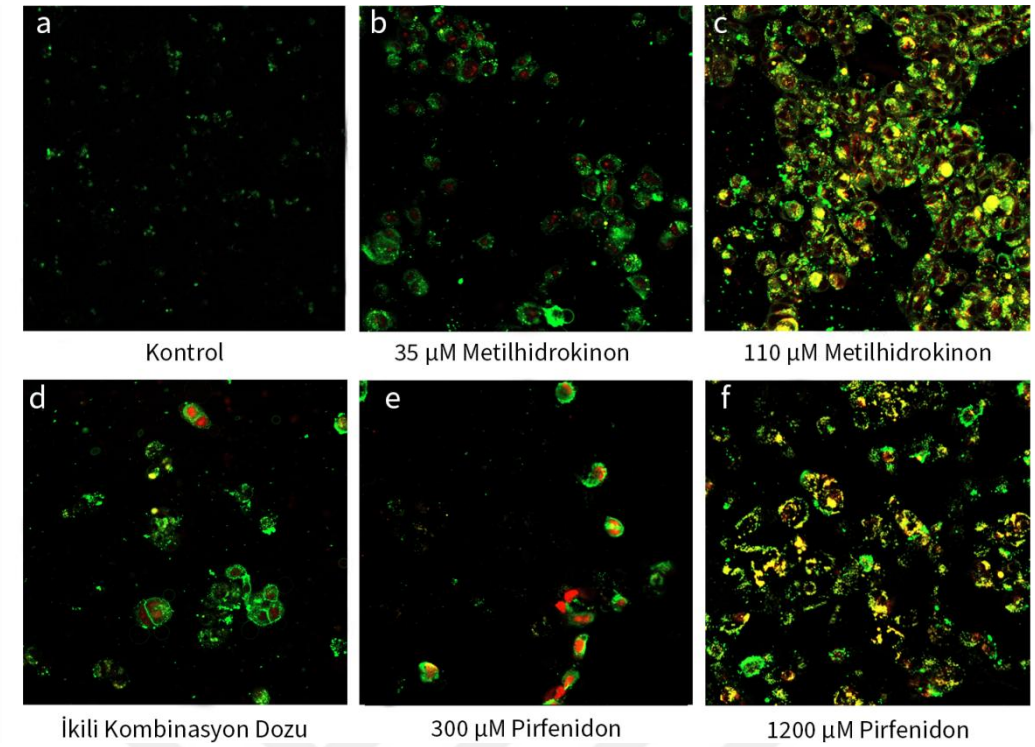
Tek yönlü (One-way) ANOVA analizi, doz uygulamaları ve kontrol arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir. Çoklu karşılaştırma testi olarak kullanılan Dunnett post-hoc testi, tüm doz gruplarının kontrol grubuna kıyasla koloni sayısını anlamlı şekilde azalttığını ortaya koymuştur ($P<0.001$). En anlamlı değişimler ($P<0.0001$), metilhidrokinon dozları ve ikili kombinasyon dozunda görülmüştür. Koloni sayılarındaki değişime ait veriler Şekil 3.34'teki grafik ile gösterilmiştir.



Şekil 3.49 Kontrol ve doz gruplarına göre değişen koloni sayıları

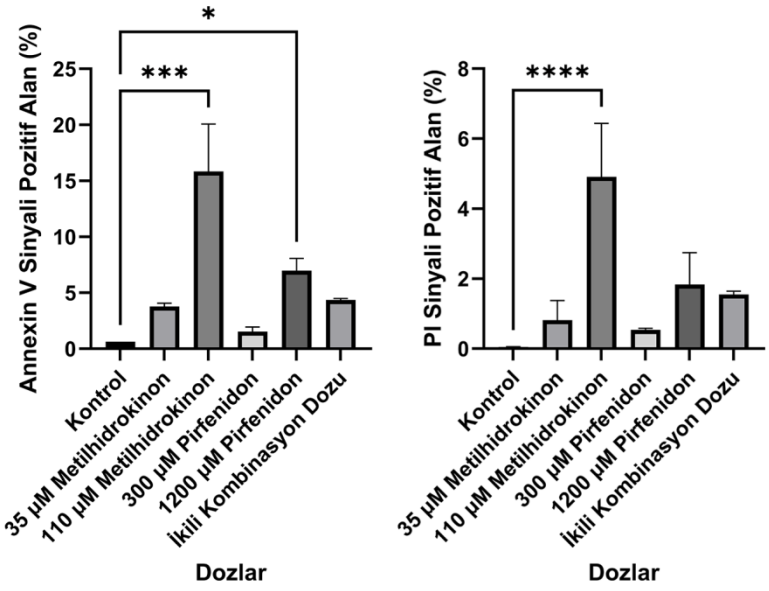
3.2.4 Annexin V-FITC Erken Apoptoz Testi

Annexin V-FITC erken apoptoz testi uygulaması sonucunda konfokal mikroskop ile elde edilen, farklı dozlara ait görüntülere Şekil 3.35'te yer verilmiştir. Kontrol, 35 ve 110 µM metilhidrokinon, 300 ve 1200 µM Pirfenidon ve ikili kombinasyon dozu olmak üzere altı farklı grup için üç farklı alandan fotoğraf çekilmiştir. Kontrol grubunda Annexin V-FITC ve PI sinyali, diğer gruplara göre belirgin bir şekilde daha az görülmüştür. Sağlıklı hücreler, Annexin ve PI açısından negatif; erken apoptotik hücreler Annexin açısından pozitif, PI için negatif; geç apoptotik/nekrotik hücreler, Annexin ve PI açısından pozitif olarak değerlendirilmektedir.



Şekil 3.50 Annexin V-FITC erken apoptoz testi hücre görselleri. (a) Kontrol grubu. (b) 35 µM metilhidrokinon uygulanmış grup. (c) 110 µM metilhidrokinon uygulanmış grup. (d) İkili kombinasyon dozu uygulanmış grup. (e) 300 µM Pirfenidon uygulanmış grup. (f) 1200 µM Pirfenidon uygulanmış grup.

Analiz sonuçlarına ait grafiğin oluşturulmasında Annexin V ve PI sinyallerinin toplam alana oranla yüzdeleri kullanılmıştır (Şekil 3.36). Annexin V sinyali, erken apoptoz belirteciyken; PI, geç apoptozu veya nekrozu işaret etmektedir.



Şekil 3.51 Annexin V-PI sinyal yoğunluklarının alan yüzdesi

Kontrol grubu, en düşük apoptotik sinyal yüzdesine sahip grup olarak saptanmıştır. Annexin V sinyali yüzdesi, sırasıyla, 110 µM metilhidrokinon, 1200 µM Pirfenidon ve ikili kombinasyon dozunda en yüksek olarak gözlemlenmiştir. PI sinyali yüzdesi için de dozlar arası sıralama benzerdir. Bu dozlarda artan PI sinyaliyle gözlenebileceği gibi, membran bütünlüğünün bozulduğu ve hücrelerin çoğunlukla apoptozun geç evresinde olduğu görülmektedir. İkili kombinasyon dozu, kombinasyonda kullanılan tekli dozlara (300 µM Pirfenidon ve 35 µM metilhidrokinon) kıyasla daha güçlü bir proapoptotik etki göstermiştir.

4
SONUÇ

Yumurtalık kanseri, en ölümcül jinekolojik kanser türü olarak kabul edilmektedir. Hastalığın genel tedavi yöntemleri cerrahi ve kemoterapiyi kapsamaktadır. Sinyal yollarındaki değişimler, tümör mikroçevresindeki düzenlemeler, ilaç direnci ve nüks gibi sebeplerle hastaların sağkalım oranında iyileşme görülmemektedir. Kemoterapi, ciddi yan etkilere yol açmakta ve bu durum hastaların yaşam kalitesini olumsuz etkileyebilmektedir [30]. Tümör mikro çevresinin tedaviye karşı yarattığı engeller, yumurtalık kanseri tedavisine yönelik önemli bir zorluk teşkil etmektedir. TME, kanser hücrelerinin çevrelerindeki hücreleri yeniden programlayarak tümör progresyonunu desteklemekte ve tedaviye karşı direnç oluşturmaktadır [179]. Özellikle HGSOC'da ilaç direnci, ilaç dışa atımı (effluks), hücre zarı taşınımı, DNA hasarı onarımı, kodlamayan RNA'ların rolü ve tümör mikroçevresinin bağışıklık kaçışına etkisi dahil olmak üzere birçok mekanizmayı kapsayan kompleks bir yapıdır [57]. Yeni nesil hedefe yönelik ajanlar ve immünoterapiler, over kanseri tedavisinde cerrahi ve kemoterapiye ek olarak kullanılsa da, klinik etkinlikleri sınırlıdır. Alternatif anjiyojenik yolakların aktivasyonu, DNA onarım mekanizmalarının yeniden kazanılması ve immün baskılayıcı tümör mikroçevresi nedeniyle bu yöntemlerin etkinliği düşüktür [39, 40]. Tüm bu zorluklar, alternatif tedavi yöntemlerinin ve kombinasyon stratejilerinin geliştirilmesinin önemini artırmaktadır. Bu bağlamda, önceden başka bir hastalığın tedavisinde kullanım için onay almış veya geliştirilmekte olan bir ilacın, farklı bir hastalıkta kullanım potansiyelini araştırmaya yönelik yöntemler, yumurtalık kanseri tedavisinde alternatif bir strateji olarak değerlendirilmektedir [180, 181].

Pirfenidon, hafif ila orta dereceli idiyopatik pulmoner fibrozis (İPF) tedavisinde kullanılmakta olan onaylı bir ilaçtır [118]. Pirfenidonun biyolojik aktiviteleri

arasında, TGF-β inhibisyonu, glikoliz ve epitalyel mezenkimal geçişin baskılanması, kaspaz ilişkili apoptozun indüklenmesi ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) sekresyonunun azaltılması yer almaktadır [121-124, 182]. Pirfenidon, gösterdiği bu aktiviteler ile kombine tedaviler için güçlü bir aday olarak değerlendirilmektedir. Onaylı bir ilaç olan Pirfenidon'un, güvenlik ve toksisite çalışmalarından geçmiş olması, geleneksel ilaç geliştirme süreçleriyle ilişkili zaman, risk ve maliyeti azaltmaktadır [127].

Doğal bileşikler, kanserin önlenmesi ve tedavisine yönelik araştırmalarda önemli bir yer tutmaktadır. Bakterilerden, bitkilerden ve marine organizmalardan elde edilen bileşikler, doğal bileşikler olarak kabul edilmektedir. Geniş kimyasal çeşitlilik, ayırt edici yapısal özellikler ve çeşitli biyolojik aktiviteler göstermeleri nedeniyle bu bileşikler, kansere yönelik ilaç araştırmalarında önem kazanmaktadır [128]. Doğal bileşikler, hücre çoğalmasını etkili bir şekilde baskılayarak, hücre döngüsünü düzenleyerek ve fosfoinozitid 3-kinaz (PI3K), matris metaloproteinaz (MMP), Ras-Raf-MEK-ERK yolu (MAPK/ERK), toll benzeri reseptör (TLR) yolu ve AKT yolu gibi çeşitli tümörijenik sinyal yollarına müdahale ederek kemoprevensiyon ve kemoterapi için potansiyel tedavi seçenekleri sunmaktadır [129].

Bir hidrokinon türevi olan metilhidrokinonun, insan vasküler endotel ve kolorektal hücrelerde, antianjiyojenik etkiler gösterdiği bildirilmiştir [134]. Bu etkiler endotel hücrelerindeki VEGF ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) ile indüklenen AKT aktivasyonunun baskılanması ile ilişkilendirilmiştir [135]. Metilhidrokinonun, insan vasküler endotel hücrelerinde, β-katenin aktivitesini inhibe ettiği ve anjiyogenez sırasında rol oynayan Ras-Raf-MEK-ERK sinyalini aşağı regüle ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, MMP'lerin ekspresyonunun ve aktivitesinin, metilhidrokinon ile azaldığı bildirilmiştir [134].

PI3K-AKT-mTOR, hücre sağkalımı, büyüme, proliferasyon, anjiyogenez, transkripsiyon, translasyon ve metabolizmanın düzenlenmesinde hayati bir rol oynayan, over kanserinde aktif bir sinyal yoludur [183]. Bu sinyal yolu, tümör mikro çevresi ve bağışıklık yanıtını şekillendirmekte, tümör vaskülarizasyonunu artırarak anjiyogenezi desteklemekte, fibroblastların tümör destekleyici faktörler salgılamasını teşvik ederek tümör progresyonuna katkıda bulunmaktadır [74]. Mevcut PI3K-AKT-mTOR sinyal yolu inhibitörlerinin klinik kullanımı, ciddi yan

etkiler nedeniyle sınırlı kalmakta ve bu inhibitörler hiperglisemi, döküntü ve ishal gibi toksisitelerle ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle, yan etkileri daha az olan yeni bileşiklerin araştırılması önem kazanmıştır [184].

Yapılan literatür taramaları ve biyoinformatik analizler sonucunda, Pirfenidon'un glikoliz ve epitalyel mezenkimal geçişin baskılanması, kaspaz ilişkili apoptozun indüklenmesi ve VEGF sekresyonunun azaltılması özellikleriyle over kanseri tedavisine yönelik potansiyel taşıdığı öngörülmüş, tümör mikroçevresi sınırlamalarını aşmak amacıyla antianjiyojenik özelliği bilinen, AKT ekspresyonunu baskılayan ve doğal kaynaklı bir bileşik olan metilhidrokinon ile sinerjik kombinasyon çalışmaları yapılması hedeflenmiştir. Aday terapötik ajan olan Pirfenidon, metilhidrokinon ve ikili kombinasyonun, yüksek dereceli seröz yumurtalık kanseri üzerine potansiyel antikanser etkileri ilk kez çalışılmıştır.

Çalışmamız in silico ve in vitro olmak üzere iki ayrı aşamada yürütülmüştür. İlk aşamada, transkriptomik veriler kullanılarak diferansiyel gen ekspresyon analizi gerçekleştirilmiş ve Pirfenidon ile metilhidrokinonun hedef proteinlerle olası etkileşimleri, moleküler docking analizleri ile değerlendirilmiştir.

Diferansiyel gen ekspresyonu analizinde, yüksek dereceli seröz over kanseri ve normal over dokusu örnekleri ile kıyaslanmış olup up-regüle gen sayısı 14674, down-regüle gen sayısı 12082 olarak bulunmuştur. Elde edilen genlerle yapılan zenginleştirme analizleri, HGSOC örneklerinde up-regüle genlerin ağırlıklı olarak bağışıklık yanıtı, sitokin ve kemokin aracılı sinyalizasyon, immün reseptör aktivitesi, hücre döngüsü kontrolü ve DNA ile ilişkili düzenleyici süreçlerle ilişkili olduğunu göstermiştir. Down-regüle genler ise ekstraselüler matriks organizasyonu, hücre iskeleti ve kas ilişkili yapılar, kalsiyum sinyalizasyonu, nöronal sistem ve metabolik/oksidatif süreçler ile ilişkili biyolojik işlevlerle ilişkilendirilmiştir (Şekil 3.7–3.14).

KEGG Pathway üzerinden belirlenen PI3K-AKT-mTOR sinyal yolu ilişkili genler arasından ekspresyon seviyelerinde en anlamlı değişiklik görülen genler, ekspresyonu artan ve azalan genler olarak gruplandırılmıştır. Ekspresyonu artan ilk üç gen arasında, IBSP, FGF19 ve MYB yer alırken; ekspresyonu azalan ilk üç gen arasında, FGF10, INS ve CSHL1 yer almaktadır (Şekil 3.16).

İntegrin bağlayan sialoproteinin (IBSP), küçük integrin bağlayıcı ligand N-bağlı glikoprotein (SIBLING) gen ailesine ait bir gendir [185]. Literatürdeki farklı kanser türlerini kapsayan bir pan-kanser analizinde, ekspresyon düzeyinin yanı sıra prognoz, patolojik evre, immün infiltrasyon, metilasyon düzeyleri ve immün kontrol noktalarıyla da anlamlı ilişki gösterdiği bildirilmiştir [186].

Fibroblast büyüme faktörü genleri arasından fibroblast büyüme faktörü 19'un (FGF 19) ifadesinin normale göre arttığı gözlemlenmiştir. Literatürde FGF19 ekspresyonu over kanseri hastalarında tümör evresi ile ilişkilendirilmiştir [187]. Ayrıca, over kanserinde kötü prognoz ile ilişkili olduğu ve ileri evre seröz over kanserinde fibroblast büyüme faktörü reseptörü 4'ü aktive ederek progresyonu teşvik ettiği bildirilmiştir [188].

Omurgalı MYB genleri, kuşlarda miyelom ve lenfomaya neden olan kuş retrovirüslerinin dönüştürücü geni olan v-myb onkogeni ile ilişkili transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır. MYB'nin bulunduğu gen ailesi transkripsiyon faktörlerinin evrimsel korunumu ve onkojenik potansiyeli literatürde vurgulanmaktadır [189]. Yumurtalık kanserine ilişkin son bulgular, anormal MYB aktivasyonunun, özellikle MYB/AKT3 ekseni aracılığıyla, tümör gelişimini, agresifliğini ve kemoterapi direncini tetiklediğini göstermektedir. Bu da, MYB'nin terapötik bir hedef olarak önemini ortaya koymaktadır [190].

Down regüle olan ilk üç gen arasından fibroblast büyüme faktörü 10 (FGF10), FGFR2b/FGFR1b üzerinden PI3K–AKT ve RAS–MAPK yolaklarını aktive ederek hücre proliferasyonunu desteklemektedir. Bununla birlikte, over kanserinde FGF10'un genel ekspresyonu normal dokulara kıyasla daha düşük olmasına rağmen, yüksek FGF10 transkripsiyonunun daha düşük nükssüz sağkalım ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [187].

İnsülin (INS) geninin HGSOC örneklerinde düşük regülasyona sahip olması, over dokusunun fizyolojik olarak insülin üretiminden sorumlu olmaması ile uyumludur. Over kanserinde insülin sinyalizasyonu genellikle insülin reseptörü ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ekseni üzerinden düzenlenmektedir [191].

Koryonik somatomammotropin hormonu benzeri 1 (CSHL1) geni, plasenta ile ilişkili bir gen olup, over kanserindeki rolüne dair literatürdeki veriler sınırlıdır [192].

Diferansiyel ekspresyon analizi sonuçlarıyla, PI3K-AKT-mTOR sinyal yolunun ana genlerini içeren ayrı bir filtreleme yapılarak regülasyonu artan ve azalan genler tekrar değerlendirilmiştir. Bu şekilde, ilgili sinyal yolu ile bir noktada etkileşen genler yerine sinyal yolundaki ana genler üzerinden ekspresyon değişimleri yorumlanmıştır. Ekspresyon seviyeleri artan ilk üç gen, NRAS (logFC=2.1016), EIF4EBP1 (logFC=2.0076) ve PIK3R2 (logFC=1.5458) olarak belirlenmiştir. Ekspresyon seviyeleri azalan ilk üç gen ise AKT3 (logFC= −3.1511), PIK3R1 (logFC=−1.8194) ve TSC1 (logFC=−1.6794) olarak saptanmıştır (Tablo 3.1).

NRAS, kanserle ilişkileri nedeniyle en iyi çalışılmış Ras proteinlerini içeren Ras genlerinden biridir [193]. Litaretürde, 88 Çinli HGSOC hastası örneği ile yapılmış bir genomik analizde, Ras/Raf yoluna ait nokta mutasyonlarının %10,2 oranında olduğu gösterilmiştir. KRAS, NRAS ve BRAF mutasyonlarının tamamı TP53 mutasyonlarıyla birlikte bulunmuş olup mutasyonların birlikte görülmesi Ras/Raf yolunun HGSOC'de sık görülmeyen fakat tanımlanabilir bir moleküler alt grubu temsil ettiğini ortaya koymuştur [194].

Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E bağlanma proteini 1 (EIF4EBP1), mTOR sinyal yolu tarafından düzenlemektedir. Kanser hücrelerinde artmış EIF4EBP1 ekspresyonunun sıklıkla mTORC1 aracılı fosforilasyon ile birlikte seyrettiği ve bu durumun, hücre büyümesi ve tümör progresyonu ile ilişkili olduğu bildirilmektedir [195]. Literatürde over kanserinde, miR-125a ve miR-125b'nin down-regüle olduğu, bu miRNA'ların yeniden ekspresyonunun EIF4EBP1 düzeylerini azaltarak hücre invazyonu, migrasyonu ve canlılığını baskıladığı gösterilmiştir [196]. Ayrıca, p-4EBP1'in yüksek ekspresyonunun seröz histoloji, ileri evre ve daha kötü genel ve progresyonsuz sağkalım ile ilişkili olduğu, multivaryant analizlerde ise bağımsız bir prognostik belirteç olduğu ortaya konmuştur [197].

PIK3R2 (p85β), PI3K–AKT-mTOR sinyal yolunun onkogenik özellik gösteren düzenleyici alt birimidir. Literatürde over kanserinde özellikle AKT aktivasyonunun devamlılığı ile ilişkilendirilmiştir. PIK3R2, AKT fosforilasyonunu ve hücre proliferasyonunu artırmaktadır [198].

PI3K-AKT-mTOR odaklı genler arasından regülasyonu azalmış AKT3'ün bu sinyal yolunda aktif rol oynadığı; MYB/AKT3 ekseni aracılığıyla, over kanserinde tümör gelişimini, agresifliğini ve kemoterapi direncini tetiklediği bilinmektedir. Ancak, AKT sinyal yolunun aktivasyonu mRNA düzeylerindense fosforilasyon ve geri besleme mekanizmaları ile belirlenmekte olup, AKT izoformları bağlama göre farklı roller üstlenebilmektedir [199].

PIK3R1 (p85α), tümör baskılayıcı bir işleve sahiptir [198]. Literatürde, over kanserlerinde bu geninde mutasyon, delesyon ve özellikle mRNA düzeyinde belirgin azalış sık görülmekte olup bu değişiklikler yüksek dereceli ve ileri evre tümörlerle ilişkilidir. Düşük PIK3R1 ekspresyonu, PI3K-AKT-mTOR yolunun onkojenik yönde aktive olduğunu göstermekte ve platin bazlı tedavilere yanıtın azalmasıyla bağlantılı olduğu vurgulanmıştır [200].

PI3K-AKT-mTOR yolunun bilinen negatif düzenleyicilerinden biri olan TSC1, TSC2 ile bir kompleks oluşturmaktadır. AKT tarafından TSC2'nin fosforilasyonunun, kompleksin RHEB üzerindeki baskısını ortadan kaldırarak mTORC1'i aktive ettiği bilinmektedir [81]. HGSOC'da TSC1 down-regülasyonunun mTOR aktivasyonu, artmış proliferasyon ve baskılanmış otofaji ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [201].

Ağ tabanlı analizler sonucunda, HGSOC fenotipi ile en güçlü ilişkiyi gösteren modül olarak turkuaz modül belirlenmiş ve ağdaki çekirdek genler saptanmıştır. Genlerin kME ve logFC değerleri birlikte değerlendirildiğinde, yüksek dereceli seröz over kanserinde PI3K–AKT–mTOR yolunun hem aktivatör bileşenleri (NRAS, RHEB, PIK3R2) hem de negatif düzenleyici bileşenleri (TSC1, PIK3R1) yoluyla yeniden düzenlendiği görülmektedir (Tablo 3.2). Bu durum yolun kanser dokusundaki regülasyonunun düzensizleştiğini öne çıkarmaktadır. Sinyal yolunun regülasyonunu artıran aktivatörlerin ekspresyon artışı ve bununla birlikte negatif düzenleyicilerin baskılanması, bu yolun tümör fenotipini destekleyecek biçimde, koordineli bir şekilde yeniden programlandığını göstermektedir. Analizler sonucu elde edilen sonuçlar, PI3K-AKT-mTOR hedefli tedavi çalışmalarının önemini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızın ilk aşaması olan in silico analizlerin devamında, Pirfenidon ve metilhidrokinonun 3 boyutlu yapıları kullanılarak seçilen proteinlerle moleküler

docking analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan moleküler docking çalışmalarında Pirfenidon PI3K-AKT-mTOR sinyal yolundaki seçili hedef proteinlere karşı -6 ile -8 kcal/molaralığında bir etkileşim skoru göstermiştir (Tablo 3.3).

Metilhidrokinon için yapılan moleküler docking analizinde elde edilen skorlar -5 ile -6 kcal/mol bulunmuştur (Tablo 3.4). Literatürdeki moleküler docking çalışmalarında, bağlanma skorunun negatif değerinin artması, ligand ile hedef protein arasındaki afinitenin arttığı şeklinde yorumlanmaktadır. Docking skorunun -7.0 kcal/mol'ün altında olması orta ile güçlü bağlanma afinitesini, -9.0 kcal/mol'ün altında olması ise ligandın potansiyel inhibitör aktivite gösterebileceğini işaret etmektedir [202].

Docking çalışmaları, özellikle Pirfenidon'un PI3K-AKT-mTOR sinyal yolunu hedeflemeye yönelik yüksek bir potansiyeli olabileceğini göstermiştir. Metilhidrokinon, Pirfenidon'a göre daha az negatif etkileşim skorları vermiş olsa da, elde edilen skorlar, metilhidrokinonun da kayda değer etkileşimler gösterebileceğini ortaya koymuştur. Bu iki etken maddenin, yumurtalık kanseri tedavisinde ikili kombinasyon şeklinde daha etkin olacağı, birbirlerini sinerjistik olarak destekleyeceklerini öne çıkarmaktadır.

Çalışmamızın ikinci aşaması, MTT ile sitotoksisite analizi, sinerjik kombinasyon dozlarının belirlenmesi, koloni oluşum deneyi ve apoptoz testini içeren in vitro çalışmaları kapsamaktadır. Bu çalışmaların ilk basamağında, Pirfenidon, metilhidrokinon ve ikili kombinasyonun sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla MTT testleri gerçekleştirilmiştir. Pirfenidon'un IC50 değeri 1200 µM bulunmuş olup kolorektal kanser, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, triple-negatif meme kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde bu değer 2000-6000 µM aralığında bildirilmiştir [203-205]. Bu durum, HGSOC'un Pirfenidon'a diğer kanser türlerine nispeten daha duyarlı olabileceğini göstermektedir. Literatürde, sağlıklı insan kardiyak fibroblastı hücrelerinde Pirfenidon'un IC50 değeri 2032 µM olarak bildirilmiştir [206].

Sitotoksisite analizi için kullanılan MTT yöntemiyle metilhidrokinon için IC50 değeri 110 µM olarak hesaplanmıştır. Bu bulgu, metilhidrokinonun sinerjik bir kombinasyon ile toksik dozunun düşürülmesinin önemini vurgulamaktadır. Metilhidrokinonun Caov-3 hücre canlılığı üzerindeki etkisi 24 ve 48 saatlik

inkübasyon sürelerinde değerlendirilmiş ve tüm dozların kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır (Şekil 3.31). Sonuçlar, metilhidokinoun Caov-3 hücrelerinde belirgin ve güçlü bir doz–yanıt ilişkisi sergilediğini göstermektedir. Literatürde metilhidrokinonun çeşitli kanser hücre hatlarında 2–22 μM aralığında IC50 değerleri bildirilmiştir. Caov3'te daha yüksek dozlarda toksisite görülmesi, inkübasyon süresi, hücre yoğunluğu farklılığı, ölçüm yöntemleri gibi parametrelerin değişkenliğinden kaynaklanmaktadır [207, 208]. Yumurtalık kanseri hücre hatları genomik olarak heterojendir ve ilaç duyarlılığı açısından birbirine göre farklılık göstermektedir [209]. Metilhidrokinon IC50 değerinin diğer kanser türlerine kıyasla daha yüksek bulunması, yüksek dereceli seröz over kanserinin oldukça heterojen, kromozomal instabilitesi yüksek ve çok sayıda alt klona sahip doğasından kaynaklanmaktadır. Genetik mutasyon yükü, epigenetik varyasyonlar, klonal evrim (alt klonların ilaca dirençliliği) ve ROS toleransındaki farklılıklar nedeniyle aynı ajan farklı hücre hatlarında geniş bir duyarlılık aralığı göstermektedir [210]. Caov-3 hücre hattı, çoğu veri tabanında BRCA1/2-yabanıl tip ve HR açısından fonksiyonel (HR-proficient, HRP) olarak sınıflandırılsa da, son pan-kanser analizlerinde, bu hücre hattının BRCA mutasyonu olmamasına rağmen belirgin homolog rekombinasyon eksikliği (HRD) sinyalleri verdiği gösterilmiştir. Bununla birlikte DNA çift zincir kırıkları sonrasında RAD51 proteininin hasarlı bölgelerde mikroskobik odaklar oluşturma kapasitesinin korunmuş olması, Caov-3 hücre hattının, kendi içinde de tamamen HR-defektif olmadığını, bunun yerine "sınırda HR durumu (borderline HR)" sergileyebileceğini düşündürmektedir [211, 212]. DNA onarım yolaklarının sadece DNA tamiri değil, aynı zamanda kök hücre benzeri fenotip, ROS toleransı, invazyon ve ilaç direnci gibi kanser kök hücresi özelliklerini yönlendirdiği ve bu nedenle DNA onarım kapasitesi yüksek hücrelerin genotoksik/oksidatif ajanlara karşı daha dirençli olduğu gösterilmiştir [213]. Caov-3'ün heterojen doğasını, BRCA1/2 mutasyonu içermemesi ve bazı PARP inhibitörleri ile platin tabanlı ilaçlara düşük/orta seviyede duyarlı olması da bu profili doğrulamaktadır [214]. Bulgularımız, literatürde tanımlanan bu biyolojik çeşitlilik ile uyumluluk göstermektedir. Metilhidrokinon için sağlıklı hücre hattı IC50 değeri ise CCD-1072Sk fibroblast hücre hattında, 112.5 μM olarak literatürde yer almaktadır [207].

İkili kombinasyonun sinerjisini değerlendirmek için SynergyFinder ile yapılan analiz sonucunda, Şekil 3.32'deki ısı haritasında çoğunlukla yeşil bölgeler gözlemlenmiş olsa da hesaplanan genel sinerji skoru olan 4.5, aditif etkiyi veya düşük-orta dereceli sinerjiyi işaret etmektedir. Ancak Tablo 3.5'teki dozlar ve sinerji skorları dikkate alındığında altı farklı dozda skorlar, 10 ve üzeri değerleri göstermektedir. SynergyFinder'ın skorlama prensibine göre, kombinasyon sinerji skorunun 10'un üzerinde olması güçlü sinerjiyi, −10 ile +10 aralığında olması additif etkileşimi ve -10'un altında olması antagonistik etkileşimi ifade etmektedir [171]. 10 ve üzeri sinerji skoruna sahip bu dozlar, Pirfenidon ve metilhidrokinon ikili kombinasyonunun belirli dozlarda daha yüksek oranda bir sinerji gösterdiğini ortaya koymaktadır. Diğer deney dizaynlarında kullanılan 300 µM Pirfenidon ve 35 µM metilhidrokinon dozu, en yüksek sinerji skorunu işaret eden dozlar olarak belirlenmiştir. Chou ve Talahay tarafından bildirildiği üzere CI değeri için 0.3-0.7 aralığı sinerjiyi işaret etmektedir. 300 µM Pirfenidon ile 35 µM metilhidrokinon dozu için hesaplanan değer (CI=0,57) bu aralıkta yer almakta ve ikili kombinasyonun sinerjik etkisini doğrulamaktadır [215].

Yüksek dereceli seröz over kanseri hücre hatlarının fenotipik karakterizasyonuna odaklanan, hücre çoğalması ve klonojenik potansiyel arasındaki heterojenliği ortaya koyan bir çalışmada, Caov-3 hücreleri için koloni oluşum deneyi, 1.000 hücre ekilerek ve 22 gün boyunca inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan sekiz farklı hücre hattı (Caov-3, COV362, Kuramochi, OVCAR4, OVCAR5, OVCAR8, OVSAHO ve SNU119) arasından Caov-3 hücre hattı, koloni oluşturma kapasitesi en düşük olan hücre hatlarından biri olarak değerlendirilmiştir [216].

Çalışmamızda yapılan koloni oluşturma deneyi sonucunda, kontrole kıyasla koloni miktarlarında en anlamlı değişimler metilhidrokinon dozları ve ikili kombinasyonda görülmüş olup Pirfenidon'un 300 µM dozu, diğer dozlara oranla daha az anlamlı bulunmuştur. Literatürde Pirfenidon uygulanarak koloni oluşum testi yapılan bir çalışmada, HepG2 (hepatosit karsinomu hücre hattı) hücreleri kullanılmış, kontrol gruplarında ortalama koloni sayısı yaklaşık 170 iken, 600 µM Pirfenidon dozu ile bu sayı %30–40 oranında düştüğü bildirilmiştir [217]. Pirfenidon'un 300 µM dozu, diğer dozlara oranla daha az anlamlı bulunmasına rağmen, koloni sayısında yaklaşık %70'lik bir azalmaya sebep olmuştur (Şekil

3.34). Bu bulgu, Pirfenidon'un HGSOC hücrelerinde uzun vadeli proliferasyonu güçlü şekilde baskıladığını ve farklı kanser tiplerinde de etkili olduğunu göstermektedir. Kombinasyon dozunun, hücrelerin koloni oluşturma potansiyeline yönelik belirgin inhibisyon etkisi, ikili kombinasyonun sinerjik etkisini ve HGSOC üzerindeki etkinliğini destekleyici nitelikte bulunmuştur.

Pirfenidon, metilhidrokinon ve ikili kombinasyonun apoptoza ve apoptozun erken ile geç evreleri üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla Annexin V-FITC ile PI boyama gerçekleştirilmiş, hücreler konfokal mikroskopi ile görüntülenmiştir. Doz grupları, metilhidrokinonun IC50 dozu ve kombinasyonda kullanılan dozu; Pirfenidon'un IC50 dozu ve kombinasyonda kullanılan dozu ile ikili kombinasyon dozu şeklinde kurgulanmıştır. Hücre yüzeyinde yalnızca Annexin V sinyaliyle gözlemlenen fosfatidilserinin dış yüzeye taşınması (Annexin +/PI−), dozların erken apoptozu aktive ettiğini desteklemektedir. Buna ek olarak, hem Annexin V hem de PI ile boyanan hücrelerin (Annexin +/PI+) varlığı, ilerlemiş apoptotik evreyi ve membran bütünlüğünün kaybını işaret ederek hücre ölümünün ileri aşamalara taşındığını ortaya koymaktadır. Bu bağlamda elde edilen görüntüler, literatürdeki erken ve geç apoptoz tanımlamaları ile uyum sağlamaktadır. Metilhidrokinon, Pirfenidon ve ikili kombinasyon dozlarının yüksek dereceli seröz over kanserinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Şekil 3.35). Kontrol grubunda PI sinyaline rastlanmamış, metilhidrokinon ve Pirfenidon'un kombinasyonda kullanılan dozlarında ise diğer gruplara kıyasla düşük PI ve Annexin sinyali gözlemlenmiştir. Düzenlenmiş hücre ölümü (regulated cell death, RCD), birbirine bağlı çok sayıda ölüm yolağının koordineli etkileşimini kapsadığından, kanser hücreleri tek bir ajanın tek başına tetiklediği sinyallere sınırlı yanıt verebilmektedir [218]. Bu nedenle 35 μM metilhidrokinon ve 300 μM Pirfenidon gibi düşük tekli dozların kombinasyon halinde uygulanmasıyla apoptozun artmış olması, kombinasyonun dozdaki azalışa rağmen apoptozu etkin biçimde tetikleyebildiğini göstermektedir (Şekil 3.36).

Elde edilen bulgular, Pirfenidon ile metilhidrokinonun, tekli ajanlar ve ikili kombinasyon şeklinde, yüksek dereceli over kanserinde sitotoksik etkiler gösterdiğini, koloni oluşturma potansiyelini inhibe ettiğini ve apoptozu teşvik ettiğini ortaya koymuştur. Bu iki ajanın ikili kombinasyon olarak uygulanmasıyla benzer hücresel etkilerin çok daha düşük dozlarda elde edilebilmesi,

kombinasyonun terapötik açıdan önemli bir avantaj sunduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, Pirfenidon ve metilhidrokinon ikili kombinasyonunun yumurtalık kanseri tedavisine yönelik potansiyel bir sinerjik yaklaşım olabileceğini desteklemektedir.

İleri çalışmalarda, metilhidrokinon, Pirfenidon ve ikili kombinasyonun, gen ve protein düzeyindeki etkilerinin değerlendirilmesi, farmakokinetik özelliklerinin analiz edilmesi ile ajanların tekli ve ikili kombinasyonlar hâlinde klinik uygulanabilirlik açısından incelenmesi hedeflenmektedir.

KAYNAKÇA

[1] V. Tavares, I. S. Marques, I. G. d. Melo, J. Assis, D. Pereira, and R. Medeiros, "Paradigm Shift: A Comprehensive Review of Ovarian Cancer Management in an Era of Advancements," *International Journal of Molecular Sciences,* vol. 25, p. 1845, 2024.

[2] H. Sung, J. Ferlay, and R. L. Siegel, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA Cancer J Clin,* vol. 71, pp. 209-249, May 2021.

[3] R. L. Siegel, K. D. Miller, N. S. Wagle, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2023," *CA: a cancer journal for clinicians,* vol. 73, 2023.

[4] R. L. Siegel, A. N. Giaquinto, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2024," *CA: a cancer journal for clinicians,* vol. 74, 2024.

[5] C. J. Cabasag, P. J. Fagan, J. Ferlay, J. Vignat, M. Laversanne, L. Liu, *et al.,* "Ovarian cancer today and tomorrow: A global assessment by world region and Human Development Index using GLOBOCAN 2020," *International Journal of Cancer,* vol. 151, pp. 1535-1541, 2022.

[6] S. National Cancer Institute. (2024). *SEER stat fact sheets: ovarian cancer*. Available: http://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html

[7] W. Wei, N. Li, Y. Sun, B. Li, L. Xu, and L. Wu, "Clinical outcome and prognostic factors of patients with early-stage epithelial ovarian cancer," *Oncotarget,* vol. 8, pp. 23862-23870, Apr 4 2017.

[8] L. Falzone, G. Scandurra, V. Lombardo, G. Gattuso, A. Lavoro, A. B. Distefano, *et al.*, "A multidisciplinary approach remains the best strategy to improve and strengthen the management of ovarian cancer (Review)," *Int J Oncol,* vol. 59, p. 53, 2021/07/01 2021.

[9] O. D. Ogundipe, O. Olajubutu, and S. K. Adesina, "Targeted drug conjugate systems for ovarian cancer chemotherapy," *Biomed Pharmacother,* vol. 165, p. 115151, Sep 2023.

[10] I. Romero and R. C. Bast, Jr., "Minireview: Human Ovarian Cancer: Biology, Current Management, and Paths to Personalizing Therapy," *Endocrinology,* vol. 153, pp. 1593-1602, 2012.

[11] S. Kim, Y. Han, S. I. Kim, H.-S. Kim, S. J. Kim, and Y. S. Song, "Tumor evolution and chemoresistance in ovarian cancer," *npj Precision Oncology,* vol. 2, p. 20, 2018/09/17 2018.

[12] U. A. Matulonis, A. K. Sood, L. Fallowfield, B. E. Howitt, J. Sehouli, and B. Y. Karlan, "Ovarian cancer," *Nature Reviews Disease Primers,* vol. 2, p. 16061, 2016/08/25 2016.

[13] A. Chandra, C. Pius, M. Nabeel, M. Nair, J. K. Vishwanatha, S. Ahmad, *et al.*, "Ovarian cancer: Current status and strategies for improving therapeutic outcomes," *Cancer Medicine,* vol. 8, pp. 7018-7031, 2019.

[14] J. M. Liberto, S.-Y. Chen, I.-M. Shih, T.-H. Wang, T.-L. Wang, and T. R. Pisanic, "Current and Emerging Methods for Ovarian Cancer Screening and Diagnostics: A Comprehensive Review," *Cancers,* vol. 14, p. 2885, 2022.

[15] R. Zhang, M. K. Y. Siu, H. Y. S. Ngan, and K. K. L. Chan, "Molecular Biomarkers for the Early Detection of Ovarian Cancer," *International Journal of Molecular Sciences,* vol. 23, p. 12041, 2022.

[16] G. A. Atallah, N. H. Abd. Aziz, C. K. Teik, M. N. Shafiee, and N. C. Kampan, "New Predictive Biomarkers for Ovarian Cancer," *Diagnostics,* vol. 11, p. 465, 2021.

[17] L. A. Torre, B. Trabert, C. E. DeSantis, K. D. Miller, G. Samimi, C. D. Runowicz, *et al.*, "Ovarian cancer statistics, 2018," *CA: A Cancer Journal for Clinicians,* vol. 68, pp. 284-296, 2018.

[18] J. S. Berek, M. Renz, S. Kehoe, L. Kumar, and M. Friedlander, "Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: 2021 update," *International Journal of Gynecology & Obstetrics,* vol. 155, pp. 61-85, 2021.

[19] J. S. Berek, S. T. Kehoe, L. Kumar, and M. Friedlander, "Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum," *International Journal of Gynecology & Obstetrics,* vol. 143, pp. 59-78, 2018.

[20] P. Charkhchi, C. Cybulski, J. Gronwald, F. O. Wong, S. A. Narod, and M. R. Akbari, "CA125 and Ovarian Cancer: A Comprehensive Review," *Cancers,* vol. 12, p. 3730, 2020.

[21] J. Kim, E. Y. Park, O. Kim, J. M. Schilder, D. M. Coffey, C.-H. Cho, *et al.*, "Cell Origins of High-Grade Serous Ovarian Cancer," *Cancers,* vol. 10, p. 433, 2018.

[22] M.-A. Lisio, L. Fu, A. Goyeneche, Z.-h. Gao, and C. Telleria, "High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints," *International Journal of Molecular Sciences,* vol. 20, p. 952, 2019.

[23] N. G. Nwani, L. E. Sima, W. Nieves-Neira, and D. Matei, "Targeting the Microenvironment in High Grade Serous Ovarian Cancer," *Cancers,* vol. 10, p. 266, 2018.

[24] T. Talbot, H. Lu, and E. O. Aboagye, "Amplified therapeutic targets in high-grade serous ovarian carcinoma – a review of the literature with quantitative appraisal," *Cancer Gene Therapy,* vol. 30, pp. 955-963, 2023/07/01 2023.

[25] E. Azzalini, G. Stanta, V. Canzonieri, and S. Bonin, "Overview of Tumor Heterogeneity in High-Grade Serous Ovarian Cancers," *International Journal of Molecular Sciences,* vol. 24, p. 15077, 2023.

[26] D. Bell, A. Berchuck, M. Birrer, J. Chien, D. W. Cramer, F. Dao, *et al.*, "Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma," *Nature,* vol. 474, pp. 609-615, 2011/06/01 2011.

[27] U. Testa, E. Petrucci, L. Pasquini, G. Castelli, and E. Pelosi, "Ovarian Cancers: Genetic Abnormalities, Tumor Heterogeneity and Progression, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells," *Medicines,* vol. 5, p. 16, 2018.

[28] E. N. Kotnik, M. M. Mullen, N. C. Spies, T. Li, M. Inkman, J. Zhang, *et al.*, "Genetic characterization of primary and metastatic high-grade serous ovarian cancer tumors reveals distinct features associated with survival," *Communications Biology,* vol. 6, p. 688, 2023/07/03 2023.

[29] G. Wang, H. Yang, Y. Wang, and J. Qin, "Ovarian cancer targeted therapy: current landscape and future challenges," *Frontiers in Oncology,* vol. Volume 15 - 2025, 2025-May-06 2025.

[30] A. E. Kayl and C. A. Meyers, "Side-effects of chemotherapy and quality of life in ovarian and breast cancer patients," *Curr Opin Obstet Gynecol,* vol. 18, pp. 24-8, Feb 2006.

[31] A. C. Veneziani, E. Gonzalez-Ochoa, H. Alqaisi, A. Madariaga, G. Bhat, M. Rouzbahman, *et al.*, "Heterogeneity and treatment landscape of ovarian carcinoma," *Nature Reviews Clinical Oncology,* vol. 20, pp. 820-842, 2023/12/01 2023.

[32] L. Yang, H.-J. Xie, Y.-Y. Li, X. Wang, X.-X. Liu, and J. Mai, "Molecular mechanisms of platinum-based chemotherapy resistance in ovarian cancer (Review)," *Oncol Rep,* vol. 47, p. 82, 2022/04/01 2022.

[33] C. Núñez, J. L. Capelo, G. Igrejas, A. Alfonso, L. M. Botana, and C. Lodeiro, "An overview of the effective combination therapies for the treatment of breast cancer," *Biomaterials,* vol. 97, pp. 34-50, 2016/08/01/ 2016.

[34] J. Garcia, H. I. Hurwitz, A. B. Sandler, D. Miles, R. L. Coleman, R. Deurloo, *et al.*, "Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook," *Cancer Treatment Reviews,* vol. 86, 2020.

[35] W. P. McGuire and M. Markman, "Primary ovarian cancer chemotherapy: current standards of care," *British Journal of Cancer,* vol. 89, pp. S3-S8, 2003/12/01 2003.

[36] V. Garg and A. M. Oza, "Treatment of Ovarian Cancer Beyond PARP Inhibition: Current and Future Options," *Drugs,* vol. 83, pp. 1365-1385, 2023/10/01 2023.

[37] C. L. Mao, K. M. Seow, and K. H. Chen, "The Utilization of Bevacizumab in Patients with Advanced Ovarian Cancer: A Systematic Review of the Mechanisms and Effects," vol. 23, Jun 21 2022.

[38] A. Ghoneum, S. Almousa, B. Warren, A. Y. Abdulfattah, J. Shu, H. Abouelfadl, *et al.*, "Exploring the clinical value of tumor microenvironment in platinum-resistant ovarian cancer," *Seminars in Cancer Biology,* vol. 77, pp. 83-98, 2021/12/01/ 2021.

[39] X. Fu, P. Li, Q. Zhou, R. He, G. Wang, S. Zhu, *et al.*, "Mechanism of PARP inhibitor resistance and potential overcoming strategies," *Genes & Diseases,* vol. 11, pp. 306-320, 2024/01/01/ 2024.

[40] S. Kumar, S. Acharya, M. Karthikeyan, P. Biswas, and S. Kumari, "Limitations and potential of immunotherapy in ovarian cancer," *Frontiers in Immunology*, vol. 14, 2024-January-09 2024.

[41] R. Baghban, L. Roshangar, R. Jahanban-Esfahlan, K. Seidi, A. Ebrahimi-Kalan, M. Jaymand, *et al.*, "Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance," *Cell Communication and Signaling*, vol. 18, p. 59, 2020/04/07 2020.

[42] N. M. Anderson and M. C. Simon, "The tumor microenvironment," *Curr Biol*, vol. 30, pp. R921-r925, Aug 17 2020.

[43] K. E. de Visser and J. A. Joyce, "The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth," *Cancer Cell*, vol. 41, pp. 374-403, 2023/03/13/ 2023.

[44] E. Henke, R. Nandigama, and S. Ergün, "Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy," *Front Mol Biosci*, vol. 6, p. 160, 2019.

[45] B. Arneth, "Tumor Microenvironment," *Medicina*, vol. 56, p. 15, 2020.

[46] B. Deng, Z. Zhao, W. Kong, C. Han, X. Shen, and C. Zhou, "Biological role of matrix stiffness in tumor growth and treatment," *Journal of Translational Medicine*, vol. 20, p. 540, 2022/11/22 2022.

[47] S. Brassart-Pasco, S. Brézillon, B. Brassart, L. Ramont, J. B. Oudart, and J. C. Monboisse, "Tumor Microenvironment: Extracellular Matrix Alterations Influence Tumor Progression," *Front Oncol*, vol. 10, p. 397, 2020.

[48] X. Chu, W. Tian, J. Ning, G. Xiao, Y. Zhou, Z. Wang, *et al.*, "Cancer stem cells: advances in knowledge and implications for cancer therapy," *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 9, p. 170, 2024/07/05 2024.

[49] Z. Yu, T. G. Pestell, M. P. Lisanti, and R. G. Pestell, "Cancer stem cells," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 44, pp. 2144-51, Dec 2012.

[50] P. Carmeliet and R. K. Jain, "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis," *Nature*, vol. 473, pp. 298-307, 2011/05/01 2011.

[51] J. Wang, Y. He, F. Hu, C. Hu, Y. Sun, K. Yang, *et al.* (2024, Metabolic Reprogramming of Immune Cells in the Tumor Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences 25(22).*

[52] D. Hanahan and Robert A. Weinberg, "Hallmarks of Cancer: The Next Generation," *Cell*, vol. 144, pp. 646-674, 2011.

[53] X. Lei, Y. Lei, J.-K. Li, W.-X. Du, R.-G. Li, J. Yang, *et al.*, "Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy," *Cancer Letters*, vol. 470, pp. 126-133, 2020/02/01/ 2020.

[54] B. Garlisi, S. Lauks, C. Aitken, L. M. Ogilvie, C. Lockington, D. Petrik, *et al.*, "The Complex Tumor Microenvironment in Ovarian Cancer: Therapeutic Challenges and Opportunities," *Current Oncology*, vol. 31, pp. 3826-3844, 2024.

[55] J. Chen, L. Yang, Y. Ma, and Y. Zhang, "Recent advances in understanding the immune microenvironment in ovarian cancer," *Frontiers in Immunology*, vol. Volume 15 - 2024, 2024-June-05 2024.

[56] M. Nunes, C. Bartosch, M. H. Abreu, A. Richardson, R. Almeida, and S. Ricardo, "Deciphering the Molecular Mechanisms behind Drug Resistance in Ovarian Cancer to Unlock Efficient Treatment Options," *Cells*, vol. 13, p. 786, 2024.

[57] R. Fu, R. Hu, W. Li, X. Lv, H. Zhao, and F. Li, "Unveiling drug resistance pathways in high-grade serous ovarian cancer(HGSOC): recent advances and future perspectives," *Frontiers in Immunology*, vol. Volume 16 - 2025, 2025-April-30 2025.

[58] M. Ortiz, E. Wabel, K. Mitchell, and S. Horibata, "Mechanisms of chemotherapy resistance in ovarian cancer," *Cancer Drug Resist*, vol. 5, pp. 304-316, 2022.

[59] L. Wang, X. Wang, X. Zhu, L. Zhong, Q. Jiang, Y. Wang, *et al.*, "Drug resistance in ovarian cancer: from mechanism to clinical trial," *Molecular Cancer*, vol. 23, p. 66, 2024/03/28 2024.

[60] S. Frezzini and S. Lonardi, "Spotlight on New Hallmarks of Drug-Resistance towards Personalized Care for Epithelial Ovarian Cancer," *Cells*, vol. 13, p. 611, 2024.

[61] C. Abildgaard, L. M. Do Canto, K. D. Steffensen, and S. R. Rogatto, "Long Non-coding RNAs Involved in Resistance to Chemotherapy in Ovarian Cancer," *Front Oncol*, vol. 9, p. 1549, 2019.

[62] C. Lliberos, G. Richardson, and A. Papa, "Oncogenic Pathways and Targeted Therapies in Ovarian Cancer," *Biomolecules*, vol. 14, p. 585, 2024.

[63] M. C. Milanesio and S. Giordano, "Clinical Implications of DNA Repair Defects in High-Grade Serous Ovarian Carcinomas," vol. 12, May 21 2020.

[64] R. D. Morgan, X. Wang, B. M. Barnes, L. Spurgeon, A. Carrot, D. Netto, *et al.*, "Germline BRCA1/2 status and chemotherapy response score in high-grade serous ovarian cancer," *British Journal of Cancer*, vol. 131, pp. 1919-1927, 2024/12/01 2024.

[65] M. D. Stewart, D. Merino Vega, R. C. Arend, J. F. Baden, O. Barbash, N. Beaubier, *et al.*, "Homologous Recombination Deficiency: Concepts, Definitions, and Assays," vol. 27, pp. 167-174, Mar 11 2022.

[66] D. P. Lane, "p53, guardian of the genome," *Nature*, vol. 358, 1992.

[67] X. Chen, T. Zhang, W. Su, Z. Dou, D. Zhao, X. Jin, *et al.*, "Mutant p53 in cancer: from molecular mechanism to therapeutic modulation," *Cell Death & Disease*, vol. 13, p. 974, 2022/11/18 2022.

[68] A. Saleh and R. Perets, "Mutated p53 in HGSC-From a Common Mutation to a Target for Therapy," *Cancers (Basel)*, vol. 13, Jul 10 2021.

[69] A. Mangogna, G. Munari, F. Pepe, E. Maffii, P. Giampaolino, G. Ricci, *et al.*, "Homologous Recombination Deficiency in Ovarian Cancer: from the

Biological Rationale to Current Diagnostic Approaches," *Journal of Personalized Medicine*, vol. 13, p. 284, 2023.

[70] A. Madariaga, S. Lheureux, and A. M. Oza, "Tailoring Ovarian Cancer Treatment: Implications of BRCA1/2 Mutations," *Cancers (Basel)*, vol. 11, Mar 23 2019.

[71] R. D. Morgan, G. J. Burghel, N. Flaum, H. Schlecht, A. R. Clamp, J. Hasan, *et al.*, "Extended panel testing in ovarian cancer reveals BRIP1 as the third most important predisposition gene," *Genet Med*, vol. 26, p. 101230, Oct 2024.

[72] M. A. Morgan and T. S. Lawrence, "Molecular Pathways: Overcoming Radiation Resistance by Targeting DNA Damage Response Pathways," *Clinical Cancer Research*, vol. 21, pp. 2898-2904, 2015.

[73] L. M. Thorpe, H. Yuzugullu, and J. J. Zhao, "PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting," *Nature Reviews Cancer*, vol. 15, pp. 7-24, 2015/01/01 2015.

[74] P. Sun and L.-h. Meng, "Emerging roles of class I PI3K inhibitors in modulating tumor microenvironment and immunity," *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 41, pp. 1395-1402, 2020/11/01 2020.

[75] A. Ghoneum and N. Said, "PI3K-AKT-mTOR and NFκB Pathways in Ovarian Cancer: Implications for Targeted Therapeutics," *Cancers*, vol. 11, p. 949, 2019.

[76] Y. He, M. M. Sun, G. G. Zhang, J. Yang, K. S. Chen, W. W. Xu, *et al.*, "Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy," *Signal Transduction and Targeted Therapy 2021 6:1*, vol. 6, pp. 1-17, 2021/12// 2021.

[77] Y.-H. Wu, Y.-F. Huang, C.-C. Chen, C.-Y. Huang, and C.-Y. Chou, "Comparing PI3K/Akt Inhibitors Used in Ovarian Cancer Treatment," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 11, 2020-March-03 2020.

[78] W. Wiese, J. Barczuk, O. Racinska, N. Siwecka, W. Rozpedek-Kaminska, A. Slupianek, *et al.*, "PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in Blood Malignancies—New Therapeutic Possibilities," *Cancers*, vol. 15, p. 5297, 2023.

[79] B. A. Hemmings and D. F. Restuccia, "PI3K-PKB/Akt pathway," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 4, p. a011189, Sep 1 2012.

[80] T.-T. Huang, E. J. Lampert, C. Coots, and J.-M. Lee, "Targeting the PI3K pathway and DNA damage response as a therapeutic strategy in ovarian cancer," *Cancer Treatment Reviews*, vol. 86, p. 102021, 2020/06/01/ 2020.

[81] N. Rinne, E. L. Christie, A. Ardasheva, C. H. Kwok, N. Demchenko, C. Low, *et al.*, "Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in epithelial ovarian cancer, therapeutic treatment options for platinum-resistant ovarian cancer," *Cancer Drug Resistance*, vol. 4, pp. 573-95, 2021.

[82] J. R. Molina and A. A. Adjei, "The Ras/Raf/MAPK Pathway," *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 1, pp. 7-9, 2006.

[83] L. Dard, N. Bellance, D. Lacombe, and R. Rossignol, "RAS signalling in energy metabolism and rare human diseases," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1859, pp. 845-867, 2018/09/01/ 2018.

[84] L. Therachiyil, A. Anand, A. Azmi, A. Bhat, H. M. Korashy, and S. Uddin, "Role of RAS signaling in ovarian cancer," vol. 11, p. 1253, 2022.

[85] H. K. Matthews, C. Bertoli, and R. A. M. De Bruin, "Cell cycle control in cancer," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 23, pp. 74-88, 2022/01// 2022.

[86] J. M. Suski, M. Braun, V. Strmiska, and P. Sicinski, "Targeting cell-cycle machinery in cancer," *Cancer Cell*, vol. 39, pp. 759-778, Jun 14 2021.

[87] M. D. Reece, C. Song, S. C. Hancock, S. Pereira Ribeiro, D. A. Kulpa, and C. Gavegnano, "Repurposing BCL-2 and Jak 1/2 inhibitors: Cure and treatment of HIV-1 and other viral infections," *Frontiers in Immunology*, vol. Volume 13 - 2022, 2022-December-09 2022.

[88] S. Cavalu, A. M. Abdelhamid, S. Saber, E. A. Elmorsy, R. S. Hamad, M. A. Abdel-Reheim, *et al.*, "Cell cycle machinery in oncology: A comprehensive review of therapeutic targets," *The FASEB Journal*, vol. 38, p. e23734, 2024.

[89] K. Collins, T. Jacks, and N. P. Pavletich, "The cell cycle and cancer," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, pp. 2776-2778, 1997.

[90] K. Balakrishnan, Y. Chen, and J. Dong, "Amplified Cell Cycle Genes Identified in High-Grade Serous Ovarian Cancer," *Cancers*, vol. 16, p. 2783, 2024.

[91] Z. Deng, T. Fan, C. Xiao, H. Tian, Y. Zheng, C. Li, *et al.*, "TGF-β signaling in health, disease and therapeutics," *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 9, p. 61, 2024/03/22 2024.

[92] Y. Zhang, P. B. Alexander, and X. F. Wang, "TGF-β Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 9, Apr 3 2017.

[93] P.-Y. Chen, L. Qin, and M. Simons, "TGFβ signaling pathways in human health and disease," *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. Volume 10 - 2023, 2023-June-01 2023.

[94] R. Derynck and Y. E. Zhang, "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-β family signalling," *Nature*, vol. 425, pp. 577-584, 2003/10/01 2003.

[95] Y. E. Zhang, "Non-Smad pathways in TGF-β signaling," *Cell Research*, vol. 19, pp. 128-139, 2009/01/01 2009.

[96] J. Xu, S. Lamouille, and R. Derynck, "TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition," *Cell Res*, vol. 19, pp. 156-72, Feb 2009.

[97] Y. E. Zhang, "Non-Smad Signaling Pathways of the TGF-β Family," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 9, Feb 1 2017.

[98] S. Liu, S. Chen, and J. Zeng, "TGF-β signaling: A complex role in tumorigenesis (Review)," *Mol Med Rep,* vol. 17, pp. 699-704, 2018/01/01 2018.

[99] H. Zou, C. Shan, L. Ma, J. Liu, N. Yang, and J. Zhao, "Polarity and epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells in proliferative vitreoretinopathy," *PeerJ,* vol. 8, p. e10136, 2020.

[100] M. Deng, R. Yang, J. Jiang, J. Zhang, J. He, and J. Miao, "The silent spread: exploring diverse metastatic pathways in high-grade serous ovarian cancer," *Frontiers in Medicine,* vol. Volume 12 - 2025, 2025-March-05 2025.

[101] F. Suarez Rodriguez, S. Sanlidag, and C. Sahlgren, "Mechanical regulation of the Notch signaling pathway," *Current Opinion in Cell Biology,* vol. 85, p. 102244, 2023/12/01/ 2023.

[102] R. Kopan, "Notch signaling," *Cold Spring Harb Perspect Biol,* vol. 4, Oct 1 2012.

[103] J. D. Green, V. Tollemar, M. Dougherty, Z. Yan, L. Yin, J. Ye, *et al.*, "Multifaceted signaling regulators of chondrogenesis: Implications in cartilage regeneration and tissue engineering," *Genes & Diseases,* vol. 2, pp. 307-327, 2015/12/01/ 2015.

[104] E. R. Andersson and U. Lendahl, "Therapeutic modulation of Notch signalling — are we there yet?," *Nature Reviews Drug Discovery,* vol. 13, pp. 357-378, 2014/05/01 2014.

[105] N. Sachan, V. Sharma, M. Mutsuddi, and A. Mukherjee, "Notch signalling: multifaceted role in development and disease," *The FEBS Journal,* vol. 291, pp. 3030-3059, 2024.

[106] B. Zhou, W. Lin, Y. Long, Y. Yang, H. Zhang, K. Wu, *et al.*, "Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics," *Signal Transduction and Targeted Therapy,* vol. 7, p. 95, 2022/03/24 2022.

[107] J. A. Perez-Fidalgo, B. Ortega, S. Simon, E. P. Samartzis, and S. Boussios, "NOTCH signalling in ovarian cancer angiogenesis," *Ann Transl Med,* vol. 8, p. 1705, Dec 2020.

[108] T. Liu, Y. Li, X. Wang, X. Yang, Y. Fu, Y. Zheng, *et al.*, "The role of interferons in ovarian cancer progression: Hinderer or promoter?," *Frontiers in Immunology,* vol. Volume 13 - 2022, 2022-December-21 2022.

[109] Z. R. C. Marks, N. K. Campbell, N. E. Mangan, C. J. Vandenberg, L. J. Gearing, A. Y. Matthews, *et al.*, "Interferon-ε is a tumour suppressor and restricts ovarian cancer," *Nature,* vol. 620, pp. 1063-1070, 2023/08/01 2023.

[110] H. Huldani, S. Abdul-Jabbar Ali, F. Al-dolaimy, A. Hjazi, N. Denis Andreevich, K. H. Oudaha, *et al.*, "The potential role of interleukins and interferons in ovarian cancer," *Cytokine,* vol. 171, p. 156379, 2023/11/01/ 2023.

[111] H. I. Roessler, N. V. A. M. Knoers, M. M. van Haelst, and G. van Haaften, "Drug Repurposing for Rare Diseases," *Trends in Pharmacological Sciences,* vol. 42, pp. 255-267, 2021.

[112] T. T. Ashburn and K. B. Thor, "Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs," *Nat Rev Drug Discov,* vol. 3, pp. 673-83, Aug 2004.

[113] S. Pushpakom, F. Iorio, P. A. Eyers, K. J. Escott, S. Hopper, A. Wells, *et al.*, "Drug repurposing: progress, challenges and recommendations," *Nature Reviews Drug Discovery,* vol. 18, pp. 41-58, 2019/01/01 2019.

[114] T. I. Oprea and J. Mestres, "Drug repurposing: far beyond new targets for old drugs," *Aaps j,* vol. 14, pp. 759-63, Dec 2012.

[115] A. H. Al Khzem, M. S. Gomaa, M. S. Alturki, N. Tawfeeq, M. Sarafroz, S. M. Alonaizi, *et al.*, "Drug Repurposing for Cancer Treatment: A Comprehensive Review," *International Journal of Molecular Sciences,* vol. 25, p. 12441, 2024.

[116] J. Dinić, T. Efferth, A. T. García-Sosa, J. Grahovac, J. M. Padrón, I. Pajeva, *et al.*, "Repurposing old drugs to fight multidrug resistant cancers," *Drug Resistance Updates,* vol. 52, p. 100713, 2020/09/01/ 2020.

[117] S. Singhal, J. Mehta, R. Desikan, D. Ayers, P. Roberson, P. Eddlemon, *et al.*, "Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma," *N Engl J Med,* vol. 341, pp. 1565-71, Nov 18 1999.

[118] N. J. Carter, "Pirfenidone," *Drugs,* vol. 71, pp. 1721-1732, 2011/09/01 2011.

[119] Genentech. (2024, July 6, 2025). Esbriet® (pirfenidone) dosing and administration. Available: https://www.esbriethcp.com/dosing-and-administration/dosing.html

[120] I. National Center for Biotechnology. (2025). *PubChem Compound Summary for CID 40632, Pirfenidone*. Available: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pirfenidone

[121] T. Cai, J. Jiang, W. Yao, Y. Hu, S. Kong, Q. Fan, *et al.*, "Pirfenidone inhibits stromal collagen deposition and improves intra-tumoral delivery and antitumor efficacy of Pegylated liposomal doxorubicin," *Biomedicine & Pharmacotherapy,* vol. 157, p. 114015, 2023/01/01/ 2023.

[122] I. Burghardt, F. Tritschler, C. A. Opitz, B. Frank, M. Weller, and W. Wick, "Pirfenidone inhibits TGF-β expression in malignant glioma cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications,* vol. 354, pp. 542-547, 2007/03/09/ 2007.

[123] S. Zhang, Y. Wang, D. Luo, Z. Cheng, Q. Zeng, G. Wang, *et al.*, "Pirfenidone inhibits TGF-β1-induced metabolic reprogramming during epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer," *Journal of Cellular and Molecular Medicine,* vol. 28, p. e18059, 2024.

[124] K. Takai, A. Le, V. M. Weaver, and Z. Werb, "Targeting the cancer-associated fibroblasts as a treatment in triple-negative breast cancer," *Oncotarget,* vol. 7, pp. 82889-82901, Dec 13 2016.

[125] N. Rastegar-Pouyani, M. H. Abdolvahab, M. A. Farzin, H. Zare, P. Kesharwani, and A. Sahebkar, "Targeting cancer-associated fibroblasts with pirfenidone: A novel approach for cancer therapy," *Tissue and Cell*, vol. 91, p. 102624, 2024/12/01/ 2024.

[126] Q. Zhang, X. Hou, B. J. Evans, J. J. Weroha, and W. A. Cliby, "Abstract 961: Inhibitors of fibrosis and TGF-beta delay tumor xenograft growth and reduce ascites in ovarian cancer models," *Cancer Research*, vol. 77, pp. 961-961, 2017.

[127] L. Pinzi, N. Bisi, and G. Rastelli, "How drug repurposing can advance drug discovery: challenges and opportunities," *Frontiers in Drug Discovery*, vol. 4, 2024-August-20 2024.

[128] P. Chunarkar-Patil and M. Kaleem, "Anticancer Drug Discovery Based on Natural Products: From Computational Approaches to Clinical Studies," vol. 12, Jan 16 2024.

[129] A. Naeem, P. Hu, M. Yang, J. Zhang, Y. Liu, W. Zhu, *et al.*, "Natural Products as Anticancer Agents: Current Status and Future Perspectives," *Molecules*, vol. 27, p. 8367, 2022.

[130] H. National Research Council Committee on the Ocean's Role in Human, *From Monsoons to Microbes: Understanding the Ocean's Role in Human Health*. Washington (DC): National Academies Press (US), 1999.

[131] V. Stonik, "Marine natural products: A way to new drugs," *Acta Naturae (англоязычная версия)*, vol. 1, pp. 15-25, 2009.

[132] W. Zuo and H. F. Kwok, "Development of Marine-Derived Compounds for Cancer Therapy," vol. 19, Jun 15 2021.

[133] I. National Center for Biotechnology. (2025). *PubChem Compound Summary for CID 7253, Methylhydroquinone*. Available: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Methyl-1_4-hydroquinone

[134] N.-H. Kim, H.-I. Jung, W.-S. Choi, B.-W. Son, Y.-B. Seo, J. S. Choi, *et al.*, "Toluhydroquinone, the secondary metabolite of marine algae symbiotic microorganism, inhibits angiogenesis in HUVECs," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 70, pp. 129-139, 2015/03/01/ 2015.

[135] M. García-Caballero, M. Marí-Beffa, L. Cañedo, M. Á. Medina, and A. R. Quesada, "Toluquinol, a marine fungus metabolite, is a new angiosuppresor that interferes the Akt pathway," *Biochemical Pharmacology*, vol. 85, pp. 1727-1740, 2013/06/15/ 2013.

[136] J. L. Bolton, M. A. Trush, T. M. Penning, G. Dryhurst, and T. J. Monks, "Role of quinones in toxicology," *Chem Res Toxicol*, vol. 13, pp. 135-60, Mar 2000.

[137] Z. Sroka and W. Cisowski, "Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids," *Food Chem Toxicol*, vol. 41, pp. 753-8, Jun 2003.

[138] M. C. Michel and D. Staskin, "Study Designs for Evaluation of Combination Treatment: Focus on Individual Patient Benefit," *Biomedicines*, vol. 10, Jan 26 2022.

[139] R. Bayat Mokhtari, T. S. Homayouni, N. Baluch, E. Morgatskaya, S. Kumar, B. Das, *et al.*, "Combination therapy in combating cancer," *Oncotarget*, vol. 8, pp. 38022-38043, Jun 6 2017.

[140] A. Rejhová, A. Opattová, A. Čumová, D. Slíva, and P. Vodička, "Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 144, pp. 582-594, 2018/01/20/ 2018.

[141] F. Li, C. Zhao, and L. Wang, "Molecular-targeted agents combination therapy for cancer: Developments and potentials," *International Journal of Cancer*, vol. 134, pp. 1257-1269, 2014.

[142] J.-M. Lee, L. Minasian, and E. C. Kohn, "New strategies in ovarian cancer treatment," *Cancer*, vol. 125, pp. 4623-4629, 2019.

[143] B. Y. Karklan, J. Jones, D. J. Slamon, and L. D. Lagasse, "Glucocorticoids Stabilize HER-2/neu Messenger RNA in Human Epithelial Ovarian Carcinoma Cells," *Gynecologic Oncology*, vol. 53, pp. 70-77, 1994.

[144] F. M. Giorgi, C. Ceraolo, and D. Mercatelli, "The R Language: An Engine for Bioinformatics and Data Science," *Life*, vol. 12, p. 648, 2022.

[145] C. W. Law, Y. Chen, W. Shi, and G. K. Smyth, "voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts," *Genome biology*, vol. 15, pp. 1-17, 2014.

[146] G. O. Consortium, "The gene ontology resource: 20 years and still GOing strong," *Nucleic acids research*, vol. 47, pp. D330-D338, 2019.

[147] M. Kanehisa and S. Goto, "KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes," *Nucleic acids research*, vol. 28, pp. 27-30, 2000.

[148] A. Fabregat, K. Sidiropoulos, P. Garapati, M. Gillespie, K. Hausmann, R. Haw, *et al.*, "The Reactome pathway Knowledgebase," *Nucleic Acids Research*, vol. 44, pp. D481-D487, 2015.

[149] C. Wilks, S. C. Zheng, F. Y. Chen, R. Charles, B. Solomon, J. P. Ling, *et al.*, "recount3: summaries and queries for large-scale RNA-seq expression and splicing," *Genome Biology*, vol. 22, p. 323, 2021/11/29 2021.

[150] J. Lonsdale, J. Thomas, M. Salvatore, R. Phillips, E. Lo, S. Shad, *et al.*, "The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project," *Nature Genetics*, vol. 45, pp. 580-585, 2013/06/01 2013.

[151] K. Chang, C. J. Creighton, C. Davis, L. Donehower, J. Drummond, D. Wheeler, *et al.*, "The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project," *Nature Genetics*, vol. 45, pp. 1113-1120, 2013/10/01 2013.

[152] H. Wickham, "Programming with ggplot2," in *Ggplot2: elegant graphics for data analysis*, ed: Springer, 2016, pp. 241-253.

[153] A. Kassambara, "ggpubr:'ggplot2'based publication ready plots. R package version 0.4. 0," ed, 2020.

[154] R. Kolde, "Pheatmap: pretty heatmaps," *R package version*, vol. 1, p. 726, 2019.

[155] S. Zhao, Y. Guo, Q. Sheng, and Y. Shyr, "Advanced heat map and clustering analysis using heatmap3," *BioMed research international*, vol. 2014, p. 986048, 2014.

[156] G. Yu, L.-G. Wang, Y. Han, and Q.-Y. He, "clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters," *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, vol. 16, pp. 284-287, 2012.

[157] G. Wu and R. Haw, "Functional Interaction Network Construction and Analysis for Disease Discovery," *Methods Mol Biol*, vol. 1558, pp. 235-253, 2017.

[158] P. Shannon, A. Markiel, O. Ozier, N. S. Baliga, J. T. Wang, D. Ramage, *et al.*, "Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks," *Genome research*, vol. 13, pp. 2498-2504, 2003.

[159] P. Langfelder and S. Horvath, "WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis," *BMC Bioinformatics*, vol. 9, p. 559, Dec 29 2008.

[160] E. J. Hanan, M.-G. Braun, R. A. Heald, C. MacLeod, C. Chan, S. Clausen, *et al.*, "Discovery of GDC-0077 (Inavolisib), a Highly Selective Inhibitor and Degrader of Mutant PI3Kα," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 65, pp. 16589-16621, 2022/12/22 2022.

[161] W.-I. Wu, W. C. Voegtli, H. L. Sturgis, F. P. Dizon, G. P. A. Vigers, and B. J. Brandhuber, "Crystal Structure of Human AKT1 with an Allosteric Inhibitor Reveals a New Mode of Kinase Inhibition," *PLOS ONE*, vol. 5, p. e12913, 2010.

[162] D. A. Heerding, N. Rhodes, J. D. Leber, T. J. Clark, R. M. Keenan, L. V. Lafrance, *et al.*, "Identification of 4-(2-(4-Amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-1-ethyl-7-{[(3S)-3-piperidinylmethyl]oxy}-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-4-yl)-2-methyl-3-butyn-2-ol (GSK690693), a Novel Inhibitor of AKT Kinase," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 51, pp. 5663-5679, 2008/09/25 2008.

[163] H. Yang, D. G. Rudge, J. D. Koos, B. Vaidialingam, H. J. Yang, and N. P. Pavletich, "mTOR kinase structure, mechanism and regulation," *Nature*, vol. 497, pp. 217-223, 2013/05/01 2013.

[164] D. KOMANDER, G. S. KULAR, J. BAIN, M. ELLIOTT, D. R. ALESSI, and D. M. F. van AALTEN, "Structural basis for UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) specificity and PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1) inhibition," *Biochemical Journal*, vol. 375, pp. 255-262, 2003.

[165] S. K. Burley, H. M. Berman, G. J. Kleywegt, J. L. Markley, H. Nakamura, and S. Velankar, "Protein Data Bank (PDB): The Single Global Macromolecular Structure Archive," in *Protein Crystallography: Methods and Protocols*, A. Wlodawer, Z. Dauter, and M. Jaskolski, Eds., ed New York, NY: Springer New York, 2017, pp. 627-641.

[166] N. M. O'Boyle, M. Banck, C. A. James, C. Morley, T. Vandermeersch, and G. R. Hutchison, "Open Babel: An open chemical toolbox," *Journal of Cheminformatics*, vol. 3, p. 33, 2011/10/07 2011.

[167] G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, *et al.*, "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility," *J Comput Chem*, vol. 30, pp. 2785-91, Dec 2009.

[168] W. Tian, C. Chen, X. Lei, J. Zhao, and J. Liang, "CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins," *Nucleic Acids Research*, vol. 46, pp. W363-W367, 2018.

[169] B. DepMap, "DepMap 24Q4 Public," ed: Figshare+, 2024.

[170] T. Riss, R. Moravec, A. Niles, S. Duellman, H. Benink, T. Worzella, *et al.*, "Cell viability assays—assay guidance manual—NCBI bookshelf," *Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences*, 2016.

[171] A. Ianevski, A. K. Giri, and T. Aittokallio, "SynergyFinder 3.0: an interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples," *Nucleic acids research*, vol. 50, pp. W739-W743, 2022.

[172] J. Foucquier and M. Guedj, "Analysis of drug combinations: current methodological landscape," *Pharmacology Research & Perspectives*, vol. 3, p. e00149, 2015.

[173] T. C. Chou, "Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method," *Cancer Research*, vol. 70, pp. 440-446, 2010/1// 2010.

[174] N. A. P. Franken, H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, and C. van Bree, "Clonogenic assay of cells in vitro," *Nature Protocols 2006 1:5*, vol. 1, pp. 2315-2319, 2006/12// 2006.

[175] C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis," *Nature Methods*, vol. 9, pp. 671-675, 2012/07/01 2012.

[176] D. Wlodkowic, W. Telford, J. Skommer, and Z. Darzynkiewicz, "Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death," *Methods Cell Biol*, vol. 103, pp. 55-98, 2011.

[177] I. Vermes, C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V," *J Immunol Methods*, vol. 184, pp. 39-51, Jul 17 1995.

[178] T. F. Fuller, A. Ghazalpour, J. E. Aten, T. A. Drake, A. J. Lusis, and S. Horvath, "Weighted gene coexpression network analysis strategies applied to mouse weight," *Mamm Genome*, vol. 18, pp. 463-72, Jul 2007.

[179] J. Chien, R. Kuang, C. Landen, and V. Shridhar, "Platinum-Sensitive Recurrence in Ovarian Cancer: The Role of Tumor Microenvironment," *Frontiers in Oncology*, vol. 3, 2013-September-24 2013.

[180] J. Langedijk, A. K. Mantel-Teeuwisse, D. S. Slijkerman, and M. H. Schutjens, "Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature," *Drug Discov Today*, vol. 20, pp. 1027-34, Aug 2015.

[181] M. Nunes, M. Henriques Abreu, C. Bartosch, and S. Ricardo, "Recycling the Purpose of Old Drugs to Treat Ovarian Cancer," vol. 21, Oct 20 2020.

[182] H. Li, L. Wang, M. Shao, M. Ren, W. Zhang, J. Zhou, *et al.*, "Pirfenidone Attenuates the EMT Process and the Secretion of VEGF in TGF-β2-Induced ARPE-19 Cells via Inhibiting the Activation of the NF-κB/Snail Signaling Pathway," *Journal of Ophthalmology,* vol. 2023, p. 4798071, 2023.

[183] M. K. Ediriweera, K. H. Tennekoon, and S. R. Samarakoon, "Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance," *Semin Cancer Biol,* vol. 59, pp. 147-160, Dec 2019.

[184] S. E. Nunnery and I. A. Mayer, "Management of toxicity to isoform α-specific PI3K inhibitors," *Annals of Oncology,* vol. 30, pp. x21-x26, 2019/12/01/ 2019.

[185] A. Bellahcene, M.-P. Merville, and V. Castronovo, "Expression of bone sialoprotein, a bone matrix protein, in human breast cancer," *Cancer research,* vol. 54, pp. 2823-2826, 1994.

[186] B. Pan, X. Cheng, W. Tan, R. Liu, X. Wu, J. He, *et al.*, "Pan-cancer analysis shows that IBSP is a potential prognostic and immunotherapeutic biomarker for multiple cancer types including osteosarcoma," *Front Immunol,* vol. 14, p. 1188256, 2023.

[187] Y. Wang, H. Zhang, Y. Zhan, Z. Li, S. Li, and S. Guo, "Comprehensive in silico analysis of prognostic and immune infiltrates for FGFs in human ovarian cancer," *Journal of Ovarian Research,* vol. 17, p. 197, 2024/10/09 2024.

[188] L. Hu and L. Cong, "Fibroblast growth factor 19 is correlated with an unfavorable prognosis and promotes progression by activating fibroblast growth factor receptor 4 in advanced-stage serous ovarian cancer," *Oncol Rep,* vol. 34, pp. 2683-2691, 2015/11/01 2015.

[189] Y. Cicirò and A. Sala, "MYB oncoproteins: emerging players and potential therapeutic targets in human cancer," *Oncogenesis,* vol. 10, p. 19, 2021/02/26 2021.

[190] K. S. Vikramdeo, O. Miree, S. Anand, A. Sharma, S. K. Srivastava, S. Singh, *et al.*, "MYB/AKT3 axis is a key driver of ovarian cancer growth, aggressiveness, and chemoresistance," *J Ovarian Res,* vol. 18, p. 179, Aug 11 2025.

[191] K. R. Kalli, O. I. Falowo, L. K. Bale, M. A. Zschunke, P. C. Roche, and C. A. Conover, "Functional Insulin Receptors on Human Epithelial Ovarian Carcinoma Cells: Implications for IGF-II Mitogenic Signaling," *Endocrinology,* vol. 143, pp. 3259-3267, 2002.

[192] L. Sedman, B. Padhukasahasram, P. Kelgo, and M. Laan, "Complex signatures of locus-specific selective pressures and gene conversion on Human Growth Hormone/Chorionic Somatomammotropin genes," *Human Mutation,* vol. 29, pp. 1181-1193, 2008.

[193] J. Cicenas, L. Tamosaitis, K. Kvederaviciute, R. Tarvydas, G. Staniute, K. Kalyan, *et al.*, "KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma," *Medical Oncology,* vol. 34, p. 26, 2017/01/10 2017.

[194] F. Zhong, T. Zhu, and X. Pan, "Comprehensive genomic profiling of high-grade serous ovarian carcinoma from Chinese patients identifies co-occurring mutations in the Ras/Raf pathway with TP53," vol. 8, pp. 3928-3935, Jul 2019.

[195] E. D. Nelson, M. G. Benesch, R. Wu, T. Ishikawa, and K. Takabe, "High EIF4EBP1 expression reflects mTOR pathway activity and cancer cell proliferation and is a biomarker for poor breast cancer prognosis," *Am J Cancer Res,* vol. 14, pp. 227-242, 2024.

[196] M. Lee, E. J. Kim, and M. J. Jeon, "MicroRNAs 125a and 125b inhibit ovarian cancer cells through post-transcriptional inactivation of EIF4EBP1," *Oncotarget,* vol. 7, 2015.

[197] M. L. Alabdullah, D. A. Ahmad, P. Moseley, S. Madhusudan, S. Chan, and E. Rakha, "The mTOR downstream regulator (p-4EBP1) is a novel independent prognostic marker in ovarian cancer," *J Obstet Gynaecol,* vol. 39, pp. 522-528, May 2019.

[198] Y. Zhang, X. Xiong, Q. Zhu, J. Zhang, S. Chen, and Y. Wang, "FER-mediated phosphorylation and PIK3R2 recruitment on IRS4 promotes AKT activation and tumorigenesis in ovarian cancer cells," vol. 11, May 12 2022.

[199] B. D. Manning and A. Toker, "AKT/PKB Signaling: Navigating the Network," *Cell,* vol. 169, pp. 381-405, Apr 20 2017.

[200] I. K. Rzepecka, A. Tysarowski, B. Konopka, A. Dansonka-Mieszkowska, and J. Kupryjanczyk, "High Frequency of PIK3R1 Alterations in Ovarian Cancers: Clinicopathological and Molecular Associations," vol. 17, Jan 15 2025.

[201] Y. Wang, X. Zhang, W. Tang, Z. Lin, L. Xu, R. Dong, *et al.*, "miR-130a upregulates mTOR pathway by targeting TSC1 and is transactivated by NF-κB in high-grade serous ovarian carcinoma," *Cell Death & Differentiation,* vol. 24, pp. 2089-2100, 2017/12/01 2017.

[202] Q. Xue, X. Liu, P. Russell, J. Li, W. Pan, J. Fu, *et al.*, "Evaluation of the binding performance of flavonoids to estrogen receptor alpha by Autodock, Autodock Vina and Surflex-Dock," *Ecotoxicology and Environmental Safety,* vol. 233, p. 113323, 2022/03/15/ 2022.

[203] H. Jamialahmadi, S. E. Nazari, H. TanzadehPanah, E. Saburi, F. Asgharzadeh, F. Khojasteh-Leylakoohi, *et al.*, "Targeting transforming growth factor beta (TGF-β) using Pirfenidone, a potential repurposing therapeutic strategy in colorectal cancer," *Scientific Reports,* vol. 13, p. 14357, 2023/09/01 2023.

[204] V. Parvathaneni, N. S. Kulkarni, S. K. Shukla, P. T. Farrales, N. K. Kunda, A. Muth, *et al.*, "Systematic Development and Optimization of Inhalable Pirfenidone Liposomes for Non-Small Cell Lung Cancer Treatment," *Pharmaceutics,* vol. 12, p. 206, 2020.

[205] D. Luo, X. Zeng, S. Zhang, D. Li, Z. Cheng, Y. Wang, *et al.*, "Pirfenidone suppressed triple-negative breast cancer metastasis by inhibiting the activity of the TGF-β/SMAD pathway," *J Cell Mol Med,* vol. 27, pp. 456-469, Feb 2023.

[206] F. E. U. Meyer, G. L. Santos, T. P. Doan, A. N. DeGrave, B. Bues, and S. Lutz, "Pirfenidone affects human cardiac fibroblast proliferation and cell cycle activity in 2D cultures and engineered connective tissues," *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol,* vol. 396, pp. 1687-1699, Aug 2023.

[207] M. Kucak, U. Demir, and M. H. Muslumanoglu, "Investigation of the cytotoxic, anti-proliferative and anti-angiogenic effects of Toluhydroquinone on Caco-2 cell line: Effects of Toluhydroquinone on Caco-2 cell line," *Cellular and Molecular Biology*, vol. 68, pp. 8-12, 08/31 2022.

[208] O. R. Johnson-Ajinwo, I. Ullah, H. Mbye, A. Richardson, P. Horrocks, and W.-W. Li, "The synthesis and evaluation of thymoquinone analogues as anti-ovarian cancer and antimalarial agents," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,* vol. 28, pp. 1219-1222, 2018/04/15/ 2018.

[209] S. Domcke, R. Sinha, D. A. Levine, C. Sander, and N. Schultz, "Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles," *Nature Communications,* vol. 4, p. 2126, 2013/07/09 2013.

[210] C. M. Roberts, C. Cardenas, and R. Tedja, "The Role of Intra-Tumoral Heterogeneity and Its Clinical Relevance in Epithelial Ovarian Cancer Recurrence and Metastasis," *Cancers,* vol. 11, p. 1083, 2019.

[211] A. E. Dodson and S. Shenker, "Pan-Cancer Analysis of Homologous Recombination Deficiency in Cell Lines," vol. 4, pp. 3084-3098, Dec 1 2024.

[212] N. Stiegeler, D. W. Garsed, G. Au-Yeung, D. D. L. Bowtell, V. Heinzelmann-Schwarz, and T. A. Zwimpfer, "Homologous recombination proficient subtypes of high-grade serous ovarian cancer: treatment options for a poor prognosis group," *Front Oncol,* vol. 14, p. 1387281, 2024.

[213] J. Nathansen, F. Meyer, L. Müller, M. Schmitz, K. Borgmann, and A. Dubrovska, "Beyond the Double-Strand Breaks: The Role of DNA Repair Proteins in Cancer Stem-Cell Regulation," *Cancers,* vol. 13, p. 4818, 2021.

[214] J. Xu, Y. Shen, C. Wang, S. Tang, S. Hong, W. Lu, *et al.*, "Arsenic compound sensitizes homologous recombination proficient ovarian cancer to PARP inhibitors," *Cell Death Discovery,* vol. 7, p. 259, 2021/09/22 2021.

[215] T. C. Chou, "Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies," *Pharmacol Rev,* vol. 58, pp. 621-81, Sep 2006.

[216] J. Haley, S. Tomar, N. Pulliam, S. Xiong, S. M. Perkins, A. R. Karpf, *et al.*, "Functional characterization of a panel of high-grade serous ovarian cancer cell lines as representative experimental models of the disease," *Oncotarget,* vol. 7, 2016.

[217] W. J. Zou, Z. Huang, T. P. Jiang, Y. P. Shen, A. S. Zhao, S. Zhou, *et al.*, "Pirfenidone Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma Cells by Inhibiting the Wnt/β-Catenin Signaling Pathway," *Med Sci Monit,* vol. 23, pp. 6107-6113, Dec 25 2017.

[218] K. L. Ooi, T. S. T. Muhammad, and S. F. Sulaiman, "Growth arrest and induction of apoptotic and non-apoptotic programmed cell death by, Physalis minima L. chloroform extract in human ovarian carcinoma Caov-3 cells," *Journal of Ethnopharmacology,* vol. 128, pp. 92-99, 2010/03/02/ 2010.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. A. Eker, B. Türkoğlu ve B. Mansuroğlu, "Evaluation Of The Anticancer Effects Of Active Compounds In Ovarian Cancer In Relation To The PI3K-AKT-mTOR Signalling Pathway" *VI. International Congress Of New Horizons In Science And Social Sciences*, pp 70-78, 2025.

2. A. Eker, B. Türkoğlu ve B. Mansuroğlu, "Evaluation Of Active Ingredient With Therapeutic Potential In Ovarian Cancer Types" *VIII. International Halich Congress on Multidisciplinary Scientific Research*, pp 1000-1005, 2024.

Projeler

1. Potansiyel Antikanser Ajanların Yumurtalık Kanserinde PI3K-AKT-mTOR Yolağı İlişkili Biyolojik Değerlendirilmesi, Dr. Burcu Türkoğlu, FBA-2025-6882, Mayıs 2025-Mayıs 2026, Araştırmacı.