



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



AMİTRİPTİLİN'İN HL60 AKUT MİYELOİD LÖSEMİ HÜCRE SERİSİNDE HÜCRE PROLİFERASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Sümeyye UĞUR AYDIN

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Aslı KOÇ**

**ANKARA
2023**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AMİTRİPTİLİN'İN HL60 AKUT MİYELOİD LÖSEMİ
HÜCRE SERİSİNDE HÜCRE PROLİFERASYONU
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Sümeyye UĞUR AYDIN

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Aslı KOÇ**

**ANKARA
2023**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Amitriptilin’in HL60 akut miyeloid lösemi hücre serisinde hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Sümeyye Uğur Aydın

Tarih:

İmza:

KABUL ve ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalında

Sümeyye Uğur Aydın tarafından hazırlanan

“Amitriptilin’in HL60 akut miyeloid lösemi hücre serisinde hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21.07.2023

Doç.Dr. Arzu Zeynep KARABAY
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Aslı KOÇ
Ankara Üniversitesi
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Yalda HEKMATSHOAR
Altınbaş Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Apoptoz	2
1.2. Lösemi	2
1.2.1.ALL (Akut Lenfoblastik Lösemi)	3
1.2.2.AML (Akut Miyeloid Lösemi)	3
1.2.3. KML (Kronik Miyeloid Lösemi)	5
1.2.4. KLL/SLL (Kronik Lenfositik Lösemi/Küçük Lenfositik Lenfoma)	6
1.3.Depresyon	6
1.3.1.Depresyon Tedavisi	7
1.3.2.Depresyon-Kanser İlişkisi	8
1.3.3. Antidepresanlar	8
1.3.3.1. Monoamin Oksidaz İnhibitörleri (MAOI)	10
1.3.3.2. SSRI (Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörleri) ve SNRI (Serotonin/norepinefrin Geri Alım İnhibitörleri)	10
1.3.3.3. TCA (Trisiklik Antidepresanlar)	11
1.3.3.3.1. Amitriptilin	11
2. GEREÇ ve YÖNTEM	14
2.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler	14
2.2. Kullanılan Cihazlar	14
2.3. Hücre Kültürü	14
2.3.1. Hücre Sayımı	15
2.4. Hücre Canlılığının Belirlenmesi	15
2.5. Kaspaz 3 Aktivite Tayini	16
2.6. Protein Miktar Tayini	16
2.7. Mitokondriyel Kütlenin Belirlenmesi	17
2.8. Apoptozun Belirlenmesi	17
2.9. İstatistiksel Analiz	17
3. BULGULAR	18
3.1. Amitriptilinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri	18
3.2. Amitriptilinin Kaspaz 3 aktivitesi üzerindeki etkileri	20
3.3. Amitriptilinin HL60 hücrelerinin apoptozu üzerindeki etkileri	21
3.4. Amitriptilinin HL60 hücrelerinde mitokondriyel kütle üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi	22

4. TARTIŞMA	24
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	28
ÖZET	29
SUMMARY	30
KAYNAKLAR	31
ÖZGEÇMİŞ	37



ÖNSÖZ

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı bünyesinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, amitriptilinin HL60 akut miyeloid hücre serisinde, hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmayı yapmamızdaki amaç, trisiklik antidepresan olan amitriptilinin akut miyeloid lösemi hücrelerindeki etkisini tespit etmek ve literatüre katkı sağlamaktır.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesindeki destek ve katkılarından dolayı değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Aslı Koç'a teşekkürlerimi sunarım.

Her daim yanımda hissettiğim annem, babam ve kardeşim Zeynep'e...

SİMGELER VE KISALTMALAR

3H-H	3H-Histamin
4-MH	4- metilhistamin
5-HT	5-hidroksitriptamin, Serotonin
ABL1	Abelson protoonkogeni
AET	Duygusal olaylar teorisi
ALL	Akut lenfoblastik lösemi
AML	Akut miyeloid lösemi
ARA-C	Sitarabin
B16f10	Melanomlu hücre hattı
Bcl-2	B hücreli lenfoma 2
BCR	Kırılma bölgesi
BDNF	Beyin kaynaklı nötrofik faktör
BM	Kemik iliği
cAMP	Siklik adenosin monofosfat
CEBPA	CCAAT arttırıcı bağlayıcı protein A mutasyonlar
c-myc	Myc geni
CoQ	Coenzyme Q
CoQ10	Coenzyme (Q 10)
DMBA	7,12-Dimetilbenz[a]antrasen
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DSM-5	Ruhsal Bozuklukların Teşhis ve İstatistik El Kitabı
Erk	Hücre Dışı Sinyal Düzenlenmiş Kinaz
FDA	ABD Gıda ve İlaç İdaresi
FLT3	Ffms benzeri tirozin kinaz 3
FLT3-ITD	Flt-3 anormallikleri, internal tandem duplikasyonlar
G-CSF	Granülosit koloni uyarıcı faktör
GM-CSF	Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
HCT	Hematokrit

HepG	İnsan hepatoma hücre dizilerinin
HGF	Hepatosit Büyüme faktörü
HL60	İnsan lösemi hücreleri
HLA	İnsan lökosit antijeni
IC50	Engelleyici konsantrasyon
IDH1	İzositrat dehidrojenaz 1
IDH2	İzositrat dehidrojenaz 2
IDH	İzositrat dehidrojenaz
IL-1 β	İnterlökin-1 beta
KML	Kronik Myeloid Lösemi
KLL	Kronik Lenfositik Lösemi
LC3-II	Hafif zincir 3- II
MAOI	Monoamin oksidaz inhibitörleri
Mcl-1	İndüklenmiş miyeloid lösemi hücre farklılaşması proteini
MDB	Major depresif bozukluk
μ M	Mikromolar
MM	Multiple Miyelom
mRNA	Mesajcı ribonükleik asid
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
MYC	Miyelositomatozis
NaSSA	Noradrenerjik ve spesifik serotonerjik antidepresan
NDGI	Normalleştirilmiş fark yeşil indeksi
NMDA	N-metil-D-aspartatik asit
NMP1	Nükleofosmin 1
NRI	Noradrenalin geri alım inhibitörü
NSAID	Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar
P53	Tümör protein 53
PARP1	Poli [ADP riboz] polimeraz 1
PGE2	Prostaglandin E2
RAS	Retiküler aktivasyon sistemi
ROS	Z Reaktif oksijen türleri

SAGI	Serotonin Gerialım İnhibitörleri
SLL	Küçük lenfositik lenfoma
SNRI	Serotonin-norepinefrin geri alım inhibitörleri
SP2/0	Murin hibridoma hücre hattı
SSRI	Seçici serotonin geri alım inhibitörleri
T3	Triiyodotironin
TCA	Trisiklik antidepresanlar
TNF	Tümör nekroz faktörü
TP53	Tümör baskılayıcı gen tümör proteini p53
WT-1	Wilms tümörü -1 proteini
XIAP	X'e bağlı apoptoz inhibitörü
$\Delta\Psi_m$	Mitokondriyal membran potansiyeli

ŞEKİLLER

Şekil 3.1. Amitriptilinin, 24 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, hücre canlılığı üzerindeki etkileri	19
Şekil 3.2. Amitriptilinin, 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, hücre canlılığı üzerindeki etkileri	20
Şekil 3.3. Amitriptilinin, 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, hücre canlılığı üzerindeki etkileri	21
Şekil 3. 4. Amitriptilinin kaspaz 3 aktivitesi üzerindeki etkisi	22
Şekil 3. 5. Amitriptilinin HL60 hücrelerinin apoptozu üzerindeki etkileri	23
Şekil 3.6. Amitriptilinin HL60 hücrelerinde mitokondriyel kütle üzerindeki etkileri	24

1. GİRİŞ

Her kanser, kendine has özellikleri sahiptir. Fakat, tümörleri üreten başlıca nedenler benzerlik göstermektedir (Weinberg, 1996). Ölüm sebepleri içinde, kanser, Amerika Birleşik Devletleri'nde, ikinci olarak yer almaktadır (Siegel ve ark., 2022).

Tümör hücrelerinin hem morfolojik hem de aynı zamanda, nükleer yapılarında (nükleer boyutlarında, şekillerinde, nükleollerin sayılarında ve kromatin dokusundaki değişiklikler gibi) farklılıklar bulunmaktadır. Bir tümör tipi ve evresi için bu değişiklikler çok belirleyicidir ve kanser teşhisinde kullanılmaktadırlar (Zink ve ark., 2004).

Kanserin önemli özellikleri arasında; hücre proliferasyonunda artış, hücre ölümüne karşı direnç, artan hücre hareketliliği ve invazivliği veya anjiyogenezin indüklenmesi sayılabilir (Runel ve ark., 2021). Tüm tümör çeşitlerinde, hücre döngüsü mekanizmasının aktivitesinde anormalliklere rastlanır ve bu anormallikler, tümör oluşumunun itici gücünü oluşturur. Yapılan en son araştırmalar, hücre döngüsü proteinlerinin, hücre bölünmesini teşvik etmenin yanı sıra, çok çeşitli hücresel fonksiyonları düzenlediğini belirtmektedir (Suski ve ark., 2021).

Kanser tedavisi, teknolojinin gelişmesiyle büyük değişiklikler yaşamış olup, kanserleşme sürecine neden olabilecek biyolojik süreçlerin tanımlanması ile ilgili gelişmeler yaşanmıştır. Tedavideki gelişmeler, tedavi sonuçlarının devamlı bir şekilde araştırılması ve değerlendirilmesi ve bunların onkoloji pratiğine dahil edilmesiyle sağlanmaktadır. Kanser; cerrahi, kemoterapi, iyonlaştırıcı radyasyon tedavisi, hormon tedavisi, hedefe yönelik tedavi gibi tedavi seçenekleriyle tedavi edilebilmektedir (Miller ve ark., 1981; Wang ve ark., 2018).

1.1.Apoptoz

Apoptotik yollardaki dengesizlik karsinogenezdeki temel süreçlerden biridir (Silva ve ark., 2022). Apoptoz, genotoksik stres gibi hücre içinden gelen sinyallerle veya ligandların hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanması gibi dışsal sinyallerle tetiklenebilen, programlanmış hücre ölümüdür (Pistritto ve ark., 2016). Apoptoz işleyişinin, çoğunlukla farklı morfolojik özellikler ve enerji kaynaklı biyokimyasal mekanizmalar ile ayırıcı özelliği ortaya konulmaktadır (Elmore, 2007).

Bilinen apoptoz kuramına dayalı olarak kullanılan ilaçlar ve terapötik önlemler uzun süredir bulunmaktadır. Küçük moleküllü apoptoz indükleyiciler, habis hücreleri yok etmekte ve böylece kanser gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Apoptozun, düzenleyici etkenlerle beraber klasik içsel ve dışsal sinyal yolları bulunmaktadır (Xu ve ark., 2019). İçsel yolak, Bcl-2 ailesi üyeleriyle düzenlenmektedir. Dışsal yolak ise, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör üst ailesinin üyeleri olan ölüm reseptörlerince kontrol edilmektedir (Roberts ve ark., 2022). Bcl-2 ailesi proteinleri, apoptozun düzenlenmesinde görev alırlar ve hücre ölümünün inhibitörlerini ve indükleyicilerini içerirler, içsel yolak olarak bilinen süreci düzenlerler (Hardwick ve Soane, 2013). Bir endoproteaz ailesi olan kaspazlar, inflamasyonun kontrolünde ve hücre ölümünün kontrolünde yer alırlar (McIlwain ve ark., 2013).

1.2. Lösemi

Kan ve kemik iliğinin, yaşamı olumsuz etkileyen, kötü huylu hastalığı lösemi olarak tanımlanabilir. Adölesan ve genç erişkin bireylerde, akut lösemiler en yaygın olanıdır. Kronik miyeloid lösemi daha nadir görülmektedir (Juliusson ve Hough, 2016). Çok sayıda spesifik tanı bulunur. Ancak en sık görülen ve üzerinde çalışılan lösemi türleri olarak; akut miyeloid lösemi (AML), akut lenfositik lösemi (ALL),

kronik lenfositik lösemi (KLL) ve kronik miyeloid lösemi (KML) sayılabilir (Whiteley ve ark., 2021).

1.2.1.ALL (Akut Lenfoblastik Lösemi)

Akut lenfoblastik lösemi, periferik kanda, kemik iliğinde ve dokuda, kötü huylu, olgunlaşmamış lenfatik patlamaların artması ve birikmesiyle meydana gelir. Ayrıca tedavi edilmeyen ALL (Akut Lenfoblastik Lösemi), birkaç ay içinde ölümlerle sonuçlanabilmektedir (Medinger ve ark., 2019). Çocukluk çağında en çok görülen malignite ALL'dir (Ward ve ark., 2014). ALL, çocukluk döneminin semptom ve bulguları, disfonksiyonel hematopoezin (anemi, ateş, anormal beyaz küre sayısı, trombositopeni) ve lösemi hücrelerinin klonal proliferasyonu ve infiltrasyonunun (lenfadenopati, hepatosplenomegali ve kemik ağrısı) etkilerini yansıtmaktadır. Fakat kesin bir tanı koymak için ilik aspirasyonu gerekmektedir (Chan, 2002).

Akut lenfoblastik lösemi, heterojen lenfoid neoplazm ailesidir ve B ve T lenfoid öncül hücrelerden köken alır. ALL teşhisi ise, kanser olmayan öncül hücrelerden, neoplazmlardan farklılaşmaya uğrayabilen yapısal, immünojenotipik ve genetik faktörlere bağlı olabilmektedir (Onciu, 2009).

1.2.2.AML (Akut Miyeloid Lösemi)

Akut miyeloid lösemi (AML), hematopoezin baskılanmasına neden olan, olgunlaşmamış progenitor hücrelerin birikimi ile karakterize edilen bir klonal hematopoietik kök hücre malignitesidir (Dohner ve ark., 2015). AML, miyeloid soyunun, kök hücre progenitorlerinin malignitesi şeklinde de ifade edilebilir (Pelcovits ve Niroula, 2020).

AML'nin patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasıyla, hedefe yönelik tedavi gelişmiştir. İmatinibin, kronik miyeloid lösemi (KML) ve diğer hastalıkların tedavisinde patofizyolojik olarak, ilaç tarafından inhibe edilen bir tirozin kinazın yapıcı aktivasyonuna yönelik başarısı, AML'de benzer bir şekilde etkili ajanların aranmasına sebebiyet vermiştir (Stone ve ark., 2004).

Akut miyeloid lösemide olan ve zayıf prognoz ile ilişkili olan FLT3 (Ffms benzeri tirozin kinaz 3) mutasyonları en sık görülen genetik bozukluklardır (Zhao ve ark., 2022). FLT3 inhibitörleri, birinci nesil multi-kinaz inhibitörleri (midostaurin, sorafenib, lestaurtinib gibi) ve yeni nesil inhibitörleri (gilteritinib, quiartinib, crenolanib gibi) olmak üzere ikiye ayrılır. FLT3 inhibitörleri, birçok klinik çalışmada monoterapi, geleneksel kemoterapi ya da hipometile edici ajanlarla kombinasyon şeklinde ve ön sıra, nükseden veya refrakter hastalık ve konsolidasyon kemoterapisi ya da allojenik kök hücre transplantasyonundan sonra idame tedavisi dahil olmak üzere çeşitli ortamlarda değerlendirilmiştir (Antar ve ark., 2020). Klinikte birkaç FLT3 inhibitörü vardır ve diğerleri ise klinik deneme sürecindedir. Ayrıca, bu birkaç inhibitör, bazı FLT3 mutantına karşı etkinlik eksikliği sebebiyle güçlüklerle karşılaşmaktadır. Dolayısıyla biyobelirteçlerin tanımlanması, akut miyeloid lösemili hastaları sınıflandırmak ve belirli bir FLT3 mutasyonu olan akut miyeloid lösemili hasta yoğunluğunu hedeflemek için önemlidir (Nitika ve ark., 2022).

Son dönemde, AML'li hastaların yaklaşık %20'sini etkileyen izositrat dehidrogenazların (IDH), IDH 1 ve IDH 2'deki mutasyonların patojenik rolü tanımlanmıştır. IDH-mutant, AML için özel terapötik stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunmuştur (Ragon ve DiNardo, 2017). Azasitidin gibi tedavilerle, ağır bir kemoterapiyle ve ölçülü seçeneklerdeki farklı minik molekül hedefli tedavilerle IDH inhibitörlerinin farklı seçenek biçimleriyle araştırılması, klinik etkinliği iletirmek için değerlendirme sürecindedir (Issa ve DiNardo, 2021).

Bcl-2 (B hücreli lenfoma 2) anti-apoptotik geninin aşırı ekspresyonunun, AML hastalarında kötü prognoz ile ilişkilendirildiği bilinmektedir (Marcucci ve ark.,

2003). BCL-2 protein ailesi, hücre ölümünün kontrolünü; mitokondriyal dış zar geçirgenliğini düzenleyerek, zarlar arası boşluk proteinlerinin geri dönüşümü olmadan salınmasına neden olarak, sonra kaspaz aktivasyonuna ve apoptoza sebep olan direkt bağlanma interksiyonları aracılığıyla kontrol etmektedir (Kale ve ark., 2018).

Ayrıca Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun, düşük tam remisyon oranı ve kemoterapi sonrası kısa sağkalım ile ilişkilendirildiği bulunmuştur (Tothova ve ark., 2002). Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu, foliküler lenfoma, KLL (Kronik Lenfositik Lösemi) ve akut miyeloid lösemi gibi kanser türlerinde yüksek olmayan tedavi cevabı vermiştir (Wojcik ve ark., 2005).

AML için etkili bir tedavi olan hematopoetik hücre nakli (HCT), ulusal ve uluslararası kayıtlardaki donör havuzunun genişletilmesi ve kordon kanı bankalarının kurulması, eşleşen aile donörleri olmayan hastalar için uygun bir HLA eşleşmesinin belirlenmesinde başarı şansını büyük ölçüde artırmıştır, fakat kordon kanı HCT hala birincil olarak kullanılmaktadır (Stone ve ark., 2004).

1.2.3. KML (Kronik Miyeloid Lösemi)

Kronik miyeloid lösemi (KML), kromozom translokasyonu ile karakterize edilen, yapısal bir kinaz aktivitesini kodlayan Bcr-Abl onkogenini üreten bir hastalıktır (Zhou ve Xu, 2015). Yetişkinlerde lösemilerin %15-20'sini oluşturur, ender hastalıklar arasındadır (Erdem ve Kaymak, 2020). Ph kromozomu, resiprokal bir translokasyonuyla meydana gelir. Bu translokasyon 9. kromozomda bulunan ABL1 (Abelson) protoonkogeni ile 22. kromozomda bulunan BCR (Breakpoint cluster region-kırılma bölgesi) geninin füzyonuyla meydana gelmektedir (Kırkızlar ve Demir, 2012).

1.2.4. KLL/SLL (Kronik Lenfositik Lösemi/Küçük Lenfositik Lenfoma)

Kronik lenfositik lösemi (KLL) tanısı konulduğunda, ortalama yaş 72 olarak bilinmektedir. Tedaviye başlama şartları, Rai ve Binet evreleme sistemlerine ve hastalıkla alakalı belirtilere bağlı olmaktadır. Bu hastalığa sahip birçok hasta için kemoterapi ve anti-CD20 monoklonal antikorlarla tedavi standart bakım olarak görülmektedir (Halleg ve ark., 2018).

KLL (ve karşılık gelen küçük lenfositik lenfoma, SLL), lenf düğümlerinde, periferik kanda, dalakta ve kemik iliğinde kendine has immünofenotip gösteren olgun B-lenfositlerin ani artışıyla görülen lenfoproliferatif bir hastalık şeklinde bilinmektedir. KLL klinik seyrinde, hastaların çoğunluğu tedaviye gerek duymayan ya da geciken ve uzun süreli sağkalıma sahip yavaş bir klinik seyir gösterirken, geri kalanı ise erken tedavi isteyen, sık tekrarlamalar gerektiren agresif bir hastalık süreci içinde bulunmaktadır (Scarfò ve ark., 2016).

1.3. Depresyon

Bir duygudurum bozukluğu olarak nitelendirilebilen depresyon, duygudurumun azalmış hali olarak ifade edilebilir (Karamustafalıoğlu and Yumrukçal 2011). Pek çok farklı etken biyolojik yatkınlığı olan bireylerde depresyon gelişimine yol açabilmektedir (Alexopoulos, 2005). Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı'nın beşincisi (DSM 5)'ne, göre bakıldığında major depresyon kriterleri; istekte azalma, duygudurumunun depresif bir hale gelmesi, konsantre olmakta zorlanma, iştahın ve uyku halinin artışı ya da azalışı, intihar yatkınlığının artması olarak tanımlanabilir (Kafes, 2021). Majör depresif bozukluk, azalan ilgi alanları, depresif ruh hali, bozulmuş bilişsel fonksiyon ve kötü uyku veya iştah gibi belirtiler gösteren bir bozukluktur. Majör depresif bozukluk, kadınlarda iki kat daha fazla görülmekte, altı yetişkin bireyden birini etkilemekte ve genetik derecesinin %35 olduğu varsayılmaktadır. Ayrıca çocukluk dönemindeki birçok

istismar gibi çevresel etkenlerle majör depresif bozukluk gösterme arasında kuvvetli bir ilişki vardır (Otte ve ark., 2016).

1.3.1. Depresyon Tedavisi

Depresyon için tedavi seçenekleri olarak ruhsal terapi, ilaç tedavisi ve elektrokonvülsif terapi yer almaktadır (Little, 2009). Psikoterapide, yönlendirici olmayan danışmanlık, arkadaş olma, psikodinamik psikoterapi, problem çözme terapisi, grup olarak psikoeğitimi, bilişsel davranış analizi ve egzersiz gibi birçok psikoterapötik teknikler depresyon tedavisi için aracılık eder (Price ve ark., 2007). Farmakoterapi ise, depresyon tedavisinde kullanılan ilaç sınıflarını, ilk olarak; trisiklik antidepresanlar (TCA'lar), monoamin oksidaz inhibitörleri (MAOI'ler), triiyodotironin (T3) ve toplu olarak ikinci nesil antidepresanlar olarak bilinen ilaç grubunu kapsamaktadır. İkinci grup olarak ise, SSRI (seçici serotonin geri alım inhibitörleri) ve SNRI (Serotonin-norepinefrin geri alım inhibitörleri) haricinde diğer etki mekanizmalarına sahip ilaçları da kapsamaktadır (Little, 2009). Elektrokonvülsif tedavi, bazı bireyler için reddedildiğinden ve hızlı bir tedavi olduğundan, çabuk bir biçimde faydalı olmasına karşın, antidepresan ilaç tedavisine uyum sağlayamayan ya da cevap alınamayan bireyler için uygun olduğu hakkında fikir birliği sağlanmıştır (Barbui ve ark., 2007).

Birçok kronik ağrı sendromlarının tedavisinde, trisiklik antidepresanların iyi etkilerine dayanılarak, ilk olarak trisiklik antidepresanların kullanılması ve seçici serotonin geri alım inhibitörlerini, cevap vermeyen ya da trisiklik antidepresanlara tolerans göstermeyen hastalar için kullanmak daha doğru görülmektedir (Jung ve ark., 1997).

1.3.2. Depresyon-Kanser İlişkisi

Normal popölasyona ve diğler tıbbi hastalıklara göre kanser hastalarında, depresyonun daha sık görüldüğü bulunmuştur (Ersoy, 1999). Her iki kanser hastasının birinde psikiyatrik bir sorun, depresyonla beraber uyumsuzluk görölmektedir. Depresyondaki bireyler, kansere rastlanma oranı bakımından yüksek risk taşımakta olup, daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarla bu bulgu çelişmektedir. Ayrıca, depresyon tedavisinde kullanılan, psikoterapötik tedavi, kanser gidişatını etkilemektedir (Spiegel, 1996). Depresyon tanısını kanser hastalarında koymak güçtür. Birçok kanser belirtisi ve tedaviden kaynaklanan yan etkiler, tanı ölçütleriyle örtüşmekte olup, bu nedenle, depresyon ile kanser ile ilgili farklı problemleri ayırmak zorlaşmaktadır (Weinberger ve ark., 2009). Birçok çalışma, kanser hastalarında depresyon gelişimi için, psikososyal risk faktörlerini (baş etme yeteneğinde zayıflık, sosyal olarak izole olma, uyumlu bir kişilik tarzına sahip olma, birinci kuşak akrabalarında kanser ve depresyon hikayesi olma, alkol ya da madde bağımlılığı) incelenmiştir (Sertöz ve Mete, 2004).

1.3.3. Antidepresanlar

Antidepresanlar, güvenli ilaçlar olarak, yarım asırdan fazla bir süredir dünyada etkili bir şekilde depresyon tedavisinde kullanılmaktadır. Antidepresan ilaçlarla tedavide, çoğu zaman istenilen etkiyi görebilmek birkaç haftayı alabilmektedir. Son zamanlarda, uzun süredir devam eden antidepresanlar için, sfingolipid sistemi ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) reseptörü de dahil olmak üzere depresyona umut vadeden yeni etki mekanizmaları keşfedilmiştir (Kornhuber ve Gulbins, 2021).

Antidepresanlar, çeşitli mekanizmalarla ağrıyı bastırmakta ve pek çok kalıcı ağrı türünün tedavisinde, terapötik stratejinin temel bir bileşeni olarak kabul edilmektedir (Sawynok ve ark., 2001). Antidepresanlar, depresyonu olmayan ancak

kronik ağrısı olan hastalarda ağrı kesicidir. Ağrı kesici ve antidepresan özellikleri, birbirinden bağımsızdır (Micó ve ark., 2006).

Antidepresan ilaçlar, etkilerini, enzim inhibisyonu veya reseptör inhibisyonu ve geri alım engelleyicileri olarak sergilemektedir (Stahl, 2000).

Antidepresanlar, aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir.

- Monoamin Oksidaz İnhibitörleri (MAOI)
- Serotonin ve Noradrenalin Geri alım İnhibitörleri (SNRI)
- Trisiklik Antidepresanlar (TCA)
- Noradrenalin ve Dopamin Geri alım İnhibitörleri (NDGI)
- Seçici Serotonin Geri alım İnhibitörleri (SSRI)
- Noradrenerjik ($\alpha 2$ antagonizması yoluyla) ve Serotonerjik Antidepresanlar (NaSSA)
- Seçici Noradrenerjik Geri alım İnhibitörleri (NRI)
- Serotonin 2A Antagonistleri/ Serotonin Geri alım İnhibitörleri (SAGI) (Örsel 2004).

Adenozin, spinal analjezi ve supraspinal analjezi oluşturabilir. Bundan dolayı, TCA'ların, sodyum kanallarının blokajı veya nöronal adenosin alımının inhibisyonu aracılığıyla hareket edebileceği öne sürülmüştür. Anti-depresan ilaçlar, özellikle TCA'lar ve SNRI'ler, fibromiyalji ve kronik bel ağrısı gibi analjeziklerin ve NSAID'lerin çok etkili olmadığı kronik romatizmal ağrılı durumlarda analjezik etkilere sahiptir (Perrot ve ark., 2008). Oral trisiklik antidepresanlar, in vitro sodyum kanallarını ve in vivo sinir iletimini önlemekte ve kronik ağrı tedavisinde kullanılmaktadır (Lirk ve ark., 2006).

1.3.3.1. Monoamin Oksidaz İnhibitörleri (MAOI)

Monoamin oksidazlar (MAO'lar), değişik aminlerin ve nörotransmitterlerin oksidatif deaminasyon reaksiyonundan sorumludur. Son 70 yıldır, karmaşık hastalıkların tedavisinde başarılı ilaçlar olarak birçok MAO inhibitörleri geliştirilmiştir ve 1950'lerin sonlarında depresyon için onaylanan ilk ilaçlar olduğu bilinmektedir (Duarte ve ark., 2021).

Monoamin oksidaz inhibitörleri (MAOI'ler), depresyon tedavisi için birinci sınıf ajanlar içerisinde yer almaktayken, çoğunlukla olumsuz bir güvenlik profili, kısıtlayıcı diyet yasaklarına duyulan gereklilik ve hipertansif kriz korkusu gibi sebepler sonucunda yıllar içinde klinisyenler arasında tercih edilebilirliği azalmıştır (Krishnan, 2007).

1.3.3.2. SSRI (Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörleri) ve SNRI (Serotonin/norepinefrin Geri Alım İnhibitörleri)

İlk olarak depresyon tedavisi için araştırılan ve sunulan seçici serotonin geri alım inhibitörleri ve serotonin/norepinefrin geri alım inhibitörlerinin, birçok anksiyete bozuklukları, distimi ve bulimia gibi birçok psikiyatrik hastalıklar için etkili olduğu görülmüştür. Ruh hali, cinsel davranış, saldırganlık, ve ağrı gibi önemli işlevlere fayda sağlamada yer alan serotonerjik (5-HT) nörotransmisyon sisteminde bu ilaçların önemli etkileri bulunmaktadır ve ayrıca venlafaksin/venlafaksin XR gibi antidepressanların duygudurum ve anksiyete bozukluklarında da önemli bilinen noradrenerjik nörotransmisyon sistemi üzerinde de etkileri bulunmaktadır (Gorman ve Kent, 1999).

1.3.3.3. TCA (Trisiklik Antidepresanlar)

Yıllardır toplanan kanıtlar, trisiklik antidepresanların kronik nöropatik ağrının tedavisinde temel tedavi olduğunu belirtmiştir (Galer, 1995; Bryson ve Wilde 1996). Trisiklik antidepresanlar, etkisini hızlı göstermemesi, doz etkisini değerlendirmenin güçlüğü ve plazma konsantrasyonunun kişiler arası belirgin değişkenliğine dayanarak, terapötik ilaç izleme için güçlkle birlikte fırsat da sunmaktadır (Sjöqvist ve ark., 1980).

TCA'lar, norepinefrin ve serotonin nörotransmitterin geri alımını bloke ederler. Nörona yeniden girmeden önce, alıcı bölgelerde daha fazla nörotransmitterin bulunmasına izin vererek ruh hali üzerinde olumlu etkilere neden olurlar (Sabella 2018).

Trisiklik antidepresanlara amitriptilin, doksepin, imipramin, desipramin ve nortriptilin örnek olarak verilebilir (Calvi ve ark., 2021).

1.3.3.3.1. Amitriptilin

Amitriptilin, 1961 yılında, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından, Elavil markası adı altında majör depresif bozukluk (MDB) tedavisi için onaylamıştır (Fangmann ve ark., 2008). Düşük dozlarda amitriptilinin, kronik ağrının yoğunluğu ve başka bazı özellikleri üzerinde orta düzeyde olumlu bir etkisinin olduğu görülmüştür (Zitman ve ark., 1990).

Amitriptilin, yaşlı hastaları etkileyen çeşitli kronik ağrı durumlarında araştırılmıştır. Bunlar arasında, nörojenik ağrı (öncelikle postherpetik nevralji ve ağrılı diyabetik nöropati) ve ağrılı kas-iskelet sistemi bozuklukları (fibromiyalji ve romatoid artrit) yer alır (Bryson ve Wilde, 1996). Amitriptilin, fibromiyaljisi olan

veya malignite ile bağlantılı olan ya da olmayan kronik ağrısı bulunan hastalarda, diğer analjeziklerle beraber düşünülmelidir. Bazı hastalarda antikolinerjik yan etkilerin verdiği rahatsızlık, tedavinin faydasına etkili olsa da, amitriptilin yaşlıları etkileyen kronik ağrı durumlarının tedavisinde önemli bir role sahiptir (Bryson ve Wilde, 1996).

Amitriptilinin, BDNF'teki etkisi glial hücre görev bozukluğu ve atrofi, MDB (Major Depresif Bozukluk) nöropatofizyolojisine katkısı olan önemli özelliklerden olabilir (Mayegowda ve Thomas, 2019).

Amitriptilin, norepinefrin ve serotonin geri alımını önlemesi hariç, histaminerjik, muskarinik ve diğer çeşitli reseptörlerde aktivite üretimi yapmaktadır. Bir monoamin modülatörü olarak, duygudurum bozukluklarının pek çoğunun anlaşılmasında, monoamin teorisinin daha fazla anlaşılması bakımından yarar sağlamıştır. Seçici serotonin/norepinefrin geri alım inhibitörlerinin önünü açmıştır (McClure ve ark., 2021).

Amitriptilin, yetişkin bireylerde depresyon tedavisinde kullanılan FDA onaylı bir ilaçtır (Thour, 2019). Son yıllarda, amitriptilinin merkezi N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerini inhibe ettiği görülmüştür (Watanabe ve ark., 1993).

Amitriptilinin, multipl miyelom tümör dokularında, p53'ü indüklediği, kaspaz-3'ü aktive ettiği ve antiapoptotik Bcl-2 ve Mcl-1'i azalttığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2013). Amitriptilin ile uyarılan nörotoksositeye, apoptoz yardım eder ve kaspaz aktivitesinin uyarılmasıyla etkisi azaltılır ve buna bağlı olarak apoptotik aşamaların başlatılması, lokal anestezi kaynaklı nörotoksitenin etkisini azaltmada rolü olduğunu düşündürmektedir (Lirk ve ark., 2006). Amitriptilin, nöronlarda, doz bağımlı olarak, sitotoksosite göstermektedir. Apoptotik sürecin başlatılmasının, lokal anesteziğin sebep olduğu nörotoksiteyi azaltmada rolü olabilmektedir (Lirk ve ark., 2006).

Bu çalışmayı yapmamızdaki amacımız; trisiklik antidepresan olan amitriptilinin HL60 akut miyeloid hücre serisinde, bu ilacın hücre proliferasyonu ve apoptozu üzerindeki etkilerini değerlendirmektir.



2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler

RPMI Medium (Sigma), Fetal Bovine Serum (FBS) (Capricorn), Penisin/Streptomycin (Capricorn), Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck), MTT (Bioworld), Trypane Blue (Sigma), Trypsin/EDTA (Capricorn), Amitriptyline (Sigma), Acridine Orange (Sigma), Bradford (Thermo), Nuclear Extraction Kit (Active Motif), Caspase-3 Assay Kit (Colorimetric) (Abcam ab39401), Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences)

2.2. Kullanılan Cihazlar

Steril kabin (Holten Lamin Air), Flow Sitometri (Accuri C6) Spektrofotometre Multiplaka okuyucu (Spectramax, Molecular Devices), magnetik karıştırıcı (Wisestir), Spektrofluorometre (Perkin Elmer), otomatik pipet seti (Nichipet), santirifüj (Sigma), CO₂ inkübatörü (Sanyo), hassas terazi (Mettler Toledo), inverted mikroskop (Olympus), -20 °C derin dondurucu ve -80 °C derin dondurucu (Heto, Sanyo, Bosch), vorteks (Scilogex), su banyosu (Mettler),

2.3. Hücre Kültürü

Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında, 2022-2023 tarihleri arasında yapılmıştır. HL60 akut miyeloid lösemi hücre serisi, %1 L-glutamin, %10 inaktif fetal sığır serumu, %1 penisilin streptomisin, içeren RPMI 1640 besiyerinde, 25 cm²'lik flasklarda 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltılmıştır.

2.3.1. Hücre Sayımı

Hücre canlılığı, kaspaz 3 aktivitesin tayini, mitokondriyal kütleinin belirlenmesi ve apoptozun belirlenmesi deneylerinde, plaklara ait her kuyunun, eşit sayıda hücre içermesi için, tripan mavisi ile hücre sayımı yapıldı. Bu amaçla; 20µl tripan mavisi, 20µl hücre süspansiyonu ile karıştırıldı ve neubauer lamı aracılığıyla inverted mikroskopta hücre sayımı yapıldı. Neubauer lamının, sayma bölgesinin hacmi 0,1mm³'dür. 1ml (cm³)'deki hücre sayısı; 0,1 mm³ deki hücre sayısı, seyreltme faktörü ve 10⁴ ile çarpılarak elde edildi.

2.4. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Amitriptilinin, doza ve zamana bağlı olarak, HL60 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide testi (MTT) gerçekleştirildi. Bu amaçla, 96'lık plaklarda her kuyuya, 24 x10³ hücre ekildi. Amitriptilin, DMSO'da çözüldü ve stok çözeltisi hazırlandı. Ardından hücrelere 0,05-100µM konsantrasyon aralığında amitriptilin uygulandı. Tüm kuyulardaki DMSO konsantrasyonu, %0,25'i geçmedi. İlaç uygulanmayan kuyular, kontrol grubu olarak kullanıldı. Hücreler farklı amitriptilin dozları ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun bitiminde, kuyulara, hazırlanan 5mg/ml MTT solüsyonu, her kuyuya 20µl olacak şekilde, eklendi. Hücreler 37°C'de 4 saat MTT ile inkübasyona bırakıldı. 4 saat inkübasyon sonunda, formazan kristallerini çözmek amacıyla, kuyulara 100 µl SDS-HCl (83µl HCl içeren %10 SDS çözeltisi) eklendi ve 1 gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün spektrofotometrede 550nm'de absorbans ölçümü yapıldı.

2.5. Kaspaz 3 Aktivite Tayini

HL60 hücreleri, 24'lü plaklara 150.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. 40 μ M ve 60 μ M Amitriptilin konsantrasyonları uygulandı ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda, hücrelerden sitosolik protein izolasyonu yapıldı (Active Motive). Bu amaçla; kit protokolü takip edildi (Nuclear extraction kit, Active Motif). Hücreler, santrifüj yapıldı (5000 rpm, 5 dakika). Süpernatant otomatik pipet yardımıyla çekildi ve atıldı. Ardından pelet PBS ile yıkandıktan sonra, 1X hipotonik buffer eklendi. Otomatik pipet ile iyice karıştırıldı ve buz üzerinde 15 dakika inkübasyona bırakıldı ve inkübasyonun sonunda her örneğe deterjan eklendi ve 10 sn vorteks yapıldı. Ardından 14000g'de 30 saniye +4°C'de santrifüj yapıldı. Süpernatantlar, önceden soğutulmuş tüplere aktarıldı. Bradford Metodu kullanılarak, protein tayini yapıldı. Eşit miktarda protein içeren (100 μ g) içeren örnekler kullanıldı. Ardından, Caspase-3 Assay Kit (Colorimetric) (Abcam, ab39401) kit protokolü takip edildi. Her kuyuya; 0,5 μ l DTT, 49,5 μ l 2X Reaction buffer ve 2,5 μ l (7,8mM) kaspaz 3 substratı eklendi. 1 gece 37°C'de inkübasyona bırakıldıktan sonra 400 nm'de absorbans ölçümü yapıldı.

2.6. Protein Miktar Tayini

Kaspaz 3 aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, sitosolik ekstraktlerdeki protein tayini Bradford metoduna göre yapıldı. Bradford ajanı (Thermo) (150 μ l) ve örnek (5 μ l) karıştırıldı. 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyonun ardından, Spektrofotometrede 595nm de absorbans ölçümü yapıldı. Standart grafik yardımıyla, protein konsantrasyonları hesaplandı.

2.7. Mitokondriyel Kütlenin Belirlenmesi

Mitokondri kütlesinin analiz edilmesi amacıyla, acridine orange (NAO) boyası kullanıldı. Bu amaçla hücreler 24'lü plaklara ekildi (150.000 hücre/kuyu) ve hücrelere 40µM ve 60 µM konsantrasyonlarda amitriptilin uygulandı. Amitriptilin uygulanamayan hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı. 72 saat inkübasyonun ardından, hücreler santrifüj işleminin ardından, PBS ile yıkanmaları sağlandı ve 5 µM NAO içeren besiyeri eklendi. 30 dakika 37°C'de hücrelerin NAO ile boyanmaları sağlandı. Hücreler santrifüj edildi. PBS ile yıkandı. Pelet PBS'de çözüldü ve spektrofloreometre (Perkin Elmer) ile floresans ölçümü yapıldı (Eksitasyon 495nm ve emisyon 519 nm). Her örneğin floresan şiddeti mg protein düzeylerine oranlanarak normalize edildi. NAO ile boyanmayan hücreler negatif kontrol olarak kullanıldı.

2.8. Apoptozun Belirlenmesi

Amitriptilin'in HL60 hücrelerinin apoptozu üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla, hücreler 24'lü plaklara ekildi (150.000 hücre/kuyu), 40 µM ve 60 µM amitriptilin ile 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlandığında, hücreler santrifüj edildi. PBS ile yıkandı ve kit protokolü, Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences) takip edildi. Hücreler, 1× Binding Bufferda süspanse edildi. 5 µl PE Annexin V ve 5 µl of 7-AAD eklendi ve ardından vorteks ile karıştırıldı. 15 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı ve her tüpe 400 µl 1× Binding Buffer eklendi. Flow sitometri cihazı yardımıyla analiz edildi.

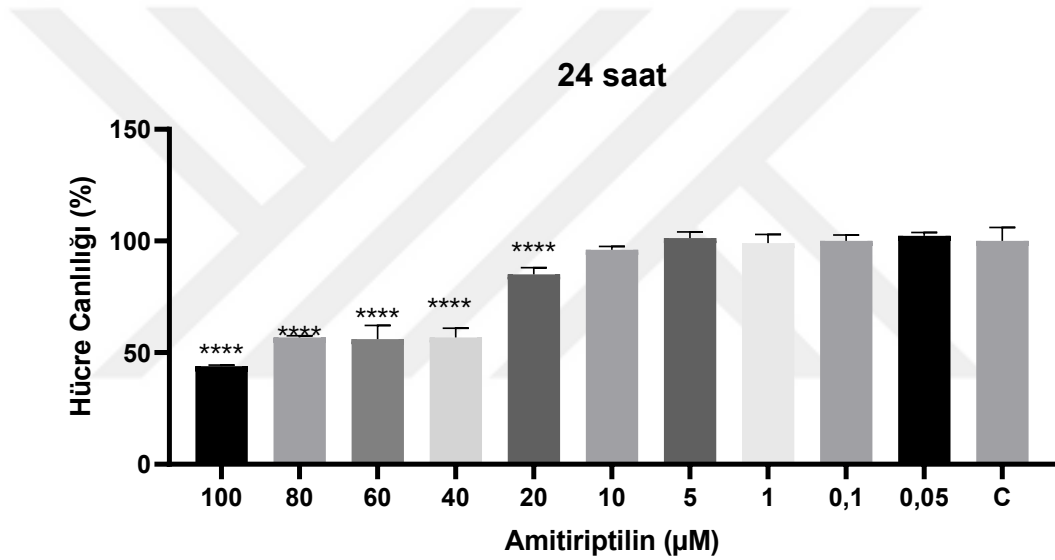
2.9. İstatistiksel Analiz

Gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla, Graph Pad Prism 9 programı kullanılarak, One Way Anova varyans Analizi testi yapıldı. Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

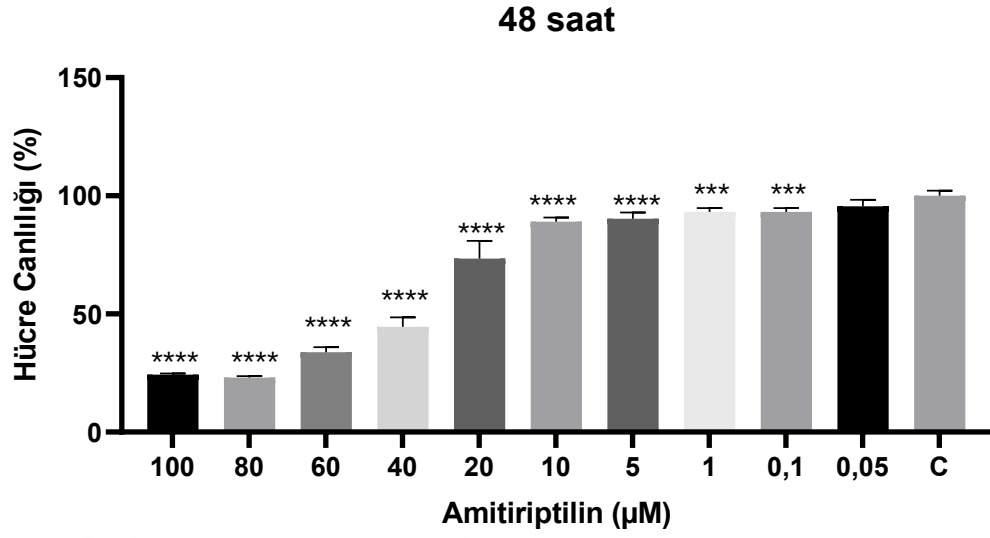
3.1. Amitriptilinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

HL60 hücrelerine amitriptilin uygulandığında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, 20-100 μ M konsantrasyon aralığında hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı, 0,05-10 μ M konsantrasyon aralığında hücre canlılığını anlamlı olarak etkilemediği görüldü (Şekil 3.1).



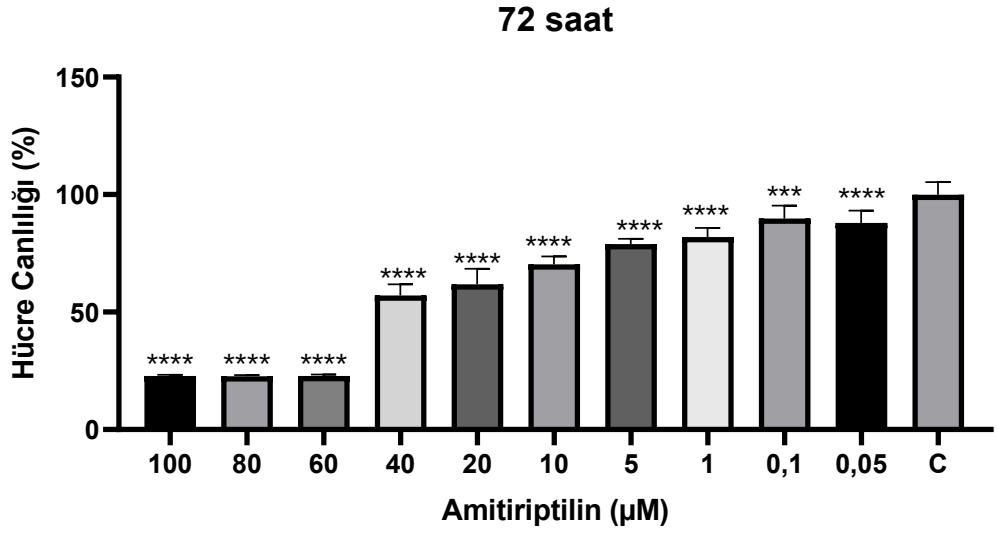
Şekil 3. 1. Amitriptilinin, 24 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, hücre canlılığı üzerindeki etkileri (****p<0,0001; kontrol grubuna göre anlamlılığı belirtmektedir. C; Kontrol)

HL60 hücrelerine amitriptilin uygulandığında, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, 0,1-100 μ M konsantrasyon aralığında hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı, 0,05 μ M konsantrasyonda hücre canlılığını anlamlı olarak etkilemediği görüldü (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2. Amitriptilinin, 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda hücre canlılığı üzerindeki etkileri(***p<0,001;****p<0,0001; kontrol grubuna göre anlamlılığı belirtmektedir. C; Kontrol)

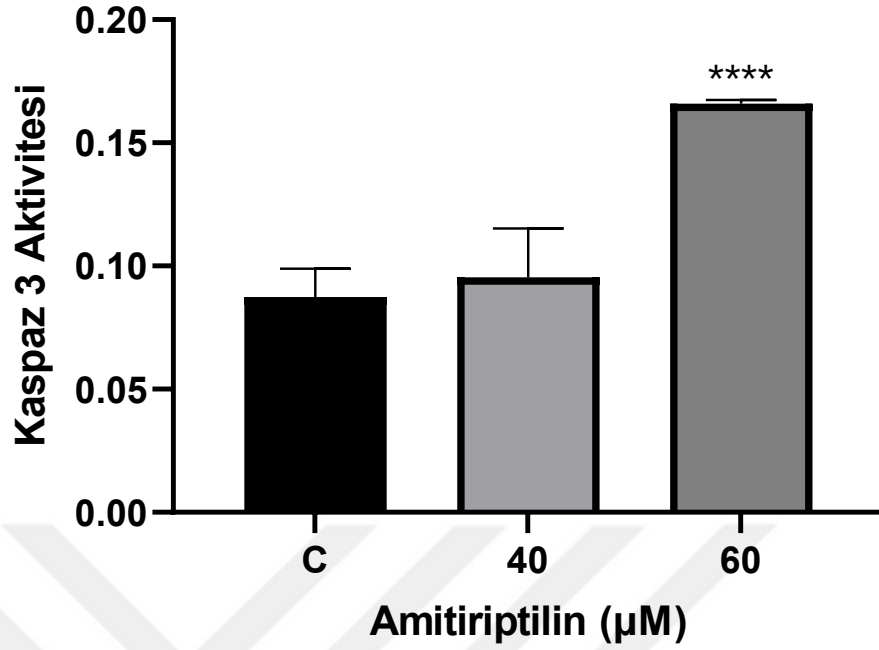
HL60 hücrelerine amitriptilin uygulandığında, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, 0,05-100µM konsantrasyon aralığında hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görüldü (Şekil 3.3).



Şekil 3. 3. Amitriptilinin, 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, hücre canlılığı üzerindeki etkileri(***p<0,001;****p<0,0001; kontrol grubuna göre anlamlılığı belirtmektedir. C; Kontrol)

3.2. Amitriptilinin Kaspaz 3 aktivitesi üzerindeki etkileri

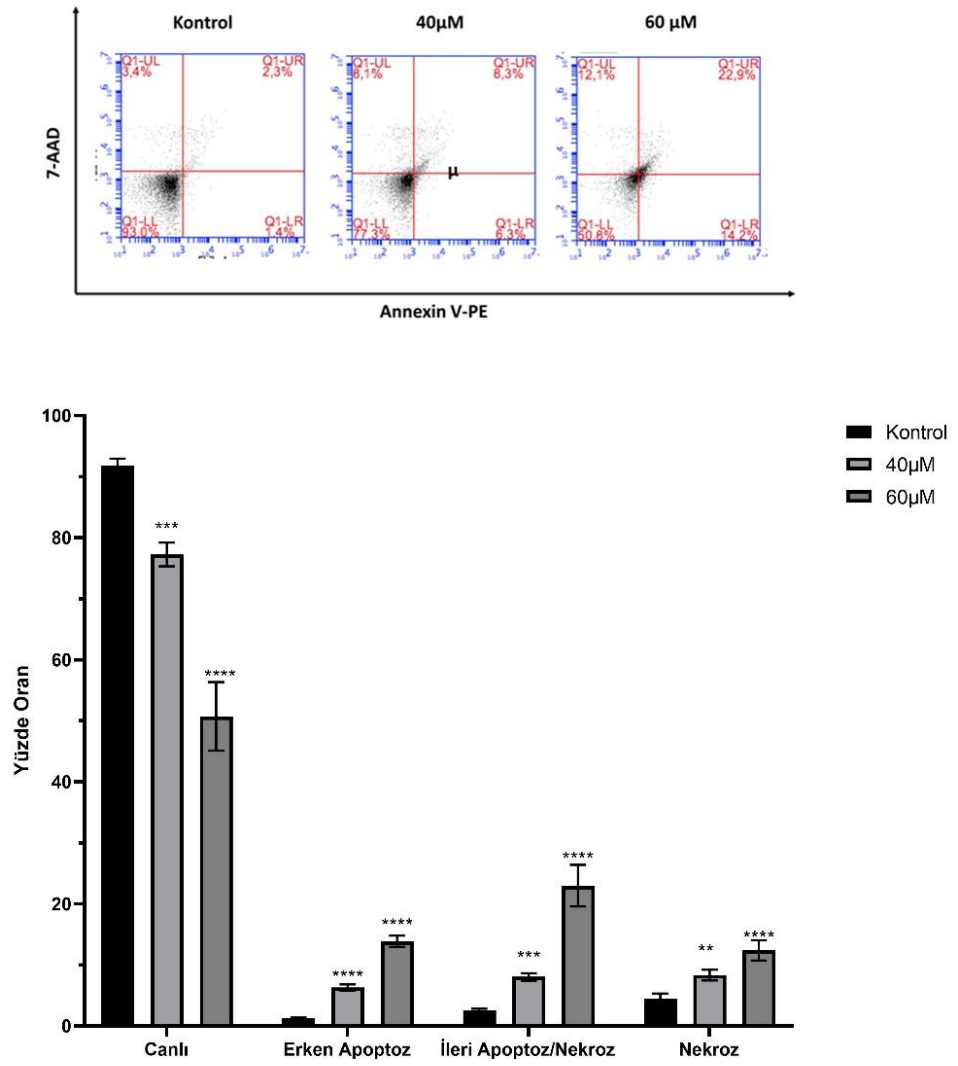
40 µM ve 60 µM Amitriptilin, HL60 hücrelere uygulandı ve 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda 40 µM amitriptilin, kaspaz 3 aktivitesi üzerinde anlamlı bir etki göstermezken, 60 µM amitriptilinin kaspaz 3 aktivitesini anlamlı olarak artırdığı görüldü (p<0,0001) (Şekil 3.4).



Şekil 3. 4. Amitriptilinin kaspaz 3 aktivitesi üzerindeki etkisi (C; Kontrol) (**** p<0,0001 kontrol grubuna göre anlamlılığı belirtmektedir)

3.3. Amitriptilinin HL60 hücrelerinin apoptozu üzerindeki etkileri

40 µM ve 60 µM Amitriptilinin HL60 hücrelerinin apoptozu üzerindeki etkisi 72 saat inkübasyon süresi sonunda değerlendirildi ve 40 µM ve 60µM amitriptilinin canlı hücreleri anlamlı olarak azalttığı (sırayla p<0,001 ve p<0,0001), erken apoptozu artırdığı (p<0,0001), ileri apoptoz ve nekrozu artırdığı (sırayla p<0,001 ve p<0,0001), nekrozu artırdığı (p<0,01 ve p<0,0001) görülmüştür (Şekil 3.5).

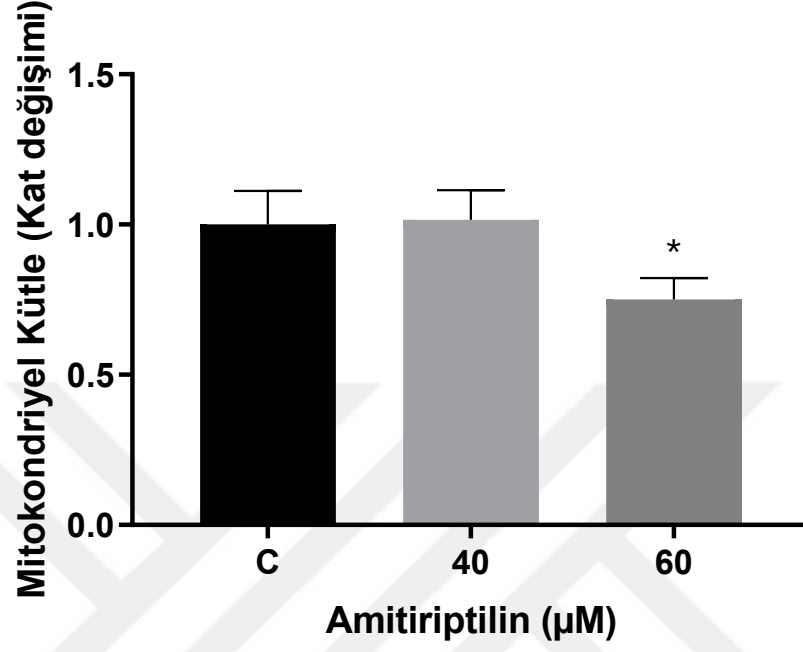


Şekil 3.5. Amitriptilinin HL60 hücrelerinin apoptozu üzerindeki etkileri (***) $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ kontrol grubuna göre anlamlılığı belirtmektedir)

3.4. Amitriptilinin HL60 hücrelerinde mitokondriyel kütle üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi

Amitriptilinin HL60 hücrelerinde mitokondriyel kütle üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla, hücreler 40 μM ve 60 μM konsantrasyonda amitriptilin ile 72

saat inkübe edildiler. 40 μ M amitriptilin, mitokondriyel kütleyi anlamlı olarak etkilemezken, 60 μ M amitriptilin, mitokondriyel kütleyi anlamlı olarak azaltmıştır.



Şekil 3.6. Amitriptilinin HL60 hücrelerinde mitokondriyel kütle üzerindeki etkileri (* $p < 0,05$ kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir)

4. TARTIŞMA

HL60 hücre serisinin, normal ve lösemik miyelomonositik hücrelerin farklılaşmasında ve çoğalmasındaki mekanizmaları incelemek için laboratuvar ortamında yapay koşullarda önemli olduğu görülmüştür (Drexler ve ark., 1995). HL60 hücre serisi, granülosit/monosit/makrofajların, normal ve lösemik hücrelerinin farklılaşma süreçlerindeki, hücre düzeyinde ve moleküler düzeydeki gelişmelerini incelemek için uygun bir invitro modeldir (Collins, 1987).

Amitriptilin, birçok hastalıkta ve aksaklıklarda önemli bir tedavi edicidir. Amitriptilin, serotonin ve norepinefrin geri alımını engeller ve ayrıca histaminerjik, muskarinik ve diğer çeşitli reseptörlerde, hedef dışı aktivite üretimine yol açar. Monoaminlerin bir modülatördür ve çeşitli ruh hali bozukluklarının anlaşılması için monoamin teorisinin kurulmasına fayda sağlamıştır ve ayrıca yaygın olan seçici serotonin/norepinefrin geri alım inhibitörlerinin yolunu açtığı bilinmektedir (McClure ve Daniels, 2021). Zhang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, amitriptilinin, multiple miyeloma (MM) tümör büyümesini önemli ölçüde azalttığı, tümör büyümesini geciktirdiği ve tümör dokularında p53'ü indüklediği, kaspaz-3'ü aktive ettiği ve antiapoptotik Bcl-2 ve Mcl-1'i azalttığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2013). Bir başka çalışmada, fluoksetin ve amitriptilinin, kemirgenlerde kanser hücrelerinin çoğalmasını uyardığı görülmüştür (Brandes ve ark., 1992). Sıçan siyatik sinirine in vivo olarak topikal olarak uygulanan amitriptilin, doza bağlı bir nörotoksik etkiye neden olduğu gösterilmiştir (Estebe ve Myers, 2004). Aynı biçimde, intratekal amitriptilinin, 25 µM 'de kemirgen modelinde nöronal ve glial dejenerasyona yol açtığı görülmüştür (Sudoh ve ark., 2004). Amitriptilin, imipramin ve klomipramin, HL-60 hücreleri tarafından 3H-H alımına karşı gelmekte olup, bu durum yalnızca toksik konsantrasyonlarda görülmektedir ve hücre kaybıyla alakalıdır (Gespach ve ark., 1985).

Çalışmamızda, amitriptilinin HL60 hücre serisinde, hücre canlılığı üzerindeki etkilerini değerlendirmek üzere MTT testi yapılmıştır. MTT, hücrelerin metabolizmasını incelemeye sık kullanılan testtir (Mosmann, 1983). Bu çalışmada, amitriptilin ile hücreler farklı sürelerde inkübasyona bırakılmışlardır. Bu inkübasyon sürelerinin sonunda, hücre canlılığı tespit edilmiştir. HL60 hücrelerinde, amitriptilin ile 24 saat inkübasyon sonunda, 20-100 μM konsantrasyon aralığında, 48 saatlik inkübasyon sonunda 0,1-100 μM konsantrasyon aralığında ve 72 saat inkübasyon sonunda 0,05-100 μM konsantrasyon aralığında hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttığı görülmüştür.

Çalışmamızda HL60 hücre serisinde, amitriptilinin, kaspaz 3 aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Kaspaz-3'ün tespiti, apoptoz ile ölmüş hücreler için kullanılabilen güvenilir bir belirteçtir (Crowley ve Waterhouse, 2016). Çalışmamızda, 40 μM ve 60 μM amitriptilin HL60 hücre serisine uygulandı ve 72 saat boyunca inkübe edildi. 72 saat sonra 40 μM amitriptilin, kaspaz 3 aktivitesi üzerinde anlamlı bir etki göstermediği, ancak 60 μM amitriptilinin kaspaz 3 aktivitesi üzerinde anlamlı bir şekilde artışa neden olduğu görüldü ($p < 0,0001$).

Programlanmış hücre ölümü ya da apoptoz genelde farklı morfolojik özellikler ve enerjiye bağlı biyokimyasal mekanizmalarla karakterizedir (Elmore, 2007). Apoptoz sırasında zarın taşması, hücre büzülmesi, kromatinin yoğunlaşması ve DNA'nın parçalanması ve ardından apoptoza uğrayan hücrenin komşu hücreler tarafından hızla yutulmasıyla sonuçlanan planlı bir çöküşü tanımlamaktadır (Renehan ve ark., 2001). HL60 hücre serisinde, amitriptilinin apoptoz üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, 40 μM ve 60 μM amitriptilinin, HL60 hücre serisindeki apoptoz üzerindeki etkisi incelenmiştir. 72 saat inkübasyondan sonra 40 μM amitriptilinin canlı hücreleri anlamlı bir şekilde azalttığı ($p < 0,001$), erken apoptozu artırdığı ($p < 0,0001$) ileri apoptoz ve nekrozu artırdığı ($p < 0,001$) ve nekrozu artırdığı ($p < 0,01$) gözlemlenmiştir. Aynı şekilde 60 μM amitriptilinin canlı hücreleri anlamlı olarak azalttığı ($p < 0,0001$), erken apoptozu artırdığı ($p < 0,0001$), ileri apoptoz ve

nekrozu artırdığı ($p<0,0001$) ve son olarak nekrozu artırdığı ($p<0,0001$) tespit edilmiştir.

Villanueva-Paz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, amitriptilin, HepG2 hücrelerinde mitokondri fonksiyon bozukluğunu ve oksidatif stresi indüklemiştir (Villanueva- Paz ve ark., 2016).

Amitriptilinin, üç insan tümör hücre serisindeki; H460 (akciğer kanseri), HeLa (rahim ağzı kanseri) ve HepG2 (hepatoma), antitümör potansiyelini inceleyen bir çalışmada, amitriptilinin sitotoksik etkisi, yaygın olarak kullanılan üç kemoterapötik ilaç (kamptotesin, doksorubisin ve metotreksat) ile karşılaştırılmıştır ve amitriptilinin en yüksek hücresel hasarı ürettiği, yüksek seviyelerde reaktif oksijen türü (ROS) üretimine neden olduğunu ve ardından geri dönüşü olmayan ciddi mitokondriyal hasara neden olduğu belirtilmiştir. Amitriptilin ve bu çalışmada kullanılan kemoterapötik ilaçların, sitokrom c salınımı ve kaspaz-3 aktivasyonuna bağlı bir mekanizma ile hücreleri apoptoza götürdüğü bildirilmiştir (Cordero ve ark., 2010).

Trisiklik antidepresanların ve özellikle de bu antidepresanlar arasında yer alan klomipraminin, mitokondriyal solunum zincirinin kompleks III'ünün inhibisyonu ile kaspaz-3'e bağlı apoptozun intrinsik yolunu başlattığı bildirilmiştir (Dale ve ark., 2005). Trisiklik antidepresanlar, süperoksit ve hidrojen peroksit üretiminde bir artışa ve mitokondri zar potansiyelinde bir düşüşe neden olur ve böylece, sitokrom c salınır ve kaspaz 3, prokaspaz 9 ve endonükleaz G'nin aktivasyonu, apoptotik ölüm ve DNA bozulmasına sebep olur. Mitokondri enerji metabolizmasının, ROS üretiminin ve apoptozun düzenlenmesinde önemli bir etkisi olduğu bildirilmiştir (Pilkington ve ark., 2008). Bir çalışmada trisiklik antidepresanların aksonal dejenerasyonu indüklemeyen hücresel metabolizmadaki etkileriyle nörotoksisiteyi ortaya çıkardığını gösterilmiştir (Lirk ve ark., 2006).

Apoptozun, kısmen de olsa amitriptilinin in vitro nörotoksik sekellerine aracılık ettiğini görülmüştür. Apoptik belirteçler ile (sitokrom c'nin salınması, mitokondriyal depolarizasyon, kaspaz-3'ün aktivasyonu) elde edilen sonuçlar, çoğalan lenfosit kültürlerinde, TCA toksisitesinin daha önceki mekanik çalışmalarla uyumlu olduğunu göstermiştir (Karlsson ve ark., 1998).

Antidepresif ajanlar; imipramin, klomipramin ve sitalopramın, insan akut miyeloid lösemi HL60 hücrelerinde, hücre canlılığı, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ve mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) üzerindeki etkilerini incelenmiştir. Çalışmanın sonuçları, bu bileşiklere maruz kalmanın apoptotik süreci aktive ederek hücre canlılığında bir kayba neden olduğunu göstermektedir (Xia ve ark., 1999).

Lirk ve ark.'nın çalışmasında, amitriptiline maruz kalan nöronlarda doza bağımlı olarak toksik etki bulunmuştur. 24 saatlik inkübasyondan sonra 100 uM amitriptilin ile inkübe edilen kültürlerde nöronların yaklaşık olarak %50 oranında azaldığı görülmüştür. Ayrıca 500 uM amitriptilin ile de, hayatta kalan hücrelerin sayısının hızla azaldığı görülmüştür (Lirk ve ark., 2006).

Amitriptilinin HL60 hücre serisindeki, mitokondriyal kütle üzerindeki etkilerini incelediğimizde, 72 saat inkübasyon sonucunda 40 μ M konsantrasyonda amitriptilin mitokondriyal kütleyi anlamlı olarak etkilemediği, ancak 60 μ M konsantrasyonda amitriptilin mitokondriyal kütleyi anlamlı derecede azaltmış olarak gözlemlenmiştir. Moreno ve Fernandez ve ark.'nın çalışmasında, mitokondriyal disfonksiyonun depresyon patofizyolojisinde yer alabileceği ve amitriptilin tedavisi ile kötüleşebileceği belirtilmiştir (Moreno-Fernández ve ark., 2012). Amitriptilin ile tedavi edilen hastalarda mitokondriyal disfonksiyonu daha fazla incelemek için sitrat sentaz aktivitesi belirlenmiştir ve bakıldığında kontrol grubuna göre majör depresyon grubunda ve en önemlisi kontrol ve majör depresyon grubuna göre, amitriptilin grubunda mitokondriyal kütlede bir azalma olduğunu görülmüştür (Moreno-Fernández ve ark., 2012).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada HL60 hücre serisinde, amitriptilinin sitotoksik ve apoptotik etkileri incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Amitriptilinin 24, 48, 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, farklı konsantrasyon aralığında hücre canlılığı üzerine etkileri değerlendirilmiş ve 24 saatlik inkübasyon sonunda; 20-100 μ M konsantrasyon aralığında, 48 saatlik inkübasyon sonunda; 0,1-100 μ M konsantrasyon aralığında ve 72 saatlik inkübasyon sonunda; 0,05-100 μ M konsantrasyon aralığında hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir. Amitriptilinin (60 μ M), 72 saatlik inkübasyon sonunda, kaspaz 3 aktivitesini anlamlı olarak arttırdığı ($p<0,0001$) saptanmıştır. Flow sitometri analiz sonuçlarına göre; 40 ve 60 μ M amitriptilinin, 72 saat inkübasyon sonunda canlı hücre sayısını (sırasıyla $p<0,001$ ve $p<0,0001$) anlamlı olarak azalttığı, erken apoptozu artırdığı ($p<0,0001$), ileri apoptoz ve nekrozu artırdığı (sırasıyla $p<0,001$ ve $p<0,0001$) ve son olarak da nekrozu artırdığı ($p<0,01$ ve $p<0,0001$) bulunmuştur. Amitriptilinin 60 μ M konsantrasyonda 72 saat inkübasyon sonunda mitokondriyel kütleyi düşürdüğü saptanmıştır.

Bu çalışma, amitriptilinin HL60 lösemi hücreleri üzerinde, sitotoksik ve apoptotik etkilerini inceleyen bir çalışmadır. Gelecekte yapılacak çalışmalarda, amitriptilinin, apoptozda yer alan yollardaki genler ve proteinler ve mitokondriyal proteinler üzerindeki etkileri daha detaylı incelenerek aydınlatılabilir.

ÖZET

Amitriptilin'in HL60 Akut Miyeloid Lösemi Hücre Serisinde Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

Akut Miyeloid Lösemi (AML), olgun hücre hallerine dönüşme yetisini kaybetmiş moleküler genetik açıdan hasarlı myeloblastların dokularda birikmesiyle meydana gelen hematolojik bir malignitedir. HL60 hücre serisi, insan akut miyeloid lösemi hücre serisidir. Amitriptilin, bir dibenzocycloheptadine türevi olan üçüncül amin trisiklik antidepresandır. Serotonin ve norepinefrin gibi nörotransmitterlerin nöral membrandan geri emilimini engellediği bilinmektedir. Amitriptilin, çeşitli ağrıların tedavisinde kullanılan bir trisiklik antidepresandır. HL60 hücre serisinde yaptığımız çalışmada, amitriptilinin konsantrasyona ve zamana bağlı olarak, hücre canlılığı üzerindeki etkileri belirlenmiştir. 24 saat sonunda 20-100 μM , 48 saat sonunda 0,1-100 μM , 72 saat sonunda 0,05-100 μM konsantrasyon aralığında hücre canlılığı anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir. HL60 hücreleri 40 μM ve 60 μM amitriptilin ile 72 saat boyunca inkübe edildiğinde 60 μM amitriptilinin kaspaz 3 aktivitesini ve 40 μM ve 60 μM amitriptilinin erken apoptozu, ileri apoptozu ve nekrozu artırdığı gözlenmiştir. Bu ilacın HL60 hücrelerinde 60 μM konsantrasyonda 72 saat inkübasyon sonucunda mitokondriyal kütleyi anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur. Sonuç olarak, bu çalışma ileride yapılacak çalışmalara yön verecektir.

Anahtar Sözcükler: Amitriptilin, HL60, AML (Akut Miyeloid Lösemi).

SUMMARY

Evaluation of the Effects of Amitriptyline on Cell Proliferation in HL60 Acute Myeloid Leukemia Cell Line

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a hematological malignancy caused by the accumulation in tissues of molecular genetically damaged myeloblasts that have lost their ability to transform into mature cell states. The HL60 cell line is a human acute myeloid leukemia cell line. Amitriptyline is a tertiary amine tricyclic antidepressant, a derivative of dibenzocycloheptadine. It is known to inhibit the reabsorption of neurotransmitters such as serotonin and norepinephrine from the neural membrane. Amitriptyline is a tricyclic antidepressant used in the treatment of various pains. In our study on HL60 cell series, the effects of amitriptyline on cell viability were determined depending on concentration and time. It was determined that cell viability was significantly reduced in the concentration range of 20-100 μM at the end of 24 hours, 0.1-100 μM at the end of 48 hours, and 0.05-100 μM at the end of 72 hours. When HL60 cells were incubated with 40 μM and 60 μM amitriptyline for 72 hours, 60 μM amitriptyline increased caspase 3 activity and 40 μM and 60 μM amitriptyline increased early apoptosis, late apoptosis and necrosis. This drug was found to significantly reduce mitochondrial mass in HL60 cells after 72 hours of incubation at 60 μM concentration. As a result, this study will guide future studies.

Keywords: Amitriptyline, HL60, AML (Acute Myeloid Leukemia).

KAYNAKLAR

- ALEXOPOULOS GS (2005). Depression in the elderly. *Lancet* **365**(9475): 1961-1970.
- ANTAR AI, OTROCK ZK, JABBOUR E, MOHTY M, BAZARBACHI (2020). FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: ten frequently asked questions. *Leukemia* **34**(3): 682-696.
- BARBUI C, BUTLER R, CIPRIANI A, GEDDES J, HATCHER S (2007). Depression in adults: drug and physical treatments. *BMJ Clinical Evidence* **2007**.
- BRANDES LJ, ARRON RJ, BOGDANOVIC RP, TONG J, ZABORNIÁK CL, HOGG GR, WARRINGTON RC, FANG W, LABELLA FS (1992). Stimulation of malignant growth in rodents by antidepressant drugs at clinically relevant doses. *Cancer res* **52**(13): 3796-3800.
- BRYSON HM, WILDE MI (1996). Amitriptyline: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in chronic pain states. *Drugs & aging* **8**: 459-476.
- CALVÌ A, FISCHETTI I, VERZICCO I, BELVEDERI MURRI M, ZANETIDOU S, VOLPI R, COGHI P, TEDESCHI S, AMORE M, CABASSI A (2021). Antidepressant drugs effects on blood pressure. *Frontiers in cardiovascular medicine* **8**: 704281.
- CHAN KW (2002). Acute lymphoblastic leukemia. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* **32**(2): 40-49.
- COLLINS SJ (1987). The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* **70**(5): 1233-1244.
- CORDERO MD, SÁNCHEZ-ALCÁZAR JA, BAUTISTA-FERRUFINO MR, CARMONA-LÓPEZ MI, ILLANES M, RÍOS MJ, GARRIDO-MARAVAR J, ALCUDÍA A, NAVAS P, DE MÍGUEL M (2010). Acute oxidant damage promoted on cancer cells by amitriptyline in comparison with some common chemotherapeutic drugs. *Anticancer Drugs* **21**(10): 932-944.
- CROWLEY LC, WATERHOUSE NJ (2016). Detecting Cleaved Caspase-3 in Apoptotic Cells by Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* **2016**(11).
- DOHNER H, WEISDORF DJ, BLOOMFIELD DC (2015). Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **373**(12): 1136-1152.
- DREXLER HG, QUENTMEIER H, MACLEOD RA, UPHOFF CC, HU ZB (1995). Leukemia cell lines: in vitro models for the study of acute promyelocytic leukemia. *Leuk Res* **19**(10): 681-691.
- DUARTE P, CUADRADO A, LEON R (2021). Monoamine Oxidase Inhibitors: From Classic to New Clinical Approaches. *Handb Exp Pharmacol* **264**:229-259.
- ELMORE S (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**(4): 495-516.
- ERDEM HB, KAYMAK AÖ (2020). Kronik Miyeloid Lösemide Genetik Tanı. *GMJ* **31**: 224-226.

- ERSOY MA (1999). Kanser hastalarında depresyon tanısının incelenmesi.
- ESTEBE JP, MYERS RR (2004). Amitriptyline neurotoxicity: dose-related pathology after topical application to rat sciatic nerve. *Anesthesiology* **100**(6): 1519-1525.
- FANGMANN P, ASSION HJ, JUCKEL G, GONZÁLEZ CA, LÓPEZ-MUÑOZ F (2008). Half a century of antidepressant drugs: on the clinical introduction of monoamine oxidase inhibitors, tricyclics, and tetracyclics. Part II: tricyclics and tetracyclics. *J Clin Psychopharmacol* **28**(1): 1-4.
- GALER BS (1995). Neuropathic pain of peripheral origin: advances in pharmacologic treatment. *Neurology* **45**(12 Suppl 9): S17-S25.
- GESPACH C, MARREC N, BALITRAND N (1985). Relationship between 3H-histamine uptake and H2-receptors in the human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Agents Actions* **16**(3-4): 279-283.
- GORMAN JM, KENT JM (1999). SSRIs and SNRIs: broad spectrum of efficacy beyond major depression. *Journal of Clinical Psychiatry* **60**(4): 33-39.
- HALLEK M, SHANAFELT TD, EICHHORST B (2018). Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* **391**(10129): 1524-1537.
- HARDWICK JM, SOANE L (2013) Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**(2): a008722.
- ISSA GC, DINARDO CD (2021). Acute myeloid leukemia with IDH1 and IDH2 mutations: 2021 treatment algorithm. *Blood cancer journal* **11**(6): 107.
- JULIUSSON G, HOUGH R (2016). Leukemia. *Prog Tumor Res* **43**: 87-100.
- JUNG AC, STAIGER T, SULLIVAN M (1997). The efficacy of selective serotonin reuptake inhibitors for the management of chronic pain. *J Gen Intern Med* **12**(6): 384-389.
- KAFES AY (2021). Depresyon ve anksiyete bozuklukları üzerine bir bakış. *Humanistic Perspective* **3**(1): 186-194.
- KALE J, OSTERLUND EJ, ANDREWS DW (2018). BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ* **25**(1): 65-80.
- KARAMUSTAFALIOĞLU O, YUMRUKÇAL H (2011). Depresyon ve anksiyete bozuklukları. *Şişli Etfal Hastanesi Tıp Bülteni* **45**(2): 65-74.
- KARLSSON H, GU Y, DEPIERRE J, NÄSSBERGER L (1998). Induction of apoptosis in proliferating lymphocytes by tricyclic antidepressants. *Apoptosis* **3**(4): 255-260.
- KIRKIZLAR O, DEMİR AM (2012). Kronik Miyeloid Lösemi: Patogenez, Klinik Özellikler, Tanı. *Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics* **5**(2): 1-6.
- KORNHUBER J, GULBINS E (2021). New molecular targets for antidepressant drugs. *Pharmaceuticals* **14**(9): 894.

- KRISHNAN KR (2007). Revisiting monoamine oxidase inhibitors. *J Clin Psychiatry* **68 Suppl 8**: 35-41.
- LIRK P, HALLER I, HAUSOTT B, INGOROKVA S, DEIBL M, GERNER P, KLIMASCHEWSKI L (2006). The neurotoxic effects of amitriptyline are mediated by apoptosis and are effectively blocked by inhibition of caspase activity. *Anesth Analg* **102**(6): 1728-1733.
- LITTLE A (2009). Treatment-resistant depression. *American family physician* **80**(2): 167-172.
- MARCUCCI G, BYRD JC, DAI G, KLISOVIC MI, KOURLAS PJ, YOUNG DC, CATALAND SR, FISHER DB, LUCAS D, CHAN KK (2003). Phase 1 and pharmacodynamic studies of G3139, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with chemotherapy in refractory or relapsed acute leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* **101**(2): 425-432.
- MAYEGOWDA SB, THOMAS C (2019). Glial pathology in neuropsychiatric disorders: a brief review. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* **30**(4).
- MCCLURE EW, DANIELS RN (2021). Classics in Chemical Neuroscience: Amitriptyline. *ACS Chem Neurosci* **12**(3): 354-362.
- MCLLWAIN DR, BERGER T, MAK TW (2013). Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**(4): a008656.
- MEDINGER M, HEIM D, Lengerke C, HALTER JP, PASSWEG JR (2019). Acute lymphoblastic leukemia - diagnosis and therapy. *Ther Umsch* **76**(9): 510-515.
- MICÓ JA, ARDID D, BERROCOSO E, ESCHALIER A (2006). Antidepressants and pain. *Trends in pharmacological sciences* **27**(7): 348-354.
- MILLER A, HOOGSTRATEN B, STAQUET M, WINKLER A (1981). Reporting results of cancer treatment. *cancer* **47**(1): 207-214.
- MORENO-FERNÁNDEZ AM, CORDERO MD, GARRIDO-MARAVÉ J, ALCOCER-GÓMEZ E, CASAS-BARQUERO N, CARMONA-LÓPEZ MI, SÁNCHEZ-ALCÁZAR JA, DE MIGUEL M (2012). Oral treatment with amitriptyline induces coenzyme Q deficiency and oxidative stress in psychiatric patients. *J Psychiatr Res* **46**(3): 341-345.
- MOSMANN T, (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**(1-2):55-63.
- NITIKA, WEI J, HUI AM (2022). Role of Biomarkers in FLT3 AML. *Cancers (Basel)* **14**(5).
- ONCİU M (2009). Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology/oncology clinics of North America* **23**(4): 655-674.
- OTTE C, GOLD SM, PENNIX BW, PARIANTE CM, ETKIN A, FAVA M, MOHR DC, SCHATZBERG AF (2016). Major depressive disorder. *Nat Rev Dis Primers* **2**: 16065.
- ÖRSEL S (2004). Depresyonda tedavi: Genel ilkeler ve kullanılan antidepresan ilaçlar. *Klinik Psikiyatri* **4**: 17-24.
- PELCOVITS A, NIROULA R (2020). Acute Myeloid Leukemia: A Review. *R I Med J* (2013) **103**(3): 38-40.

- PERROT S, JAVIER RM, MARTY M, LE JEUNNE C, LAROCHE F (2008). Is there any evidence to support the use of anti-depressants in painful rheumatological conditions? Systematic review of pharmacological and clinical studies. *Rheumatology* **47**(8): 1117-1123.
- PILKINGTON GJ, PARKER K, MURRAY SA (2008). Approaches to mitochondrially mediated cancer therapy. *Semin Cancer Biol* **18**(3): 226-235.
- PISTRITTO G, TRISCIUOGLIO D, CECI C, GARUFI A, D'ORAZI G (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)* **8**(4): 603-619.
- PRICE J, BUTLER R, HATCHER S, VON KORFF M (2007). Depression in adults: psychological treatments and care pathways. *BMJ Clinical Evidence* **2007**.
- RAGON BK, DINARDO CD (2017). Targeting IDH1 and IDH2 mutations in acute myeloid leukemia. *Current hematologic malignancy reports* **12**: 537-546.
- RENEHAN AG, BOOTH C, POTTEN CS (2001). What is apoptosis, and why is it important? *Bmj* **322**(7301): 1536-1538.
- ROBERTS JZ, CRAWFORD N, LONGLEY DB (2022). The role of Ubiquitination in Apoptosis and Necroptosis. *Cell Death Differ* **29**(2): 272-284.
- RUNEL G, LOPEZ-RAMINEZ N, CHLASTA J, MASSE I. (2021) Biomechanical Properties of Cancer Cells, *Cells*. **10**(4):887.
- SABELLA D (2018). Antidepressant Medications. *Am J Nurs* **118**(9): 52-59.
- SAWYNOK J, ESSER MJ, REID AR (2001). Antidepressants as analgesics: an overview of central and peripheral mechanisms of action. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* **26**(1): 21.
- SCARFÒ L, FERRERI AJ, GHIA P (2016). Chronic lymphocytic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol* **104**: 169-182.
- SERTÖZ ÖÖ, METE HE (2004). Bedensel hastalıklarda depresyon. *Klinik Psikiyatri Dergisi* **7**(Suppl 2): S63-S69.
- SIEGEL RL, MILLER KD, FUCHS HE, JEMAL A (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: a cancer journal for clinicians* **72**(1): 7-33.
- SILVA FFVES, PADIN-IRUEGAS ME, CAPONIO VCA, LORENZO-POUSO A, SAAVEDRA_NIEVES P, CHAMORRO-PETRONACCI CM, SUAREZ-PENARANDA J, PEREZ-SAYAS M (2022) Caspase 3 and Cleaved Caspase 3 Expression in Tumorigenesis and Its Correlations with Prognosis in Head and Neck Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis *Int J Mol Sci* **23**(19):11937
- SJOQVIST F, BERTILSSON L, ASBERG M (1980). Monitoring tricyclic antidepressants. *Ther Drug Monit* **2**(1): 85-93.
- SPIEGEL D (1996). Cancer and depression. *The British Journal of Psychiatry* **168**(S30): 109-116.
- STAHL SM (2000). *Essential psychopharmacology: Neuroscientific basis and practical applications*, Cambridge university press.

- STONE RM, O'DONNELL MR, SEKERES MA (2004). Acute myeloid leukemia. *ASH Education Program Book* **2004**(1): 98-117.
- SUDOH Y, DESAI SP, HADERER AE, SUDOH S, GERNER P, ANTHONY DC, DE GIROLAMI U, WANG GK (2004). Neurologic and histopathologic evaluation after high-volume intrathecal amitriptyline. *Reg Anesth Pain Med* **29**(5): 434-440.
- SUSKI JM, BRAUN M, STRMISKA V, SICINSKI P (2021). Targeting cell-cycle machinery in cancer *Cancer Cell* **39**(6):759-778
- THOUR A, MARWAHA R (2023). Amitriptyline. *StatPearls*. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing.
- TOTHOVA E, FRICOVA M, STECOVA N, KAFKOVA A, ELBERTOVA A (2002). High expression of Bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Neoplasma* **49**(3): 141-144.
- VILLANUEVA-PAZ M, CORDERO MD, PAVÓN AD, VEGA BC, COTÁN D, DE LA MATA M, OROPESA-ÁVILA, M, ALCOCER-GOMEZ E, DE LAVERA I, GARRIDO-MARAVÉ J, CARRASCOSA J, ZADERENKO AP, MUNTANÉ J, DE MIGUEL M, SÁNCHEZ-ALCÁZAR JA (2016). Amitriptyline induces mitophagy that precedes apoptosis in human HepG2 cells. *Genes Cancer* **7**(7-8): 260-277.
- WANG JJ, LEI KF, HAN F (2018). Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **22**(12): 3855-3864.
- WARD E, DESANTIS C, ROBBINS A, KOHLER B, JEMAL A (2014). Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians* **64**(2): 83-103.
- WATANABE Y, SAITO H, ABE K (1993). Tricyclic antidepressants block NMDA receptor-mediated synaptic responses and induction of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neuropharmacology* **32**(5): 479-486.
- WEINBERG R.A (1996). How cancer arises. *Scientific American* **275**(3): 62-70.
- WEINBERGER MI, ROTH AJ, NELSON CJ (2009). Untangling the complexities of depression diagnosis in older cancer patients. *The Oncologist* **14**(1): 60-66.
- WHITELEY AE, PRICE TT, CANTELLI G, SIPKINS DA (2021). Leukaemia: a model metastatic disease. *Nat Rev Cancer* **21**(7): 461-475.
- WOJCIK I, SZYBKA M, GOLANSKA E, RIESKE P, BLONSKI JZ, ROBAK T, BARTKOWIAK J (2005). Abnormalities of the P53, MDM2, BCL2 and BAX genes in acute leukemias. *Neoplasma* **52**(4): 318-324.
- XIA Z., LUNDGREN B., BERGSTRAND A., DEPIERRE J.W., NASSBERGER L. (1999). Changes in the generation of reactive oxygen species and in mitochondrial membrane potential during apoptosis induced by the antidepressants imipramine, clomipramine, and citalopram and the effects on these changes by Bcl-2 and Bcl-X(L). *Biochem Pharmacol* **57**(10):1199-208.
- XU X, LAI Y, HUA ZC (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep* **39**(1).

- ZHANG Z, DU X, ZHAO C, CAO B, ZHAO Y, MAO X (2013). The antidepressant amitriptyline shows potent therapeutic activity against multiple myeloma. *Anticancer Drugs* **24**(8): 792-798.
- ZHAO JC, AGARWAL S, AHMAD H, AMIN K, BEWERSDORF JP, ZEIDAN AM (2022). A review of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Blood Rev* **52**: 100905.
- ZHOU H, XU R (2015). Leukemia stem cells: the root of chronic myeloid leukemia. *Protein Cell* **6**(6): 403-412.
- ZINK D, FISCHER AH, NICKERSON JA (2004). Nuclear structure in cancer cells. *Nature Reviews Cancer* **4**(9): 677-687.
- ZITMAN FG, LINSSEN ACG, EDELBROEK PM, STIJNEN T (1990). Low dose amitriptyline in chronic pain: the gain is modest. *Pain* **42**(1): 35-42.

