

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**EPİBRASSİNOLİD VE/VEYA TEMOZOLOMİDİN APOPTOTİK
ETKİLERİNİN TEMOZOLOMİDE DİRENÇLİ LN-18 GLİOBLASTOMA
MULTİFORME HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eren Yükseloğlu

1502060023

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

MAYIS 2021

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**EPİBRASSİNOLİD VE/VEYA TEMOZOLOMİDİN APOPTOTİK
ETKİLERİNİN TEMOZOLOMİDE DİRENÇLİ LN-18 GLİOBLASTOMA
MULTİFORME HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eren Yükseloğlu

1502060023

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

**Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN (Biruni Ünv.)
Dr. Öğr. Üyesi Alp AYAN**

MAYIS 2021

ÖNSÖZ

Lisans hayatımdan bugüne kadar, ilk günden itibaren bana daima destek veren, bildiklerini aktarmaktan hiçbir zaman çekinmeyen ve her açıdan örnek bir insan olan saygıdeğer tez danışmanım sayın Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA'ya,

Yüksek lisans eğitimim ve laboratuvarında gerçekleştirdiğim çalışmalar süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, kendimi geliştirmem konusunda beni her zaman destekleyen çok sevgili hocalarım sayın Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL, sayın Prof. Dr. Elif Damla ARISAN, sayın Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN'a,

Laboratuvar çalışmalarımnda sadece bilgilerini aktarmakla kalmayıp yüksek lisans eğitimim boyunca bu süreci çok daha keyifli hale getiren sayın Dr. Öğr. Üyesi Alp AYAN, Araş. Gör. Özge BERRAK RENCÜZOĞULLARI, sayın Araş. Gör. Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ, sayın Araş. Gör. Burcu AYHAN ŞAHİN, Araş. Gör. Sinan MERİÇ, Araş. Gör. Tamer GÜMÜŞ'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca en büyük destekçim olan, sürekli daha fazla çabalamamı ve hep daha fazlasını hedeflememi sağlayan en büyük ilham kaynağım YAĞMUR EKİN BOYOĞLU'na,

Tez çalışmalarım boyunca bilgilerini benden sakınmayan ve sayısız yardımları dokunan Kaan ADACAN, Mervenur ÇOBAN, Börteçine SEVGİN, Zeynep APAYDIN, İlayda SÖNMEZ'e,

Tüm eğitim hayatım ve yüksek lisans hayatım boyunca maddi ve manevi benden hiçbir desteğini esirgemeyen, bana sevgi ve saygıyı öğreten sevgili ailem; babam Fuat YÜKSELOĞLU, annem Gönül YÜKSELOĞLU ve ağabeyim KEREM YÜKSELOĞLU'na en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Eren Yükseloğlu

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
KISALTMALAR	vi
SEMBOL LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. GLİOBLASTOMA MULTİFORME	4
2.2. GLİOBLASTOMA MULTİFORMENİN SEMPTOMLARI	5
2.3. GLİOBLASTOMA MULTİFORMENİN DERECELENDİRİLMESİ	6
2.4. GLİOBLASTOMA MULTİFORMENİN EPİDEMİYOLOJİSİ	7
2.5. GLİOBLASTOMA MULTİFORMENİN ETİYOLOJİSİ	7
2.6. RİSK FAKTÖRLERİ	9
2.7. GLİOBLASTOMA MULTİFORMENİN TANISI	9
2.8. TEDAVİ YÖNTEMLERİ	13

2.8.1.	Cerrahi.....	14
2.8.2.	Radyasyon Terapisi.....	14
2.8.3.	Kemoterapi.....	15
2.9.	BRASSİNOSTEROİDLER.....	18
2.9.1.	Epibrassinolid.....	19
2.10.	APOPTOZ	21
2.10.1.	Dışsal Yolak	22
2.10.2.	İçsel Yolak.....	24
3.	MATERYAL VE METOT	28
3.1.	KULLANILAN MALZEMELER.....	28
3.1.1.	Kullanılan cihazlar	28
3.1.2.	Kullanılan kimyasallar	28
3.1.3.	Kullanılan hücre kültürü aparatları	28
3.1.4.	Kullanılan çözeltiler	28
3.2.	HÜCRE KÜLTÜRÜ, HÜCRE CANLILIĞI VE HÜCRE SAĞ KALIM TESTİ.....	28
3.2.1.	Hücre kültürü	28
3.2.2.	Hücre canlılığı tayini.....	28
3.2.3.	Koloni oluşumu deneyi	29
3.2.4.	Hücre sağ kalım testi.....	29
3.2.6.	Asılı damlacık deneyi.....	29

3.3.	İMMUNOBLOTLAMA.....	30
3.3.1.	Total protein izolasyonu.....	30
3.3.2.	Protein konsantrasyonlarının Bradford yöntemi ile tayini.....	30
3.3.3.	Proteinlerin hazırlanıp SDS-PAGE’de yürütülmesi.....	31
3.3.4.	Proteinlerin membrana transferi ve bloklama.....	31
3.3.5.	Primer ve sekonder antikorlarla işaretleme.....	31
3.3.6.	Protein bantlarının görüntülenmesi.....	31
3.4.	MİKROSKOBİK YÖNTEMLER.....	31
3.4.1.	Işık mikroskobu.....	31
3.4.2.	Fluoresan mikroskobu.....	32
3.5.	ÜÇ BOYUTLU HÜCRE KÜLTÜRÜ.....	32
4.	SONUÇLAR.....	33
4.1.	TEMOZOLOMİD, EPİBRASSİNOLİD VARLIĞINDA TEMOZOLOMİDE DİRENÇLİ LN18 HÜCRE HATTINDA BAĞIL HÜCRE CANLILIĞINI AZALTMIŞTIR.....	33
4.2.	TEMOZOLOMİD EPİBRASSİNOLİD VARLIĞINDA LN18 HÜCRELERİNİN KOLONİ OLUŞTURMA POTANSİYELİNİ ZAYIFLATMIŞTIR.....	34
4.3.	TEMOZOLOMİD VE EPİBRASSİNOLİDİN BİRLİKTE KULLANIMININ LN18 HÜCRELERİNDE APOPTOZU TETİKLEDİĞİ DIOC6 ve DAPI BOYAMALARIYLA GÖSTERİLMİŞTİR.....	35
4.4.	TEMOZOLOMİD VE EPİBRASSİNOLİDİN BİRLİKTE KULLANIMI LN18 HÜCRELERİNİN ÜÇ BOYUTLU YAPI OLUŞTURMA POTANSİYELİNİ ZAYIFLATMIŞTIR.....	36

5. TARTIŞMA	39
6. KAYNAKÇA	45
7. EKLER	55



KISALTMALAR

APAF-1: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1

AR: Androjen reseptörü

ATCC: American Tissue Culture Collection

ATP: Adenozin trifosfat

Bad: Bcl2-iliskili hücre ölüm agonisti

Bak: Bcl2-antagonist protein

Bax: Bcl2-iliskili X proteini

BCL-2: B-hücresi lenfoma-2

Bcl-xL: Bcl-2 benzeri protein-1

Beclin-1: Bcl-2 etkileşimli protein

Bid: BH3-etkileşim bölgesi ölüm antagonisti

Bik: Bcl-2 etkileşimli ölüm proteini

Bim: Bcl-2 benzeri protein-11

BR: Brassinosteroid

BRI1 : Brassinosteroid insensitive 1

BSA: Sığır serum albumin

CDKN2A: Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2A

CHOP: C/EBP homolog proteini

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DED: Ölüm efektör alanı

DISC: Ölüm indükleyici sinyal kompleksi

DiOC6: 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribo nükleik asit

E2F1: E2F transkripsiyon faktörü 1

EBR: Epibrassinolid

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

ERK: Ekstrasellüler sinyal tarafından düzenlenen kinaz

FADD: Fas-ilişkili ölüm bölgesi

Fas: Fas hücre yüzeyi ölüm reseptörü

FasL: Fas-Fas ligand

FBS: Fetal sığır serumu

FGFR2: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 2

FoxO : Forkhead box O

GBM: Glioblastoma multiforme

GFAP: Glial fibriler asidik proteini

Hrk: Harakiri, BCL2 ile etkileşen protein

IDH: İzositrat dehidrojenaz

MDM2: Fare çift dakika 2 homolog

MGMT: O-6-metilguanin-DNA metil transferaz

MMR: DNA yanlış eşleşme tamir sistemi

MTT: 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid

NFκB: Nükleer faktör kappa B

NHR: Nükleer steroid hormon reseptörü

Noxa: Forbol-12-miristat-13-asetat kaynaklı protein 1

PA: Poliamin

PBS: Fosfat tamponlu tuz

PI: Propidyum iyodür

PI3K: Fosfatidilinositol-3-kinaz

PTN: Pleiotropin

PUMA: p53 apoptozun yukarı regüle edilmiş modülatörü

PVDF: Poliviniliden florid

RB: Retinoblastoma

RB1: Retinoblastoma proteini 1

ROS: Reaktif oksijen türevi

SDS: Sodyum dodesil sülfat

SDS-PAGE: SDS poliakrilamid jel elektroforezi

STAT3: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü

TBS: Tris tamponlu tuz

TBS-T: TBS-Tween

TEMED: Tetrametiletildiamin

TMZ: Temozolomid

TNF- α : Tümör nekroz faktörü

TRADD: Tümör nekroz faktörü reseptör tip 1 ile ilişkili ölüm domain proteini

TRAIL: TNF ilişkili apoptoz indükleyici ligand



SEMBOL LİSTESİ

%: Yüzde

°C: Santigrat derece

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

µM: Mikromolar

g: Santrifüj kuvveti

gr: Gram

kDa: Kilodalton

L: Litre

M: Molar

mA: Miliamper

ml: Mililitre

mm: Milimetre

nm: Nanometre

pH: Hidrojen kuvveti

rpm: Dakikadaki dönüş sayısı

sa: Saat

V: Volt

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1 Tüm primer merkezi sinir sistemi gliomalarının dağılımı (n = 26.630) [29]	7
Şekil 2. 2 Dünya Sağlık Örgütü tarafından 4. derece olarak değerlendirilmiş GBM'nin genel karakteristikleri ve tanı markörleri [52]	11
Şekil 2. 3 Glioblastoma multiformede epidermal büyüme faktörü reseptörünün önemi ve alt sinyal yollarında görevli moleküller. Sarı kutucuklar içerisinde hasta örneklerinden alınmış yaygın olarak mutasyona uğramış genlerin aberasyon yüzdeleri TCGA analizi sonucuyla belirlenip verilmiştir	12
Şekil 2. 4 TMZ'ye hücresel yanıtı etkileyen anahtar DNA onarım mekanizmaları [71]	17
Şekil 2. 5 O6-metilguanin eklentilerinin O6-metilguanin-DNA metiltransferaz ile onarımı [71]	18
Şekil 2. 6 Epibrassinolidin kimyasal yapısı	21
Şekil 2. 7 Dışsal apoptoz yolağının genel bir özeti	23
Şekil 2. 8 İçsel apoptoz yolağı. İçsel apoptotik yolak, hücre içi uyarılar tarafından tetiklenir [89]	25
Şekil 2. 9 Apoptozun içsel ve dışsal yollarını gösteren şema [93]	26
Şekil 4. 1 MTT testi ile LN18 hücre hattında EBR (μ M) uygulamasının neden olduğu hücre canlılığı kaybının gösterilmesi	33
Şekil 4. 2 MTT testi ile LN18 hücre hattında TMZ (μ M) uygulamasının neden olduğu hücre canlılığı kaybının gösterilmesi	34

Şekil 4. 3 TMZ ve EBR uygulamasının LN18 hücre hattında koloni oluşumuna etkisinin kristal viyole boyaması sonrası tayini.	35
Şekil 4. 4 48 saat EBR ve TMZ uygulamalarının ardından LN18 hücrelerinin DiOC6 ve DAPI boyamaları flüoresan mikroskobu altında gözlemlenmiştir (DiOC6 Eksitasyon: 488 nm, Emisyon: 525 nm, DAPI Eksitasyon: 350 nm, Emisyon: 420 nm)	36
Şekil 4. 5 LN18 hücrelerine belirlenen konsantrasyonlarda TMZ ve/veya EBR uygulaması sonucunda yapılan asılı damlacık deneyi sonuçları. Hücrelerin petri kaplarının kapağına ekilmesinin ardından numaralandırılarak belirlenen saatler sonunda mikroskop altında gözlenerek boyutları ölçülmüştür.	37
Şekil 4. 6 TMZ ve/veya EBR uygulaması sonucunda LN18 hücrelerinin sferoid çaplarındaki değişimin yüzdesel grafik gösterimi.....	37
Şekil 4. 7 TMZ ve/veya EBR uygulaması ardından LN18 hücrelerinin çaplarındaki değişimin Matrigel kullanılarak üç boyutlu hücre kültürü yöntemiyle incelenmesi..	38
Şekil 5. 1 Kolon kanseri hücre hattı olan HCT116 ve HT-29'de EBR tarafından indüklenen apoptozun şematize edilmiş hali [8].	

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1 Primer ve sekonder GBM'nin özellikleri [11]	5
Tablo 7. 1 Kullanılan cihazlar	55
Tablo 7. 2 Kullanılan Kimyasallar	57
Tablo 7. 3 Kullanılan Hücre Kültürü Aparatları	59
Tablo 7. 4 SDS-PAGE jel içeriği	60

ÖZET

Glioblastoma multiforme (GBM), primer beyin ve merkezi sinir sistemi neoplazmalarının %16'sını içeren en yaygın malign beyin tümörüdür. Yetişkinlerdeki tüm beyin tümörlerinin %60'ından fazlasını oluşturur. GBM'ye karşı çeşitli modern tedavilere rağmen hala çok kötü prognozlu ölümcül bir hastalıktır. Hastalar genellikle tanıdan itibaren yaklaşık 14 ila 15 aylık bir ortalama hayatta kalma süresine sahiptir. Tedavinin ilk basamağında genellikle radyoterapi ve temozolomid (TMZ) kullanılmaktadır. Metile edici bir ajan olan TMZ, hastalarda yüksek DNA onarım enzimi MGMT ile uzaklaştırılır ve hastalar TMZ'ye dirençli hale gelir. Ayrıca ikinci basamak tedavide kullanılan kemoterapötik ajanların çoğu kan-beyin bariyerini geçemez. Bu bilgiler doğrultusunda araştırmanın amacı, bitkisel bir steroid olan epi brassinolidin (EBR) kan-beyin bariyerini geçtiğini ve TMZ'ye dirençli GBM hücre modellerinde apoptotik ölümü tetiklediğini göstermektir. Buna göre hedef, EBR'nin tek başına veya TMZ varlığında TMZ'ye dirençli LN18 GBM hücre hattında hücre canlılığı, hayatta kalma, koloni oluşumu ve apoptotik hücre ölümü üzerindeki etkilerini göstermektir. Bağlı hücre canlılığı, MTT deneyi ile belirlendi. EBR tedavisinden sonra LN18 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyeli koloni oluşturma deneyi ile incelendi. EBR tedavisi sonrası hücrelerin üç boyutlu formasyon oluşturma özelliklerindeki değişim, asılı damlacık ve 3D Matrigel teknikleriyle gözlemlendi. EBR'nin apoptotik etkilerini saptamak için DiOC6 ve DAPI floresan boyama yapıldı. EBR ve TMZ kombine tedavisinin LN18 hücrelerinde bağlı hücre canlılığını azalttığı gözlemlendi. EBR varlığında TMZ'nin tek başına TMZ tedavisine kıyasla koloni oluşumunu önemli ölçüde inhibe ettiği de gözlenmiştir. Kombine ilaç tedavisi ayrıca matrigel veya asılı damla yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen LN18 3D hücre kültüründe koloni çaplarını da inhibe etmiştir. Ayrıca TMZ ve EBR'nin kombine tedavisinin mitokondriyal membran potansiyelini azalttığını ve artan apoptotik indüksiyonun bir sonucu olarak DNA fragmentasyonunu arttırdığını gözlemledik. Tüm bu bilgiler, EBR'nin TMZ'ye dirençli LN18 GBM hücre hattında TMZ'nin etkinliğini arttırmak için güçlü bir aday olduğunu göstermektedir.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common primary malignant brain tumor containing 16% of all primary brain and central nervous system neoplasms. Despite various modern therapies against GBM, it is still a deadly disease with an extremely poor prognosis. Patients generally have an average survival time of about 14 to 15 months from diagnosis. Radiotherapy and temozolomide (TMZ) are generally used in the first step of treatment. TMZ, a methylating agent, is removed in patients by the high DNA repair enzyme MGMT, and patients become resistant to TMZ. In addition, most of the chemotherapeutic agents used in second-line therapy cannot pass through the blood-brain barrier. In line with this information, the aim of our research is to demonstrate that Epibrassinolide (EBR), a herbal steroid, passes through the blood-brain barrier and triggers apoptotic death in TMZ-resistant GBM cell models. Accordingly, our goals are to demonstrate the effects on cell viability, survival, and colony formation, as well as the effects on apoptotic cell death, to model the effect of EBR alone or in the presence of TMZ in TMZ-resistant LN18 GBM cell line. Relative cell viability was determined by MTT assay. Colony forming potential of LN18 cells after EBR treatment was examined by clonogenic assay. The change in the three-dimensional formation-forming properties of cells after the EBR treatment was observed with the Hanging Drop and 3D Matrigel techniques. DiOC6 and DAPI fluorescent staining was performed to detect the apoptotic effects of EBR. We observed that EBR and TMZ combined therapy decreased relative cell viability in LN18 cells. It has also been observed that TMZ, in the presence of EBR significantly inhibited colony formation compared to alone TMZ treatment. The combined drug treatment also inhibits colony diameters in LN18 3D cell culture performed using matrigel or hanging drop method. We also observed that the combined treatment of TMZ and EBR reduced mitochondrial membrane potential, and increased DNA fragmentation as a result of the increased apoptotic induction. All this information suggests that the EBR is a strong candidate for enhancing the efficacy of TMZ in the TMZ resistant LN18 glioblastoma cell line.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Glioblastoma (GBM), astrositik kökenli en agresif yaygın gliomadır ve bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından IV. dereceden glioma olarak adlandırılmaktadır. GBM, tüm gliomaların %54'ünü ve tüm primer beyin tümörlerinin %16'sını oluşturan en yaygın malign primer beyin tümörüdür. GBM'ye karşı çeşitli modern tedavilere rağmen, hala son derece kötü prognozlu ölümcül bir hastalıktır. Hastalar genellikle tanıdan itibaren yaklaşık 14 ila 15 aylık bir medyan sağkalıma sahiptir. GBM, global insidansı 100.000 kişide 10'dan az olan nadir bir tümör olmasına rağmen, teşhisten sonraki 14-15 aylık hayatta kalma oranı ile kötü prognozu, onu çok önemli bir halk sağlığı sorunu haline getirmektedir. Her yaşta ortaya çıkabilir ancak en yüksek görülme sıklığı 55 ila 60 yaş arasındadır. Malign gliomalar, kansere bağlı ölümlerin %2,5'inin nedenidir ve 15 ila 34 yaş arasındaki kişilerde kanserden ölümlerin en önde gelen üçüncü nedenidir. Erkeklerde GBM görülme sıklığı kadınlara oranlara daha yüksektir. Genellikle tedavi edilemeyen beyin neoplazmalarının etiyolojisi hakkında çok az şey bilinmektedir. Altta yatan kanserojen nedenler tanımlanamamaktadır. Bugüne kadar yüksek doz iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma, doğrulanmış tek risk faktörüdür. GBM için en sık görülen yer serebral hemisferlerdir; bu tümörlerin %95'i supratentoryal bölgede ortaya çıkarken, sadece yüzde birkaçında beyincik, beyin sapı ve omurilikte meydana gelir. Gelişen modern tedavilerine rağmen mevcut prognozun kötü olması, GBM'yi zorlayıcı bir hedef haline getirmektedir [1].

Temozolomid (TMZ), glioblastoma multiforme ve astrositomları tedavi etmek için kullanılan oral bir alkilleyici ajandır. Bununla birlikte, TMZ ile tedavi edilen hastaların en az %50'si TMZ'ye yanıt vermez. Bu, esas olarak O6-metilguanin metiltransferazın (MGMT) aşırı ekspresyonundan ve/veya GBM hücrelerinde bir DNA onarım yolunun olmamasından kaynaklanmaktadır. Çoklu GBM hücre hatlarının, TMZ dirençli hücreler içerdiği bilinmektedir [2].

Brassinosteroidler (BR'ler), hayvanların steroid hormonlarına benzer yapılara sahip bitkilerdeki bir polihidroksile steroidal fitohormon sınıfıdır. Brassinosteroidler, bitki büyümesi, gelişimi ve bağışıklık dahil olmak üzere çok çeşitli fizyolojik süreçleri düzenler. Brassinosteroid sinyalleşmesi ve diğer sinyal yollarıyla entegrasyonu, moleküler düzeyde kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır [3]. Hayvan hormonlarına benzer şekilde, brassinosteroidler hücre uzaması, hücre bölünmesi, kök büyümesi, foto-morfogenez, stomatal ve vasküler farklılaşma, tohum çimlenmesi, bağışıklık ve üreme dahil olmak üzere bitki biyolojisinin çeşitli yönlerinde önemli roller oynarlar [4]. Brassinosteroidler ayrıca bitki oksidasyon radikallerinin metabolizmasının, etilen sentezinin ve kök gravitropik yanıtının düzenlenmesinde rol oynar ve donma, kuraklık, tuzluluk, hastalık, ısı ve besin eksikliği gibi strese karşı bitkilerin tepkilerine aracılık etmede rol oynar [5]. Bitki büyüme düzenleyicisi brassinosteroid üyesi olan epibrassinolid (EBR) memeli steroid hormonlarına yapısal benzerliği olan bir polihidroksisteroiddir. EBR, kaspaz bağımlı ve nükleer steroid hormon reseptöründen (NHR) bağımsız bir şekilde çeşitli kanser hücrelerinde apoptotik etki uygular [6]. EBR'nin proliferasyona karşı etkisi, farklı kanser hatlarında doza bağımlı olarak hücre döngüsü durdurulmasını indüklemesiyle görülmüştür [7]. EBR'nin kolon kanseri hücre hatlarında hücre canlılığını ve koloni oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. EBR tedavisi ile PI3K/AKT'nin inaktivasyonunun, Foxo3a'nın yukarı regülasyonuna yol açtığı ve bunun da HCT 116 ve HT-29 hücrelerinde apoptozu indüklediği gözlenmiştir [8]. Bununla birlikte endoplazmik stresi (ER) indükleyerek kanser hücrelerinde apoptozu desteklediği belirtilmiştir [9].

Apoptoz, normal ökaryotik gelişim ve organizma homeostazının sürdürülmesi sırasında hücrelerin programlanmış olarak ayrıştırılmasından sorumlu olan, evrimsel olarak korunmuş bir hücre ölüm yolağıdır. Bu yolak, hücre yaşama ve ölüm arasındaki kararı dengeleyen hem pro-apoptotik hem de hayatta kalmayı destekleyen üyeleri içeren BCL-2 protein ailesi tarafından kontrol edilir [10]. Ölüm faktörü yolağı veya dışsal yolak FasL, TNF- α ve TRAIL gibi ölüm faktörleri tarafından aktive edilir. Bir ölüm faktörünün kendi spesifik reseptörüne bağlanması DISC (ölüm indükleyici sinyal kompleksi) oluşturur ve prokaspaz 8'in olgun aktif kaspaz 8'e işlenmesine neden olur. DISC, Fas ve FADD'nin ölüm domainleri arasındaki ve FADD'nin ölüm efektör alanları (DED'ler) ile prokaspaz 8 arasındaki homolog ilişkiler yoluyla oluşturulur.

Prokaspaz 8, kendisiyle ilişkili iki DED taşır. Genotoksik ajanlar, sitokin geri çekilmesi veya gelişimsel ipuçları tarafından tetiklenen başka bir yolda, sadece BH3 proteinleri (Bim, Bid, Bad, Bmf, Hrk, Puma ve Noxa) transkripsiyonel veya post transkripsiyonel olarak aktive edilir. Doğrudan (veya dolaylı olarak, Bcl-2'yi antagonize ederek) Bax / Bak-oligomerizasyonunu indüklerler ve oligomerize edilmiş Bax / Bak, sitokrom c'yi serbest bırakmak için mitokondriye etki eder. Sitokrom c, prokaspaz 9'un aktif kaspaz 9'a dönüşümüne aracılık etmek için bir iskele görevi gören bir heptamerik kompleks oluşturmak için APAF-1'i bağlar. Dışsal yolda aktive olan kaspaz 8 ve içsel yolda aktive olan kaspaz 9, apoptozu gerçekleştirmek için 1300'den fazla hücresel substratı ayıran prokaspaz 3'ü olgun kaspaz 3'e dönüştürür [11].

Bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasının amacı, TMZ'ye karşı dirençli olan LN18 hücre hatlarında TMZ'nin EBR ile birlikte kullanımının LN18 GBM hücrelerinin üzerindeki apoptotik etkilerini saptamaktır. EBR'nin TMZ ile birlikte ilk kez kombine olarak kullanılması, EBR'nin GBM üzerindeki etkilerini saptamak adına, elde edilecek verilerin *in vivo* ve gelecekteki faz çalışmaları için öncü olarak kullanılması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. GLİOBLASTOMA MULTİFORME

Glioblastoma multiforme (GBM), tüm primer beyin ve merkezi sinir sistemi neoplazmalarının %16'sını içeren en yaygın primer malign beyin tümörüdür [12]. Yetişkinlerdeki tüm beyin tümörlerinin %60'ından fazlasını oluşturur [13]. GBM'ler neredeyse sadece beyinde ortaya çıksa da beyin sapı, beyincik ve omurilikte de görülebilirler. Tüm primer gliomaların %61'i beyin dört lobunda görülür: frontal (%25), temporal (%20), parietal (%13) ve oksipital (%3) [14]. GBM'ye karşı çeşitli modern terapilere rağmen, hala son derece kötü prognozu olan ölümcül bir hastalıktır. Hastalar genellikle tanıdan yaklaşık 14 ila 15 aylık bir ortalama sağ kalım süresine sahiptir [15]. Bu malignitelerin başarısız prognozunun ardındaki neden, glioma hücrelerinin infiltratif doğasıdır. Bu sadece kötü prognozla değil aynı zamanda beyin nörolojik fonksiyonu, psikolojik sağlık ve yaşam kalitesi üzerindeki doğrudan etkileri ile GBM hastalarında ciddi sonuç problemlerine neden olur [16]. Başlangıçta GBM'lerin sadece gliyal hücrelerden türediği düşünülüyordu; bununla birlikte, kanıtlar nöral kök hücre benzeri özelliklere sahip birden fazla hücre tipinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Bu hücreler kök hücreden nörondan gliya farklılaşma aşamalarında. Fenotipik varyasyonlar, büyük ölçüde, hücre orijinindeki farklılıklardan ziyade sinyal yollarındaki moleküler değişiklikler ile belirlenir [17].

GBM'ler birincil ve ikincil olarak sınıflandırılabilir (Tablo 2.1). Birincil *de novo* GBM, GBM'nin %80'inden fazlasını oluşturur. Yaşlı hastalarda görülür (ortalama yaş = 64) ve tipik olarak epidermal büyüme faktörü aşırı ekspresyonu, PTN mutasyonu, CDKN2A delesyonu ve daha az sıklıkla MDM2 amplifikasyonu gözlenir [18]. İkincil GBM, düşük dereceli astrositoma veya oligodendrogliomlardan gelişir, daha genç hastalarda görülür (ortalama yaş = 45 yıl). Genellikle öncül olarak tespit edilebilen TP53 mutasyonunu içerir [19]. İzositrat dehidrojenaz-1 (IDH1) ve IDH2'deki mutasyonlar, düşük dereceli gliomanın ve sekonder GBM'nin %70-80'inde bulunurken ve birincil GBM'nin sadece %5-10'unda bulunur [20]. GBM'nin 2016 WHO

sınıflandırmasına göre, bu tümör klasik kimlikten ayrı tutulmuştur ve kendi içinde üç gruba ayrılmıştır: GBM IDH-doğal tip (dev hücre GBM, gliosarkoma ve epitelioid GBM dahil), GBM IDH-mutant, ve GBM NOS [21].

Tablo 2. 1 Primer ve sekonder GBM'nin özellikleri [22]

Durum/Özellik	Primer GBM	Sekonder GBM
IDH geninin pozitif durum mutasyonu	<5%	~80%
Önceki kanser hastalığı	Tanımlanamadı; ilk kez tespit edildi (de novo)	Diffuz astrositom; anaplastik astrostiom
Tespit edilen tüm glioblastom yüzdesi	%90	<10%
Ortalama tanı yaşı	62	44
Cinsiyet Oranı (E:K)	1.42:1	1.05:1
Ortalama genel <u>sağkalım</u>		
Cerrahi tedavi ve radyoterapi	9,9 ay	24 ay
Cerrahi tedavi, radyoterapi ve kemoterapi	15 ay	31 ay
Lokalizasyon	Supratentoryal	Ağırlıklı olarak frontal
Nekroz	Yaygın	Kısıtlı
TERT promotör mutasyonu	%72	%26
TP53 mutasyonu	%27	%81
ATRX mutasyonu	Nadir	%71
EGFR mutasyonu	%35	Nadir
PTEN mutasyonu	%25	Nadir

2.2. GLİOBLASTOMA MULTİFORMENİN SEMPTOMLARI

GBM'li hastalar, tümörün kendisinden veya daha fazla beyin şişmesine neden olan tümörü çevreleyen sıvıdan (ödem) kitle etkisi nedeniyle hızla semptomlar geliştirir. Örneğin, tanıdaki yaygın semptomlar beyindeki artan basınçla ilgilidir (mide bulantısı, kusma ve sabahları genellikle daha kötü olan şiddetli baş ağrıları). Hastalar ayrıca tümör konumuna bağlı nörolojik semptomlarla da karşılaşabilirler (örneğin: yüz, kol

veya bacağın zayıflığı veya duyuşal değişiklikleri, denge zorlukları ve nörobilişsel/hafıza sorunları). Diğer yaygın belirti ise nöbetleri içerir [23].

GBM'li hastalarda genel ve odak olmak üzere iki tip semptom gözlenir. Genelleştirilmiş semptomlar biręok beyin tümörü tipinde ortaya ęıkma eğilimindedir. Bu semptomlar arasında baş ağrısı, nöbetler, bulantı / kusma, hafıza kaybı ve normal fonksiyonda azalma sayılabilir. Odak semptomları tümörün konumuna ve büyüklüğüne bağlıdır. Tümörün büyüklüğü ve yeri sıklıkla hastalarda görülen belirti ve semptomları etkiler. Örneğin, tümör beyin dil için gerekli olan bir paręasıysa, hastanın konuşma veya konuşmayı anlamada daha fazla sorunu olabilir. Dil güçlüğü çekmekten başka, diğer odak semptomları nöbetler, kas güçsüzlüğü, duyu kaybı ve görsel değişiklikleri içerir.

2.3. GLİOBLASTOMA MULTİFORMENİN DERECELENDİRİLMESİ

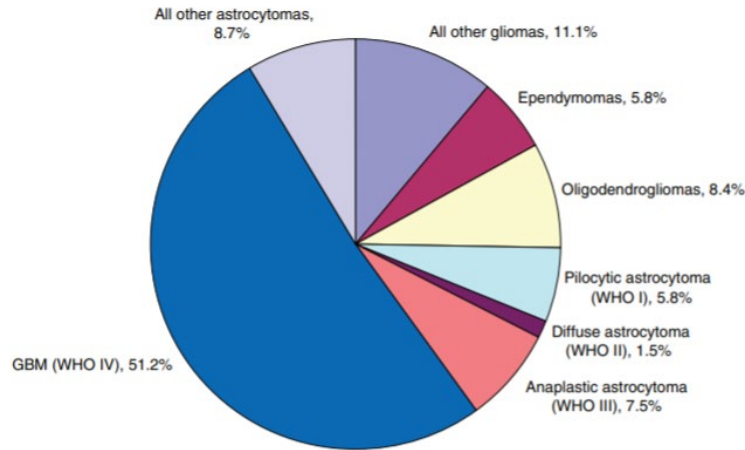
GBM, WHO 2007 sınıflamasına göre bir derece IV gliomadır ve merkezi sinir sisteminin en yaygın ve ölümcül primer malignitesidir. Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi multidisipliner tedavilere rağmen, GBM'li hastalar için medyan sağkalım süresi sadece 14,6 aydır [24]. Yüksek invazivlik derecesi nedeniyle radikal tümör rezeksiyonu iyileştirici değildir. GBM'nin, tekrarlayan GBM'nin türetildeği düşünölen yüksek derecede tümörijenik hücrelerin bir alt popölasyonunu iğerdiğine ve GBM'nin tümör oluşumunun ęoklu soylarına ayrılma kapasitesine sahip olduğuna dair deneysel kanıtlar vardır [25].

Primer GBM, daha az malign bir prekürsör kanıtı olmadan *de novo* olarak ortaya ęıkarken, ikincil GBM başlangığta düşük dereceli yaygın astrositomdan (WHO derece II yaygın astrositoma) veya anaplastik astrositomdan (derece III) gelişir. GBM'lerin ęoęunluęu (%90) primerdir ve primer GBM'si olan hastalar ikincil GBM'ye (ortalama yaş = 40 yaş) göre daha yaşlı (ortalama yaş = 55 yaş) olma eğilimindedir [26]. Primer GBM için daha tipik olan genetik değişiklikler EGFR aşırı ekspresyonu, PTN mutasyonu ve kromozom 10 kaybıdır, oysa ikincil GBM'de daha sık görölen genetik değişiklikler arasında IDH1 mutasyonları, TP53 mutasyonları ve 19q kaybı yer alır. IDH1 mutasyonu, daha iyi sonuç ve artan sağkalım ile ilişkilidir [27]. IDH1 mutasyonları, yaygın astrositoma ve anaplastik astrositomun %80'inde, ikincil

GBM'nin öncüllerinde ve birincil GBM'nin %5'inden azında bulunur. Dolayısıyla, IDH1 mutasyonu klinik ve patolojik kriterlere göre sekonder GBM için güvenilir bir objektif moleküler markördür [17].

2.4. GLİOBLASTOMA MULTİFORMENİN EPİDEMİYOLOJİSİ

GBM, dünyada 100.000 kişi başına 10'dan az insidansa sahip nadir bir tümör olmasına rağmen, hayatta kalma oranının tanıdan 14-15 ay sonra olması ile kötü prognozu, onu önemli bir halk sağlığı sorunu haline getirmektedir [28]. Tüm yaş gruplarındaki tüm gliomaların %50'sini oluşturur. Her yaşta ortaya çıkabilir, ancak pik insidansı 55 ila 60 yıl arasındadır. Malign gliomalar, kansere bağlı ölümlerin %2,5'inin nedenidir ve 15 ila 34 yaş arasındaki kişilerde kanserden ölümün üçüncü en önemli nedenidir. GBM insidansı oranı erkeklerde kadınlara göre daha yüksektir. Batı dünyası, glioma vakalarının altında raporlanması, sağlık hizmetlerine sınırlı erişim ve teşhis uygulamalarındaki farklılıklar nedeniyle daha az gelişmiş ülkelere göre daha fazla glioma insidansına sahiptir. Birkaç çalışma siyahilerin daha az eğilimli olduğunu buna karşın Asyalılar, Latinler ve Beyazlar da dahil olmak üzere diğer etnik gruplarda GBM insidansının daha yüksek olduğunu göstermiştir[1].



Şekil 2. 1 Tüm primer merkezi sinir sistemi gliomalarının dağılımı (n = 26.630) [29]

2.5. GLİOBLASTOMA MULTİFORMENİN ETİYOLOJİSİ

GBM'nin etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. GBM'nin tıbbi öykünün ilgili kişilerde glioma gelişimini tanımlamasına rağmen spontan bir tümör olduğuna

inanılmaktadır [30]. Bu tümörün ailesel formu vakaların %1'inde tanımlanmaktadır [31]. Bununla birlikte, bu tip glioblastomun gelişimi için genetik arkaplan kendiliğinden ortaya çıkanlardan farklıdır [32].

GBM genetik hastalıklar sırasında da ortaya çıkabilir. Bunlar: tüberoz skleroz, Turcot sendromu, multipl endokrin neoplazi tip IIA ve nörofibromatoz tip I. Ek olarak, beyin kontüzyonu sonucu ortaya çıkan kazanılmış kafa yaralanmaları, GBM başlangıcına yatkın olabilir [33].

GBM gelişimi, hücre döngüsünde G1/S [34] kontrol noktasının düzensizleşmesi ve glioma hücrelerinde birçok genetik bozukluğun (kromozom 10q içinde genetik materyal kaybı, EGFR, FGFR2, IRS2 ve AKT3 genlerinin amplifikasyonu ve PTEN, TP16, TP53, PARK2, PTPRD ve NF1 genlerindeki mutasyonlar) ortaya çıkması ile ilgilidir [35].

Kadınlar arasında menopoz sonrası kadınlarda ortaya çıkma riski daha yüksektir, bu nedenle cinsiyet hormonlarının GBM gelişimine katılımı üzerine bir hipotez oluşturulmuştur [36]. Bu tümörün insidansı aynı zamanda yükseklik ve vücut kitle indeksi ile ilişkilidir. Bu iki özelliğin yüksek değerleri GBM insidansı riskini artırır [37].

İnsan sitomegalovirüsü (HCMV) gibi virüslerin de glioma gelişimi için etiyolojik ajanlar arasında olduğuna inanılmaktadır. HCMV, bağışıklığı baskılanmış yetişkinlerde konjenital ansefaliti ve çoklu organ değişikliklerini indükler. İnsan sitomegalovirüsü gliyal hücreler için tropizm gösterir. Virüs, mitogenez, mutajenez, apoptoz, inflamasyon ve anjiyogenezde yer alan hücre içi sinyal yollarını aktive eden proteinleri (IE1, US28, GB gibi) kodlar. Bu genlerin ürünleri, anahtar sinyal yollarının (PDGFR, Akt, STAT3 dahil) düzensizliğine neden olmakla birlikte monosit ve glial hücre fonksiyonlarında bozulmalara neden olur [38].

İyonize radyasyon, bu tip bir tümörün gelişme olasılığını artıran fiziksel faktörlerden biridir. Pestisitler, polisiklik aromatik bileşikler ve çözücüler potansiyel olarak tehlikeli olarak kabul edilir. Elektromanyetik alanlar ve bazı metallerin de glioma gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir [39]. Cep telefonu kullanımının GBM gelişme riskini arttırmadığına inanılmaktadır, ancak cep telefonlarının uzun süreli

kullanımının etkisi hala belirsizdir. Kauçuk ve petrokimya endüstrisinde çalışan kişilerin glioma insidansı açısından daha yüksek risk altında olduğu göz önünde bulundurulunca GBM mesleki bir hastalık olarak düşünülebilir [40].

2.6. RİSK FAKTÖRLERİ

GBM riski ile ilişkili faktörler, önceki radyasyon, alerjiye karşı duyarlılığın azalması, bağışıklık faktörleri ve bağışıklık genleri ve genom çapında ilişki tarafından tespit edilen bazı nükleotid polimorfizmleridir [41]. GBM'li hastalarda ve kontrollerde astım ve alerjiye bağlı diğer germ hattı polimorfizminden objektif kanıtlarla doğrulanan bulgularla tutarlıdır. Astım riskini artıran genotipler azalmış GBM riski ile ilişkilidir. Bununla birlikte hem tanıdık glioma agregasyonu hem de alerjiler ile bağışıklık ile ilişkili durumların glioma ile ters ilişkisi tutarlı olarak gösterilmiştir. Daha düşük gliom riski, alerji veya atopik hastalık (örn. Astım, egzama, sedef hastalığı) ile ilişkilendirilmiştir. Anti-inflamatuvar ilaçların kısa süreli (10 yıldan az) kullanımı da GBM'ye karşı koruyucu bir etki ile ilişkilidir [42].

GBM riskiyle ilişkili diğer faktörler yüksek sosyoekonomik statü ve kişinin boyudur [43]. GBM'nin sigara içmek, alkol tüketimi, ilaç kullanımı veya azotlu bileşiklere diyetle maruz kalma gibi yaşam tarzı özellikleriyle ilişkili olduğuna dair önemli bir kanıt yoktur [44]. GBM hastalarının sağkalımını etkileyen prognostik faktörler arasında tümörün rezektabilitesi, yeri, büyüklüğünün yanı sıra ileri yaş, ek hastalıklar ve hastanın genel durumu yer alır [45].

2.7. GLİOBLASTOMA MULTİFORMENİN TANISI

Manyetik rezonans görüntüleme GBM için birincil tanı aracıdır. Tanı sırasında tümör çapı genellikle yaklaşık 4 cm'dir, ancak bazı verilerde 645 hastanın %38'inde tanıdaki tümör çapının 5 cm'den küçük olduğu, vakaların %56'sında 5-10 cm, %6'sında ise tümörün 10 cm olduğu belirtilmiştir [46]. Korpus kallozum içeren, bilateral olarak oksipital ve temporal loblara dönüşen tümör MR görüntülemeye bir kelebek deseni ile sonuçlanır ("kelebek glioma"). Kesin tanı ise, intraoperatif olarak çıkarılan tümörün veya parçalarının geleneksel histolojik, sitolojik ve histokimyasal yöntemler

kullanılarak histopatolojik incelemesine dayanır. Nörooperasyon tümör rezeksiyonu mümkün olmadığında, ince iğne aspirasyon biyopsisi yapılır.

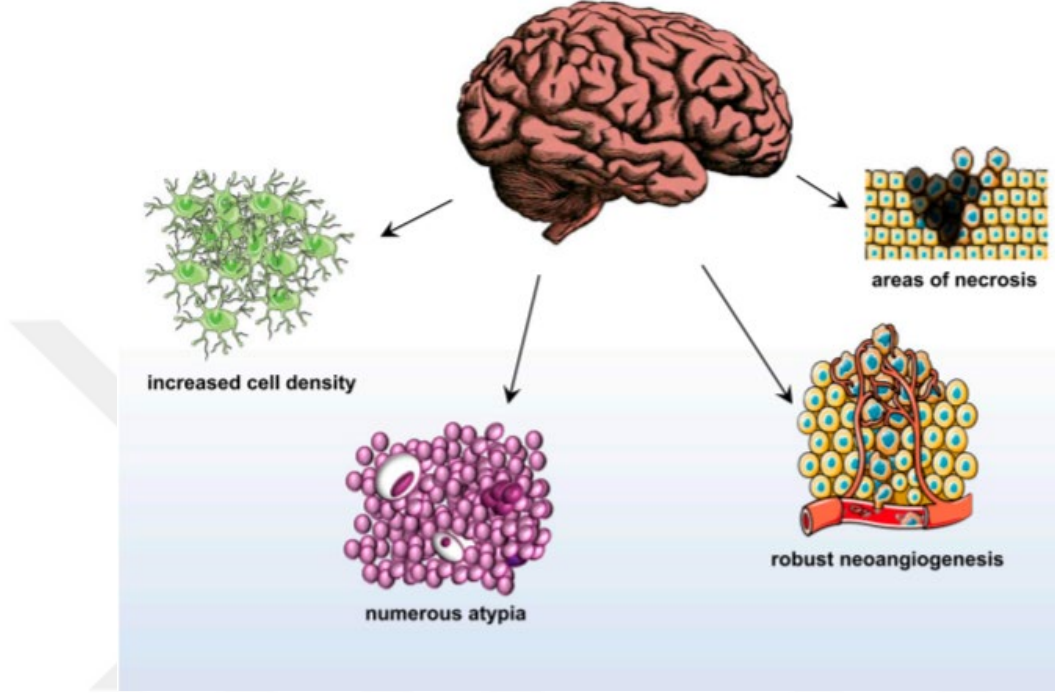
Birincil tanının doğrulanması, 50 kD kütlesi olan olgun astrositlerin ana bir ara filament proteini olan glial fibriler asidik proteinin (GFAP) glioma hücrelerinde varlığı için immünohistokimya temelinde yapılır. Bu protein hem normal hem de patolojik koşullarda astrositlerin en spesifik belirteçidir. Bu proteinin astrositlerin olgunlaşmasında rol oynadığına inanılmaktadır. Astrositik kökenli tümörlerin artan malignitesi GFAP ekspresyonunun kaybı ile ilişkilidir. GBM için benzer etkiler gözlenir, GFAP negatif glioma hücreleri pozitif hücrelere kıyasla daha hızlı çoğalır. GFAP ekspresyonu kaybı, önemli ölçüde farklılaşmamış tümör hücrelerini gösterir, ancak tümör ilerlemesi ve gelişimi hakkında karar vermez. Bazen GFAP ve karakteristik lipomatöz sitoplazmalı astrositler oluşabilir. Gliyal hücrelerde bulunan asit proteini S100, merkezi sinir sistemi tümörleri için başka bir spesifik markördür, ancak ekspresyonu ayırıcı tanıda temel bir kriter oluşturamaz.

GBM yönetiminin temel sorunlarından biri, etkili teşhis stratejilerinin olmaması ile ilgilidir. Şu anda, GBM'lerin saptanması için ana teşhis yöntemleri, hastalık zaten ileri bir aşamada olduğunda yapılan nörolojik testlere ve nörogörüntüleme yöntemlerine dayanmaktadır [47]. GBM'nin geç teşhisi esas olarak, beyin tümörlerine özgü yavaş yayılma sürecinden kaynaklanır, bu da yapıların tümör kütlelerinin neden olduğu hem kompresyona hem de deformasyona yavaş yavaş adapte olmasını sağlar. Bu nedenle, beyin dokusuna tümör penetrasyonunun belirgin morfolojik belirtileri durumunda bile, klinik belirtiler tamamen mevcut olmayabilir [48]. Bununla birlikte, antianjiyogenik ilaçları veya kemo-radyoterapiyi kullanan, nörogörüntüleme analizlerinden gelen sonuçları önemli ölçüde aldatabilen ve böylece takibi daha da zorlaştıran hastalarda büyük bir dezavantaj söz konusudur [49].

GBM'den mustarip hastalarda uygun bir tedavi ve prognoz seçimi, tümör konumuna, histolojik derecesine, genetik profiline, proliferatif indekse, cerrahi rezeksiyonun tamlığına ve hastanın yaşı ve radyoterapi öncesi Karnofsky performans durumu ölçeğindeki (KPS) pozisyonuna bağlıdır [50]. KPS, bir hastanın genel durumunu ve onkoloji ve palyatif tıpta yaşam kalitesini tanımlamasına izin verir. Performans ölçeği

0 ila 100 puanlı 11 pozisyon içerir; 100 puan hiçbir hastalık kanıtı olmadığını, 0 puan ise hastanın ölümünü gösterir [51].

GBM tümörleri histolojik olarak teşhis edilmiştir ve artmış hücre yoğunluğu, anormal hücre tipleri (atipi), nekroz alanları ve güçlü anjiyogenez ile karakterizedir.



Şekil 2. 2 Dünya Sağlık Örgütü tarafından 4. derece olarak değerlendirilmiş GBM'nin genel karakteristikleri ve tanı markörleri [52]

Gliomagenезin gerçekleşmesi için bazı moleküler sapmalar gereklidir. Bunlar p53, retinoblastoma (RB) ve reseptör tirozin kinaz/Ras/fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (AKT) sinyal yollarındaki mutasyonlardır. RB ve p53 birçok kanser tipinde fonksiyonunu yitiren tümör baskılayıcılarıdır [53]. Epitelyal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ekspresyonu bazı GBM tümörlerinde artış gösterir, bu da reseptör tirozin kinaz/Ras/PI3K/AKT sinyal yolağı aracılığıyla hücre canlılığındaki artışa neden olur. Kanıtlanmış gliomagenез araçları EGFR, p53 ve retinoblastoma proteini (RB1) kanser sinyal iletimi için önemlidir. EGFR, yapısal olarak aktif EGFRvIII'e amplifiye edilir veya çoğaltılır. Bu da proliferasyon, invazyon ve anjiyogenez teşvik etmek için kinaz sinyalleme kaskadlarını çoğaltır. p53 bir tümör baskılayıcı olup GBM'de mutasyona uğramıştır ve bu da B hücreli lenfoma 2'nin (BCL2) apoptozu inhibe etmesine neden olur. Bir başka tümör baskılayıcı olan RB ise inaktif olduğunda hücre

bilgisayarlı tomografi (BT) ve tümörleri görselleştirmek amacıyla daha rutin olarak kullanılan manyetik rezonans görüntüleme (MR) taramaları gibi invaziv olmayan testler bulunur. BT taramaları, genellikle bir hasta, örneğin kalp pili olan hastalar nedeniyle MR taramasına giremediğinde önerilmektedir [58]. BT taramasında lezyonlar genellikle bitişik beyin dokusuna kıyasla hipointens alanları olarak görülür ve genellikle orta ila şiddetli ödem sonucunda orta hat kayması gösterir. Bununla birlikte, kullanılan altın standart görüntüleme tekniği, üstün yumuşak doku kontrastı nedeniyle MR taramalarıdır, bu da tümör lezyonunun karmaşıklığının ve heterojenliğinin BT taramasından daha iyi görüntülenmesini sağlar. Hiperense lezyonlar T1 ağırlıklı MR taramalarında görülürken, hiperintens lezyonlar proton yoğunluğu ağırlıklı ve T2 ağırlıklı görüntülerde görselleştirilir. Malign gliomlu hastaların gadolinyum ile zenginleştirilmiş MR taramasında olağan bulgular, beyaz cevher ödemi ile çevrili merkezi bir nekroz alanı göstermektedir. Tümörler genellikle unifokaldır, ancak multifokal da olabilir.

Görüntüleme tekniklerinde ve özellikle MR'da son birkaç yıldaki gelişmeler, hemodinamik, doku mimarisi ve gliomaların hücresel metabolizmasındaki değişikliklerin değerlendirilmesine de yardımcı olmuştur. Nükleer tıp teknikleri olan tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi (SPECT) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) de aktif tümör ile tümördeki tedaviyle ilgili değişiklikleri ayırt etmek için problem çözme araçları olarak kullanılmaktadır [56].

2.8. TEDAVİ YÖNTEMLERİ

Birçok uluslararası çabaya rağmen, GBM tedavisi hala klinik onkolojide en zorlu görev olarak nitelendirilmektedir. Son on yılda, çok sınırlı başarı ile bir dizi farklı tedavi araştırılmıştır [59].

GBM tedavisindeki temel zorluklar hastalığın lokalizasyonu karmaşık yapısı ve heterojenitesi ile ilgilidir [60]. Cerrahi yaklaşımlar, radyoterapi ve adjuvan kemoterapideki ilerlemeler, GBM hastalarının hayatta kalma ve yaşam kalitesinde kademeli iyileşmeler göstermiştir, ancak prognoz hala iç karartıcıdır. Bununla birlikte, başarılı bir şekilde tedavi edilebilecek diğer bazı kanserlerde görülen benzer olumlu

sonuçları görebilmek için çok daha önemli bir hızda çalışmaların yapılması gerekmektedir [15].

Yüksek dereceli glioma hastaları için mevcut bakım standardı sadece terapötik yönetimi (yani anti-tümör tedavisi) değil, aynı zamanda hastaya etkili destekleyici bakım sağlamayı da içerir. Etkili bir destekleyici bakım, serebral ödem, nöbetler, gastrointestinal sistem bozuklukları, osteoporoz, venöz tromboembolizm, bilişsel bozukluk ve duygudurum bozukluklarının yönetilmesini içeren çeşitli hastalık belirtilerini ve semptomlarını yönetmeyi gerektirir [61]. Nörolojik semptomların semptomatik olarak hafifletilmesi, kortikosteroidlerin uygulanmasıyla sağlanır; ancak önemli yan etkileri nedeniyle genellikle tedavi rejiminin erken dönemlerinde azalır. Deksametazon, yavaş mineralokortikoid aktivitesi nedeniyle bu hastalarda genellikle tercih edilen kortikosteroiddir. Nöbetleri olan hastalarda, düşük toksisite profili nedeniyle ve kemoterapötik ajan ile ilaç etkileşimi olmaması nedeniyle Levetirasetam sıklıkla önerilir. Spesifik terapötik tedavi, radyasyon ve eşlik eden adjuvan temozolomid (TMZ) tedavisi ile birlikte tümörün cerrahi rezeksiyonunu içerir [59].

2.8.1. Cerrahi

Cerrahi standart bakımın temel bileşenidir. Tümör tipine bağlı olarak cerrahi operasyon tümör yükünün azaltılması, kontrol nöbetleri, nörolojik eksikliğin tersine çevrilmesi, lokal terapötik ajanın getirilmesi ve yaşam kalitesinin iyileştirilmesi gibi birçok şeyi başarabilir [62]. Cerrahi rezeksiyonun derecesi tümörün dahil olduğu beyin bölgesine bağlıdır. GBM, lokal olarak çok invaziv bir tümördür. Tamamen cerrahi operasyon ile tedavi edilemez ve nüksetme vakaların yaklaşık %80'inde genellikle orijinal lezyonun 2-3 cm yakınlarında ortaya çıkar. Bununla birlikte, yeni tanı konmuş hastalar durumunda cerrahi rezeksiyonun boyutu prognostik değer taşır, ancak yine de etkili korteks, beyin sapı veya bazal gangliyonlar gibi bölgelerde bulunan tümörler cerrahi müdahaleye uygun değildir [63]. Bu hastalar genellikle daha kötü prognoza sahiptir.

2.8.2. Radyasyon Terapisi

Cerrahi tedaviyi, kalan tümör hücrelerini öldürmek için radyoterapi izleyebilir. Yüksek dereceli gliom ve tekrarlayan GBM'ye sahip hastaların brakiterapi ve

stereotaktik radyocerrahi uygulamalarıyla yaşam beklentilerinin iyileştirildiği ancak yeni teşhis edilen GBM'nin tedavisinde etkinin belirsiz olduğu saptanmıştır [63]. Total rezeksiyon yapılan hasta alt grupları stereotaktik radyoterapi aldıktan sonra sağkalım avantajı elde edebilir. Aksine, hiperfraksiyone radyoterapi, GBM'deki sağkalım sonuçlarının bazı hasta alt gruplarında aslında olumsuz olabileceğini göstermiştir [64]. GBM'nin invaziv doğası, radyasyon nekrozu, radyasyona bağlı kalıcı nöron hasarı ve bazı tümörlerin radyo-direnci gibi radyasyon tedavisi ile ilgili bazı sınırlamaları ve risk faktörleri vardır [28].

Yoğunluk modülasyonlu radyasyon tedavisi ve bor nöron yakalama tedavisi, yakın zamanda malign gliomları olan hastalarda etkinliklerini değerlendirmek için yapılan yeni radyasyon bazlı tedavi yöntemlerindendir. Bu terapilerle yapılan tedavi daha az toksisite, normal dokulara daha az maruz kalma göstermiştir. Sonuçlar bu yöntemlerin beyin tümörü hastalarında kullanılan geleneksel radyoterapiden daha kalitesiz olmadığını göstermektedir [61].

2.8.3. Kemoterapi

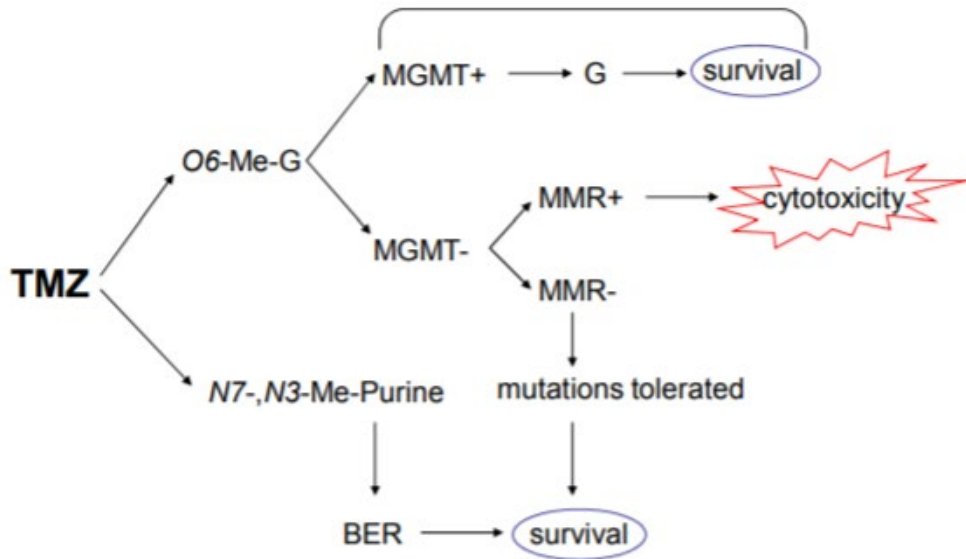
Hastaların sağkalımlarını iyileştirmek için çeşitli kemoterapötik ajanlar GBM tedavisinde etkinliği açısından test edilmiştir. Bunlardan temozolomid veya TMZ (metilasyon ajanı), karmustin veya BCNU (bis-kloroetilnitrosourea) ve CCNU (lomustin) gibi alkilleyiçi ajanlar bir miktar avantaj göstermiştir ve GBM'nin çoğunda klinik olarak kullanılmıştır [65]. BCNU ve CCNU fazlasıyla sitotoksiktir ve bu ilaçlarla tedavi, faydalarını daha da sınırlandıran erken direnç gelişimi ile sonuçlanır ve birçok yan etkisi tespit edilmiştir. Klinik çalışmalar BCNU kapsüllerinin bazı önemli sağkalım faydaları gösterdiğini, ancak yine de korkunç yan etkilerle ilişkili olduğunu göstermiştir. Karboplatin, oksaliplatin, etoposid ve irinotekan, yukarıda belirtilen ilaçlara cevap vermeyen hastalar için ikinci basamak ilaçlardır. Prokarbazin ve vinkristin TMZ baskınlığından önce CCNU ile birlikte kullanılabilen ilk basamak ilaçlar olarak kullanıldı. GBM için diğer kemoterapötik yaklaşımlar; anti-VEGF monoklonal antikoları (Bevacizumab), anti-FGF antikoları, EGFR'yi (Erlotinib ve Gefitinib) hedefleyen monoklonal antikoları ve tirozin kinaz inhibitörlerini içerir [28].

2.8.3.1. Temozolomid (TMZ)

Küçük (194 Da) lipofilik bir molekül olan TMZ, imidazotetrazin sınıfının oral yoldan temin edilebilen tek fonksiyonlu bir DNA alkilleyici ajandır. TMZ, asidik pH değerlerinde stabil olan, ancak pH 7'nin üzerinde kararsız olan ve pH 7.4'te 1,8 saatlik plazma yarı ömrü olan bir ön ilaç görevi görür [66]. Böylece, TMZ hızla bozulmadan emilir, ancak daha sonra monometil triazen 5- (3-metiltriazen-1-il) -imidazol-4-karboksamid (MTIC) oluşturmak için kendiliğinden parçalanır. MTIC ayrıca 5-aminoimidazol-4-karboksamid (AIC) ve yüksek derecede reaktif metildiazonyum katyonunu serbest bırakmak için su ile reaksiyona girer. Aktif türler metildiazonyum katyonu tercihen guanin bakımından zengin bölgelerde guaninin N7 pozisyonlarında DNA'yı metile eder, aynı zamanda N3 adenin ve O6 guanin kalıntılarını da metillendirir [67].

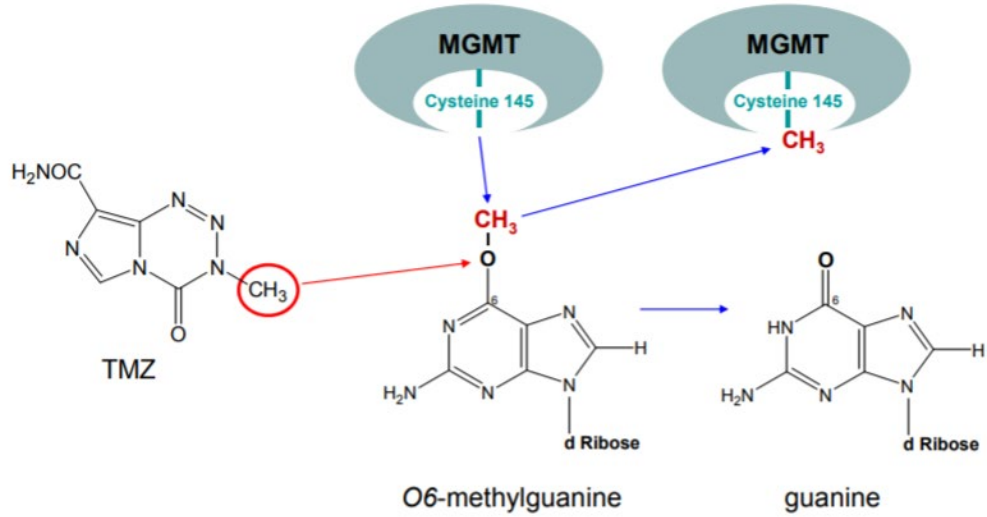
Temozolomid sitotoksitesine öncelikle kanserojen, mutajenik ve toksik bir lezyon olan O6-MeG aracılık eder [68]. O6-MeG'nin metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT) intihar enzimi tarafından doğrudan onarılması, guanini geri yükleyerek metil eklentisini çıkarır. Onarılmamış O6-MeG DNA replikasyonu sırasında timinle yanlış eşleşerek DNA yanlış eşleşme tamir sistemini (MMR) uyarır [69]. MMR özellikle yavru iplikteki yanlış eşleşmiş timini tanır ve keser, ancak O6-MeG kalıp iplikte devam eder. Bu nedenle, boşuna timin yeniden yerleştirme ve eksizyon döngüleri kalıcı DNA ipliği kopmalarına neden olarak replikasyon çatalının çökmesine neden olur. ATR / CHK1'e bağlı sinyalleme yoluyla tedaviyi takiben ikinci hücre döngüsünde meydana gelen G2 / M hücre döngüsü durdurması tetiklenir; nihayetinde

apoptoz ortaya çıkar. TMZ'ye iyi bir yanıt bu nedenle fonksiyonel MMR ve düşük MGMT seviyeleri gerektirir [70].



Şekil 2. 4 TMZ'ye hücresel yanıtı etkileyen anahtar DNA onarım mekanizmaları [71]

MGMT (O6-Alkilguanin-DNA alkiltransferaz; AGT), O6-alkilguanin eklentilerini, diğer herhangi bir protein veya kofaktörden bağımsız olarak tek bir adımda onarır. Hem sitoplazmada hem de çekirdekte bulunan küçük bir proteindir (22 kDa). DNA alkillenmesinin üzerine daha fazla nükleer lokalizasyona geçiş onarım işlemini kolaylaştırabilir [72]. MGMT sadece O6-MeG'yi değil, aynı zamanda etil, kloroetil, hidroksietil, n-propil, n-butil ve benzil veya piridiloksobutil grupları tarafından sağlanan daha büyük O6-alkil eklentileri ile guanin kalıntılarını onarabilir, ancak eklenti boyutu arttıkça verim azalır [73]. O6-alkil grubu, guaninden DNA'nın onarılması ve MGMT'nin inaktive edilmesi yoluyla stokiyometrik bir grupta MGMT'nin aktif bölge sistein kalıntısına (Cys 145) aktarılır [74]. MGMT, hasarlı substrat DNA'sını minör olukta bağlar, hedef baz daha sonra sarmaldan döndürülür ve MGMT'ye bağlanır, bu da DNA bağlanma alanının uyumunu değiştirerek alkillenmiş MGMT'nin DNA'dan ve ubiquitin / proteazomal sistemden ayrılmasına izin verir. MGMT hücreleri karsinogenlerden korur; bununla birlikte kanser hücrelerini TMZ gibi kemoterapötik alkilleyici ajanlardan da koruyabilir [75].



Şekil 2. 5 O6-metilguanin eklentilerinin O6-metilguanin-DNA metiltransferaz ile onarımı [71]

2.9. BRASSİNOSTEROİDLER

Brassinosteroidler (BR) bitkilerde steroid kökenli hormonlardan olup bitki büyüme ve gelişme düzenleyicileri olarak görev yapmaktadırlar. Brassinosteroidler ilk olarak *Brassica napus* yani kanola bitkisinin polen özütünde keşfedilmiş, hücre büyümesinin düzenlenmesinde rol aldığı gösterilmiştir [76]. Daha sonra yüksek bitkilerde, bitkinin canlı ve büyüyen tüm dokularında sentezlendiği tespit edilmiştir. Bu aşamada bitkilerde yaklaşık 70 farklı brassinosteroid bulunduğu kaydedilmiştir [77]. Oldukça zor izole edilebilen brassinosteroidler aynı zamanda bitkilerde çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. Yaklaşık 230 kg bitki poleninden sadece 10 mg kadar brassinosteroid izole edilebilmektedir [78].

Brassin aktif bileşeninin gerçek kimyasal doğası, birkaç USDA laboratuvarının pilot bitki çözücü ekstraksiyonları ve kapsamlı kolon kromatografisini içeren büyük bir koordineli çabadan sonra keşfedildi. Net sonuç, tekli kristal X-ışını analizi ile brassinolide adı verilen steroidal bir lakton olarak tanımlanan 4 mg saf bir maddedir. [76] İki yıl içinde brassinolide (BL) ve stereo izomeri 24-epiBL kimyasal olarak sentezlenmiş ve bu tür büyük bitki ekstraksiyon prosedürlerine olan ihtiyacı ortadan kaldırmıştır [79].

BL, 5a-kolestanın bir polihidroksillenmiş türevidir. Bu nedenle bitkiler, omurgalılardan gelen androjenler, östrojenler, kortikosteroidler ve böcekler ile

kabuklulardan ekdisteroidler gibi kolesterolden türetilen hayvan steroid hormonlarına yapısal benzerliğe sahip büyümeyi teşvik eden bir steroid içerir. BR ailesi BL ve yaklaşık 68 serbest BR'den artı birkaç konjugattan oluşur [80]. Bunlar A halkasındaki C-2 ve C-3'teki varyasyonlarla BL'den farklıdır. B halkasında C-6'da bir lakton, keton veya de-okso fonksiyonunun varlığı; yan zincirdeki hidroksil gruplarının stereokimyası ve C-24'te bir metil (metilen) veya etil (etilen) grubunun varlığı veya yokluğu. Bilinen BR'lerin birçoğu BL'nin biyosentetik öncüleri veya metabolik ürünleridir, ancak BL'nin hemen öncüsü olan kastasteronun bazı bitkilerde bağımsız biyolojik aktiviteye sahip olduğuna inanılmaktadır. Normalde BL'de en yüksek BR aktivitesi için bulunan optimal yapı, C-6 / C-7'de bir lakton işlevi, C-2 ve C-3'te cis-benzeri hidroksiller, C-22 / C-23'deki hidroksillerin R konfigürasyonundan ve C-24'deki metil değişimidir [81].

2.9.1. Epibrassinolid

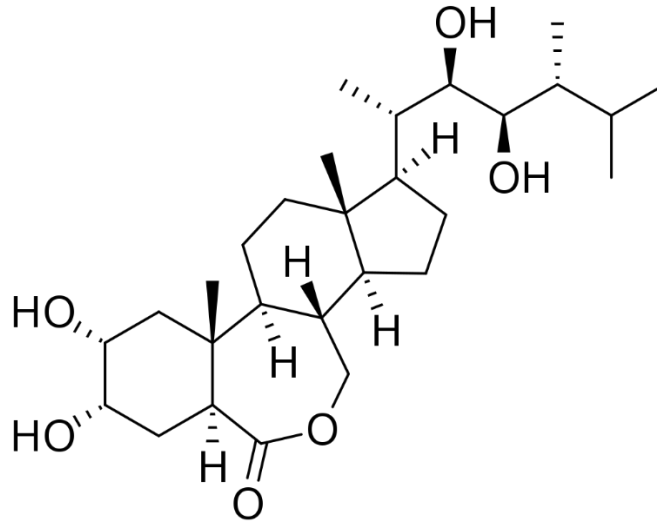
Brassinosteroidlerin (BR) aktif üyelerinden biri olan epibrassinolid (EBR), meme, prostat, akciğer, serviks kanseri, lösemi ve melanom gibi çeşitli kanser türlerindeki anti-kanser özellikleri nedeniyle araştırılmıştır. Hücreleri EBR'ye eksprese eden nükleer hormon reseptörünün (NHR) duyarlılığı, östrojenler ve androjenler gibi hayvan steroidlerine yapısal benzerliği ile açıklanmıştır. EBR'nin bilinmeyen bir mekanizmasının NHR steroid bağlanma bölgesini bloke ettiği, nukleusa translokasyonu inhibe ettiği ve hücre proliferasyonu ile ilişkili gen ifadelerini bastırdığı öne sürülmektedir. Brassinosteroid duyarsız 1 (BRI1) ve BRI1 ile ilişkili reseptör kinaz (BAK1) ile oluşturulan bir transmembran heterodimer BR reseptörü aracılığıyla bitkilerde iyi bilinen sinyalleme mekanizmasının yanı sıra, EBR'nin kesin mekanizması memeli hücrelerinde hala belirsizdir. EBR, nörodejeneratif, steroid kaynaklı bozuklukları ve kanseri, yani artan hücre proliferasyonu ile karakterize edilen hastalıkları tedavi etmek için önemli bir molekül olarak önerilmiştir. EBR'nin proliferasyona karşı etkisi, farklı kanser hatlarında doza bağımlı olarak hücre döngüsü durdurulmasını indüklemesiyle görülmüştür [7].

Yapılan çalışmalarda EBR'nin prostat kanseri hücre hatları üzerindeki etkilerini göstermiştir. EBR'nin, androjen reseptörü (AR) bulunan ve bulunmayan hücre hatlarında -sırasıyla LNCaP ve DU145- mitokondri aracılığıyla indüklediği görülmüştür.

Böylelikle EBR etkisinin prostat kanseri hücre hatlarında AR'den bağımsız olarak apoptozu indüklediği görülürken bununla birlikte prostat epitel hücre hattı olan PNT1A'e etki etmediği gösterilmiştir. Bu da EBR'nin prostat kanseri tedavisinde epitel hücrelere zarar vermeden prostat kanseri üzerinde terapötik bir etki oluşturabileceğini göstermiştir [82].

Yapılan bir başka çalışmada ise EBR'nin kolon karsinom hücrelerinde stresle ilişkili ve hayatta kalma sinyal molekülleri üzerindeki potansiyel apoptotik etkisi araştırılmıştır. EBR'nin, HCT 116 ve HT-29 kolon karsinom hücrelerinde hücre canlılığını ve koloni oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. EBR tedavisi ile PI3K/AKT'nin inaktivasyonunun, Foxo3a'nın yukarı regülasyonuna yol açtığı ve bunun da HCT 116 ve HT-29 hücrelerinde apoptozu indüklediği belirtilmiştir. EBR tedavisini takiben esas olarak HCT 116 hücrelerinde üç ana hücresel yanıt gözlenmiştir: PI3K / Akt yolağının inhibisyonu yoluyla Foxo3a'nın defosforilasyonu, MAPK'lar tarafından c-Myc indüksiyonu ve bunun sonucunda poliamin (PA) havuzunda azalma ve son olarak PA katabolik makinenin aktivasyonunun reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini sağlaması [8].

EBR'nin ER stresi üzerindeki etkisi de incelenmiştir. EBR'nin kanser hücrelerinde ER stresini indükleyerek apoptozu tetikleyebileceği gösterilmiştir. Normal hücrelerin EBR tedavisine önemli bir direnç gösterdiği ve apoptotik ölümden kaçtıkları tespit edilmiştir. Katlanmamış protein yanıtı, katlanmamış / yanlış katlanmış proteinleri temizler ve ER işlevlerini geri yükler. Stres kronik olduğunda, hücreler hatalı hücresel işlevler göstermesi nedeniyle ölme eğilimindedir. EBR'nin malign olmayan hücrelerdeki etkisini anlamak için, bu çalışmada ER stres biyobelirteçleri, otofaji ve poliamin metabolizması için fare embriyonik fibroblast (MEF) hücreleri ayrıntılı olarak incelenmiştir. Veriler EBR uygulanmasının sonucunda ER stresinin MEF hücrelerinde ve MEF Atg5 - / - hücrelerinde indüklendiğini ve EBR'nin kanser hücreleri için seçici sitotoksositeye sahip bir antikanser ilaç adayı olduğunu göstermiştir [9].



Şekil 2. 6 Epibrassinolidin kimyasal yapısı

2.10. APOPTOZ

Apoptoz terimi ilk olarak 1972'de Kerr tarafından morfolojik olarak farklı bir hücre ölümü formunu tanımlamak için kullanıldı, ancak apoptoz kavramının bazı bileşenleri yıllar önce açıkça tanımlanmıştı. Memeli hücrelerinde apoptoz sürecinde yer alan mekanizmalar hakkındaki anlayışımız, nematod *Caenorhabditis elegans*'ın gelişimi sırasında meydana gelen programlanmış hücre ölümünün araştırılmasından kaynaklanmaktadır. Bu organizmada yetişkin solucanın oluşumunda 1090 somatik hücre üretilir, bunlardan 131 tanesi apoptoz veya "programlanmış hücre ölümü" geçirir. Bu 131 hücre, solucanlar arasında esasen değişmez olan bu süreçte dikkat çekici doğruluk ve kontrolü gösteren geliştirme sürecinde belirli noktalarda ölmektedir. Apoptoz o zamandan beri, hücrelerin genetik olarak belirlenmiş eliminasyonunu içeren "programlanmış" hücre ölümünün ayırt edici ve önemli bir modu olarak kabul edilmiş ve kabul edilmiştir. Bununla birlikte, programlanmış hücre ölümünün diğer formlarının tarif edildiğini ve programlanmış hücre ölümünün diğer formlarının hala keşfedilebileceğini belirtmek önemlidir.

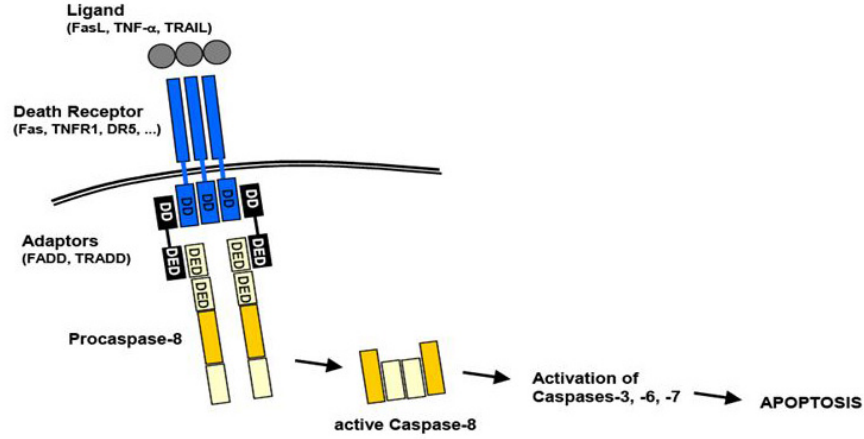
Apoptoz, normal olarak gelişme ve yaşlanma sırasında ve dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizma olarak ortaya çıkar. Apoptoz ayrıca bağışıklık reaksiyonlarında veya hücrelerin hastalık veya zararlı maddelerden zarar görmesi gibi bir savunma mekanizması olarak da ortaya çıkar. Apoptozu tetikleyebilen hem fizyolojik hem de patolojik çok çeşitli uyaran ve koşullar

olmasına rağmen, tüm hücreler uyarana aynı yanıt olarak ölmeyecektir. Işınlama veya kanser kemoterapisi için kullanılan ilaçlar, bazı hücrelerde DNA hasarıyla sonuçlanır ve bu da p53'e bağlı bir yoldan apoptotik ölüme yol açabilir. Kortikosteroidler gibi bazı hormonlar, bazı hücrelerde apoptotik ölüme yol açabilir, ancak diğer hücreler etkilenmez veya hatta uyarılır. Bazı hücreler ligand bağlanması ve protein çapraz bağlanması yoluyla apoptoza yol açabilen Fas veya TNF reseptörlerini eksprese eder. Diğer hücrelerin, hormon veya büyüme faktörü gibi bir hayatta kalma faktörü tarafından engellenmesi gereken varsayılan bir ölüm yolağı vardır. Apoptozu nekrozdan ayırt etme konusu da vardır; bu, bağımsız, sırayla ve aynı anda gerçekleşebilen iki süreçtir. Düşük dozlarda, ısı, radyasyon, hipoksi ve sitotoksik anti kanser ilaçları gibi çeşitli zararlı uyaranlar apoptozu indükleyebilir, ancak bu aynı uyaranlar daha yüksek dozlarda nekroza neden olabilir.

Apoptoz mekanizması temel olarak apoptozun indüklenmesinde rol oynayan iki temel yoldan oluşur; dışsal yolak ve içsel yolak. Dışsal yolak, DR aracılı yolak anlamına gelir ve içsel yolak, mitokondriyal aracılı bir yoldur. Bu apoptotik yolakların her ikisi de aynı sonuca ulaşabilir (ölüm yolağı).

2.10.1. Dışsal Yolak

Apoptoz, hücre delesyonunun fizyolojik bir süreci olarak bilinir ve aynı zamanda programlanmış hücre ölümü sürecidir, bu da morfolojik değişiklik ve DNA parçalanması ile sonuçlanır. Biri ölüm reseptörünün aracılık ettiği dışsal yolak olan hücrelerin dış veya iç olayları tarafından uyarılır. Ölüm reseptörleri arasında Fas reseptörleri, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörleri ve TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) reseptörleri bulunur. Bir yüzey reseptörü olarak örneğin, TNF reseptörü-1 (TNF-R1) TNF ile etkileşime girerek dışsal yolağın kritik bir aracısı olan ve sonunda hücre apoptozuna neden olan kaspaz-8 dahil olmak üzere bir dizi faktörü sağlayan ölüm domainli Fas ile ilişkili protein (FADD) ve Tümör nekroz faktörü reseptör tip 1 ile ilişkili ölüm domain proteininin (TRADD) indüklenmesini sağlar.



Şekil 2. 7 Dışsal apoptoz yolağının genel bir özeti

Apoptozu başlatan dışsal yolak, TNFR1'e TNF- α gibi bir ölüm reseptörüne bağlanan bir ölüm ligandı ile tetiklenir. TNFR ailesi, homotrimerlerde düzenlenen ve ilgili ligand veya ligandların bağlanmasıyla aktive edilen 29 transmembran reseptör proteininden oluşan büyük bir ailedir. Benzer sistein bakımından zengin hücre dışı alanları paylaşırlar ve "ölüm domaini" (DD) adı verilen yaklaşık 80 amino asitlik sitoplazmik alana sahiptirler. Bu ölüm domaini, ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yollarına iletilmesinde kritik bir rol oynar. TNF ligand ailesinin 19 üyesi vardır ve bağlanma, aktive edilmiş reseptör ile ilişkili adaptör proteinlerine bağlı olarak proliferasyon, enflamasyon ve apoptoz dahil olmak üzere bir dizi yanıtı neden olabilir.

TNFR ayrıca RIP alımı yoluyla NF κ B'nin aktivasyonuna yol açan pro-inflamatuar yolları da uyarabilir. Ölüm domaini kinaz RIP, TRAIL ile indüklenen I κ B kinaz (IKK) aktivasyonu için gereklidir. TNF- α ve TNFR1'in bağlanmasının, hücre tipine ve biyolojik bağlama bağlı olarak hem hücre sağ kalımını hem de apoptozu tercih eden NF κ B yolunu aktive ettiği tespit edilmiştir.

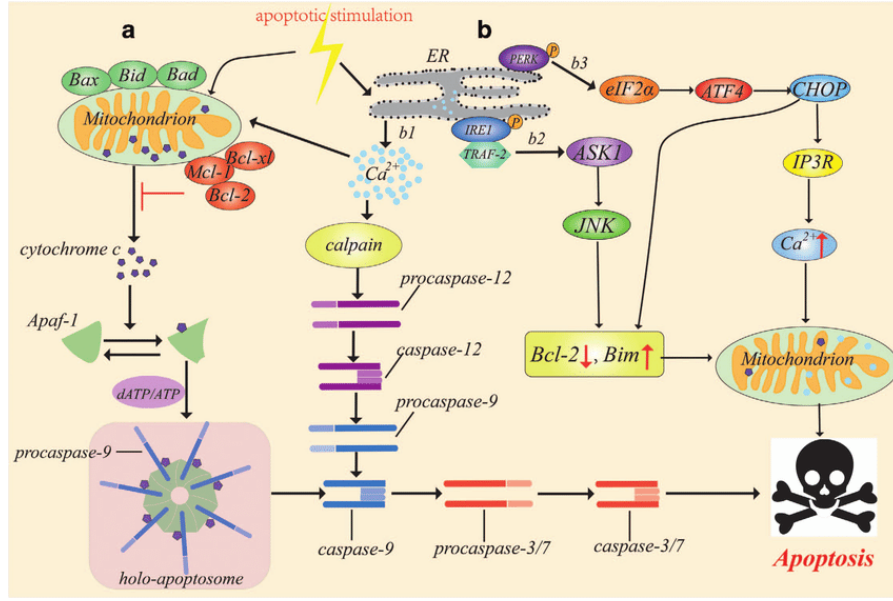
TNFR1'in yanı sıra, Fas ve DR4 / DR5 de sırasıyla ölüm reseptörleri olarak bağlanır ve CD95 ile TRAIL'i bağlar. Reseptörlere bağlanan ligandın tamamı, adaptör proteinlerin (FADD/TRADD) yardımıyla bir kaspaz kaskadının alınması, dimerizasyonu ve aktivasyonuna ve sonunda hem sitoplazmik hem de nükleer substratların kesilmesine yol açacaktır. Bugüne kadar en iyi karakterize edilmiş

ligandlar ve karşılık gelen ölüm reseptörleri arasında CD95 / Fas, TNF-a / TNFR1, Apo2L / DR4 ve Apo2L / DR5 bulunur.

Reseptör trimerizasyonu, birkaç ölüm domaininin görevlendirilmesine ve nihayetinde kaspaz-8 ve kaspaz-10'un aktivasyonuna yol açar. Aktif kaspaz-8 ve kaspaz-10 daha sonra ya kesim yaparak doğrudan apoptozu başlatır (böylece infazcı kaspaz-3/6/7'yi aktive eder) ya da etkin hücre ölümünü indüklemek için BID'nin kesilmesi yoluyla içsel apoptotik yolu aktive eder. Kaspaz-8'in aktivasyonu FLICE inhibitör proteini (FLIP) ile önlenir [83] [84].

2.10.2. İçsel Yolak

İçsel yolak esas olarak mitokondriyal aracılı apoptotik yol anlamına gelir. Oksidatif stres, ışınlama ve sitotoksik ilaçlarla tedaviyi içeren çeşitli hücre dışı ve hücre içi stresler tarafından tetiklenir [85]. Ayrıca, hasarlı hücrelerin gelişiminde ve ortadan kaldırılmasında önemli bir işlev görür. İçsel yolağa, mitokondriyal membrana Bax / Bak sokulması ve daha sonra, mitokondriyal intermembran boşluğundan sitozole salınan sitokrom c aracılık eder [86]. Bcl-2 ve Bcl-xL (Bcl-2 ailesi üyesi) sitokrom c salınımını önleyen anti-apoptotik proteinlerdir [87]. Sitokrom c, apoptozom üretmek için Apaf-1 ve prokaspaz-9 ile birleşir. Apoptozom, kaspaz 9'u tetikleyen ve ardından hücrelerin yıkılmasına yol açan ve apoptozla sonuçlanan kaspaz-3 sinyalleme kaspaz kaskadının aktivasyonunu tetikleyen yedi kollu halka şeklinde bir kompleksten oluşan çok proteinli bir komplekstir [88]. Genel olarak intrinsik yola dahil olan proteinler arasında SMAC / DIABLO (kaspazların ikinci mitokondriyal aktivatörü / düşük PI ile direkt IAP bağlayıcı protein), kaspaz-9 (Sisteinil aspartik asit-proteaz-9), Bcl-2 (B-hücresi lenfoma proteini), Bcl-w (Bcl-2 benzeri protein), Nox (Phorbol-12-miristat-13-asetat ile indüklenen protein 1), Aven (Hücre ölüm regülatörü Aven) ve Myc (Onkogen Myc) bulunur. Mitokondrinin işlevini yitirmesi; iç mitokondriyal membran potansiyelinin kaybı, süperoksit iyonlarının hiper üretimi, mitokondriyal biyogeneze bozulma, matris kalsiyum glutatyonun çıkışı ve membran proteinlerinin salınımı, kanser hücrelerinde apoptoz indüksiyonu ile umut verici potansiyel taşır.



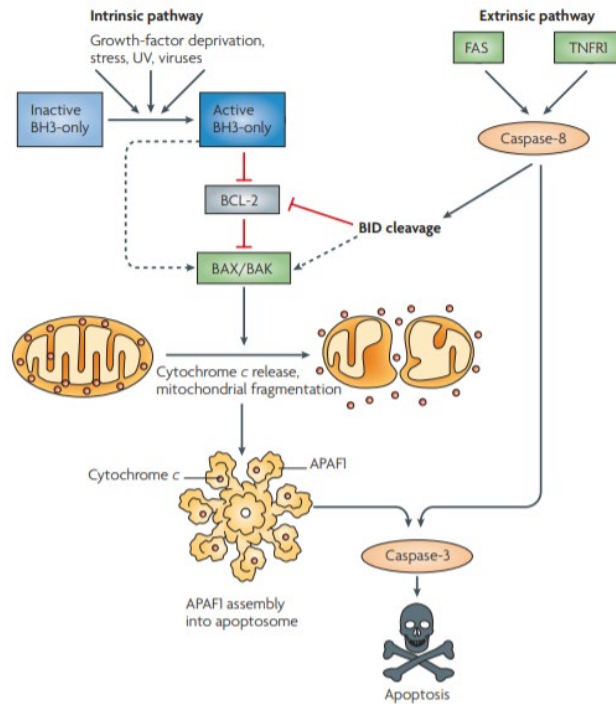
Şekil 2. 8 İçsel apoptoz yolağı. İçsel apoptotik yolak, hücre içi uyarılar tarafından tetiklenir [89]

Hücre içi apoptotik uyarılar, Apa-1'e bağlanan sitokrom C'nin mitokondriyal salıverilmesine yol açan Bax, Bid, Bak ve Bad gibi pro-apoptotik Bcl-2 protein ailesinin regülasyonunu artırır. ADP'nin Apa-1'de dATP / ATP ile değiştirilmesi, holo-apoptozomu oluşturmak için prokaspaz-9 ile birleşen heptamerik apoptozom oluşumunu tetikler. Apa-1 apoptozom, kaspaz kaskadını tetikleyen prokaspaz-9'un kesilmesini ve aktivasyonunu katalizler ve kaspaz-3 ile kaspaz-7'nin aktivasyonu, nihai apoptoza yol açar.

ER stresi altında, üç sinyalleme proteini -IRE1, PERK ve ATF6- aktive edilir, böylece apoptozu indükleyen bir aktivite zincirine yol açar (b1). ER, Ca^{+2} 'yi ER lümeninden sitoplazmaya salgılar, bu da kalsiyum algılayan kinaz CaMKII'yi aktive ederek apoptozu tetikler. Daha sonra, CaMKII kaspaz kaskad aktivasyonunu tetikleyen prokaspazı aktive eder (b2). IRE1'in uzun süreli aktivasyonu apoptozu teşvik edebilir. Fosforile IRE1, TRAF2'yi (TNF reseptörü ile ilişkili faktör 2) toplar ve sonuçta JNK'yi fosforile ve aktive eden ASK1'in (apoptoz sinyal kinaz 1) aktivasyonu gibi bir dizi fosforilasyon olayını tetikler. JNK'nin fosforilasyonu pro-apoptotik Bim'i aktive eder ve anti-apoptotik Bcl-2'yi bloke eder (b3). PERK'nin homomultimerizasyonu ve otofosforilasyonu, ATF4'ün (aktive edici transkripsiyon faktörü-4) translasyonunu arttıran eIF-2α (ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2α) fosforilasyonuna yol açar. Daha sonra ATF4, iki önemli hücre ölüm yolağı aracılığıyla (IP3R – Ca^{+2} - CaMKII

yolağı ve Bcl-2 aile üyesi yolağı) apoptozu destekleyen CHOP'un (C/EBP homolog proteini) ekspresyon seviyesini artırır [90] [91].

BCL-2 ailesi proteinleri hem içsel hem de dışsal apoptoz yolağında kritik rol oynar. BCL-2 ailesi temel olarak üç sınıfa ayrılmıştır. Bu üç sınıftan birincisi apoptozu inhibe eden BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL1, BCL-B proteinlerinden meydana gelir. İkinci sınıf ise apoptozu destekleyen BAX, BAK ve BOK (MTD) proteinlerinden oluşur. Üçüncü ve ayrı bir sınıf olan sadece BH3 proteinlerinin (BAD, BIK, BID, HRK) apoptozu teşvik etmek için anti-apoptotik BCL-2 proteinlerini bağlayabilen ve düzenleyebilen korunmuş bir BH3 alanı mevcuttur. Pro-apoptotik aile üyeleri BAX ve BAK, dış mitokondriyal zarın (OMM) geçirgenleşmesini ve ardından kaspaz aktivasyonuna yol açan apoptojenik moleküllerin (sitokrom c ve SMAC gibi) salınmasını indüklemek için çok önemlidir. BCL-2 ve BCL-XL gibi anti-apoptotik aile üyeleri, BAX ve BAK'ı inhibe eder. Son bulgular sadece BH3 proteinlerinin, BCL-2 ve diğer anti-apoptotik aile üyelerinin doğrudan bağlanması ve inhibisyonu yoluyla BAX ve BAK'ı baskıladığını göstermektedir. Buna karşılık karşıt bir model, BAX ve BAK'ın bazı sadece BH3 proteinleri (özellikle BIM, tBID ve PUMA) tarafından doğrudan aktivasyonunu varsayar [92].



Şekil 2. 9 Apoptozun içsel ve dışsal yollarını gösteren şema [93].

Yalnızca BH3 proteinleri pro-apoptotiktir ve çeşitli hücrel işlemlerden yayılan apoptotik sinyallerin başlangıç sensörleri olarak işlev görür. Yalnızca BH3 protein ekspresyonu, transkripsiyon faktörleri tarafından indüklenebilir. Örneğin NOXA ve PUMA, DNA hasarına yanıt olarak tümör baskılayıcı p53 tarafından indüklenir ve BIM, büyüme faktörü yoksunluğuna yanıt olarak sınıf O forkhead kutusu transkripsiyon faktörü-3A tarafından ve ER stresine yanıt olarak transkripsiyon faktörleri CEBPa (CCAAT-güçlendirici bağlayıcı protein-a) veya CHOP (CEBP homolog protein) tarafından indüklenir. Yalnızca BH3 proteinleri, post translasyonel olarak da etkinleştirilebilir. Örneğin BAD büyüme faktörü yoksunluğuna yanıt olarak fosforilasyon kaybı ile, BID kaspaz-8 aracılı proteoliz ile, BIM, dynein motor kompleksinden salınarak veya ekstrasellüler sinyal tarafından düzenlenen kinaz (ERK) aracılı fosforilasyonun (sağlıklı hücrelerde ubiquitinasyon ve proteazomal degradasyonu hedefler) kaybıyla aktive edilir.

Anti-apoptotik BCL-2 ailesi proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin regüle edilmesi, hücrelerin apoptozu regüle edebildiği başka bir yoldur. Örneğin BCL-XL, hücrenin hayatta kalmasını desteklemek için Janus kinaz-sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (JAK-STAT) yolağı aracılığıyla büyüme faktörleri tarafından transkripsiyonel olarak indüklenebilir [94] [95] [93].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. KULLANILAN MALZEMELER

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Kullanılan cihazlar Ekler bölümünde Tablo 1’de gösterilmiştir.

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Kullanılan kimyasallar Ekler bölümünde Tablo 2’de gösterilmiştir.

3.1.3. Kullanılan hücre kültürü aparatları

Kullanılan hücre kültürü aparatları Ekler bölümünde Tablo 3’de gösterilmiştir.

3.1.4. Kullanılan çözeltiler

Kullanılan çözeltiler Ekler bölümünde gösterilmiştir.

3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ, HÜCRE CANLILIĞI VE HÜCRE SAĞ KALIM TESTİ

3.2.1. Hücre kültürü

LN-18 (ATCC CRL-2610) hücre hattı DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) besiyerinde %5 CO₂ içeren 37° C’lik etüvde %10 fetal sıgır serumu (FBS) ve 10 U/ml Penisilin/Streptomisin ile büyütülecektir.

3.2.2. Hücre canlılığı tayini

TMZ, EBR kombinasyonlarının hücre canlılığına etkisi MTT testi ile belirlenecektir. 1x10⁴ hücre/kuyu 96 kuyucuklu petrilere ekilecektir. Gece boyunca hücrelerin petrilere yapışması beklendikten sonra hücrelere TMZ ve doza bağlı EBR uygulanacaktır. MTT tetrazolium tuzu ile 4 saat bekletilen örneklerde oluşan formazan

bileşikler DMSO uygulaması ile çözünmektedir. Oluşan renk 570 nm dalga boyundaki spektrofotometrik okumaya tabi tutulacaktır ve ilaç uygulanmamış kontrol örneklerle oranlama yapılarak bağıl hücre canlılığı kaybına göre doz belirlenecektir.

3.2.3. Koloni oluşumu deneyi

Hücreler 6 kuyucuklu petrilere 1×10^4 hücre/kuyu şeklinde ekilecektir. Gece boyunca hücrelerin petrilere yapışmaları beklendikten sonra EBR, TMZ veya EBR + TMZ uygulamalarına tabi tutulacaktır. Zamana bağlı ilaç uygulamaları sonucunda besiyeri değiştirilecek ve koloni oluşumu için en az 10 gün boyunca hücreler ilaçsız besiyerinde tutulacaktır. Koloni oluşumunun ardından hücreler 3:1 oranındaki metanol/asetik asit ile fikse edilecek ve sonrasında %0,5 kristal viyole boyası ile boyanacaktır. Fiksasyon sonrasında hücreler ışık mikroskobunda görüntülenecektir.

3.2.4. Hücre sağ kalım testi

5×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere hücreler ekildikten sonra gece boyunca yapışmaları beklenecektir. Hücelere belirlenen dozlarda EBR, TMZ veya EBR + TMZ kombinasyonu zamana bağlı şekilde 0-96 saat boyunca uygulanacak, inkübasyon süresi sonunda tripsin/EDTA uygulaması ile kaldırılıp çöktürülerek 1 ml besiyeri içerisinde homojen hale getirilecektir. 1:1 oranında %0,4'lük tripan mavisini ve besiyeri ile karıştırılan hücreler Neubauer lamında sayılacaktır.

3.2.5. Yara iyileşmesi deneyi

Hücreler 6 kuyucuklu petrilere 3×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde ekilecek ve bir gece boyunca beklenecektir. Ertesi gün petri tabanı 100 µl'lik pipet ucu ile hücrelerin kalkmayacağı şekilde çizilecek ve oluşan yarıkların boyutu mikroskop yardımı ile ölçülecektir. İlaç uygulanan örnekler 24, 48 ve 72 saat boyunca 37° C, %5 CO₂'lik etüvde inkübe edilecektir. Petri tabanında oluşturulan yarıklar inkübasyon sonrasında mikroskopta gözlemlenip ölçülecektir.

3.2.6. Asılı damlacık deneyi

4×10^5 hücre, petri başına 20 damlacık olacak şekilde ve damlacık başına 2×10^4 hücre olacak ve ilaçlanacak olan hücreler belirlenen dozlara göre ilaçlanmış bir şekilde petri

kapaklarının içine ekilecektir. Petrilerin tabanına ise 3 ml 1X PBS eklenecektir. Hücrelerin 24 ve 48 saat sonrasında ışık mikroskobu altında oluşturduğu çaplar incelenecek ve ölçülecektir.

3.3. İMMUNOBLOTLAMA

3.3.1. Total protein izolasyonu

Hücreler 100 mm'lik petrilere 1×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapılacak ve yapışmaları için 37°C , %5 CO_2 'lik etüvde bir gün boyunca inkübe edilecektir. Ardından MTT testi ile seçilen dozlar uygulanacak ve belirlenen zaman süresince bekletilecektir. Ardından hücreler 1X PBS çözeltisi kullanılarak kazıma yöntemiyle petriden toplanacak ve 2 dakika süre ile 13200 rpm'de santrifüj işlemi ile çöktürülecektir. Çöktürülen hücrelerin üzerine hücre yoğunluğuna göre hücre liziz tamponu (%10 proteaz inhibitörü ile) eklenecek ve örnekler 20 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilecektir. İnkübasyon sonunda hücreler 20 dakika 16000 g 'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edilecek ve üst faz yeni mikrofüj tüpüne alınarak protein ekstraktları olarak -80°C 'de saklanacaktır.

3.3.2. Protein konsantrasyonlarının Bradford yöntemi ile tayini

Konsantrasyonu $1,5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olan BSA (sığır serum albumin) kullanılarak standart eğri oluşturulacaktır. Bu eğri hazırlanırken; 96 kuyucuklu petrilere $1,5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $3\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $4,5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $6\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ve $7,5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA'nın üzerine 200 μl Bradford çözeltisi eklenerek, 595 nm dalga boyunda absorbansları ölçülerek ve elde edilen proteinlerden 1 μl alınarak aynı dalga boylarında absorbansları belirlenecektir. Standartların absorbans-konsantrasyon grafiği elde edilerek, ardından bu grafiğin denklemi kullanılarak absorbans değerleri bilinen örneklerin konsantrasyonları tespit edilecektir. Sonrasında örnekler iMark™ Microplate Absorbance Reader'da absorbansları ölçülecektir (595 nm). Alınan verilerden, bilgisayar yardımıyla proteinlerin konsantrasyonlarına ulaşılabılır.

3.3.3. Proteinlerin hazırlanıp SDS-PAGE’de yürütülmesi

Protein örnekleri immunoblotlama yöntemi için 5x Laemmli tamponu ile 1:5 oranında karıştırılarak 95°C de 5 dakika denatüre edilecektir. Proteinler %10, %12 veya %15’lik akrilamid/bisakrilamid jele belirlenen konsantrasyonlarda yüklenerek yürütme tamponu olan tankta 85V’de yürütülecektir.

3.3.4. Proteinlerin membrana transferi ve bloklama

SDS-PAGE sonrası, yükleme jeli kesilerek ortamdan uzaklaştırılacaktır. Ayırma jeli boyutunda kesilen ve metanol ile aktive edilen poliviniliden florid (PVDF) membranlar transfer tamponunda bir süre bekletilecek ve PVDF membranlara transfer işlemi 2,5 mA’da gerçekleştirilecektir. Transfer işlemi sonrası membranlar, 1 saat oda sıcaklığında %5’lik yağsız süt tozu (%0,1 Tween 20 içeren 1X TBS) içerisinde çalkalıyıcıda bekletilerek bloklanacaktır.

3.3.5. Primer ve sekonder antikorlarla işaretleme

Membranlar apoptotik antikorlar ile gece boyu +4 C° sıcaklıkta bekletileceklerdir. Birincil antikor uygulamasını takiben 10 dakikalık, 3 kez TBS-T yıkamasının ardından 1:3000-5000, HRP-etiketli anti-tavşan/fare ikincil antikorlar (Cell Signaling Technology) ile 2 saat oda sıcaklığında bekletileceklerdir.

3.3.6. Protein bantlarının görüntülenmesi

İkincil antikor uygulamasının ardından; 10 dakikalık, 3 kez TBS-T ile ve 10 dakikalık 1 kez TBS yıkama sonrasında, örnekler oda sıcaklığına getirilmiş kemiluminisans madde ile 1 dakika boyunca muamele edileceklerdir. Kemiluminisans ölçen (Biorad) cihaz yardımı ile bant profilleri incelenecektir.

3.4. MİKROSKOBİK YÖNTEMLER

3.4.1. Işık mikroskobu

Ekilen tüm hücrelerin kontrolü ve morfolojilerindeki değişimin gözlenebilmesi için SOIF XDS-1B ışık mikroskobunda inceleme yapılacaktır.

3.4.2. Floresan mikroskopu

3.4.2.1. 3,3' Diheksiloksakarbozianin iyodür (DiOC6) boyama

6 kuyucuklu petriye 1×10^4 hücre ekilecek ve gece boyunca yapışmalara beklenecektir. Ertesi gün hücrelere belirlenen dozda ilaç uygulaması yapılacak ve hücreler belirlenen zaman boyunca inkübe edilecektir. Hücrelerin besiyerine 400 nM DiOC6 eklenecek ve 15 dakika boyunca inkübe edilecektir. Sağlıklı mitokondri membranına sahip hücreler 15 dakika sonunda eksitasyon 488 nm, emisyon 525 nm'de görüntülenecektir.

3.4.2.2. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) boyama

6 kuyucuklu petriye 1×10^4 hücre ekilecek ve gece boyunca yapışmalara beklenecektir. Ertesi gün hücrelere belirlenen dozda ilaç uygulaması yapılacak ve hücreler belirlenen zaman boyunca inkübe edilecektir. Hücrelerin besiyerine 5 mg/ml olacak şekilde DAPI eklenecek ve 10 dakika boyunca inkübe edilecektir. İnkübasyonun sonunda DNA fragmentasyonu bulunan DAPI pozitif hücrelerin görüntülenmesi floresan mikroskopunda eksitasyon 350 nm ve emisyon 420 nm'de görüntülenecektir.

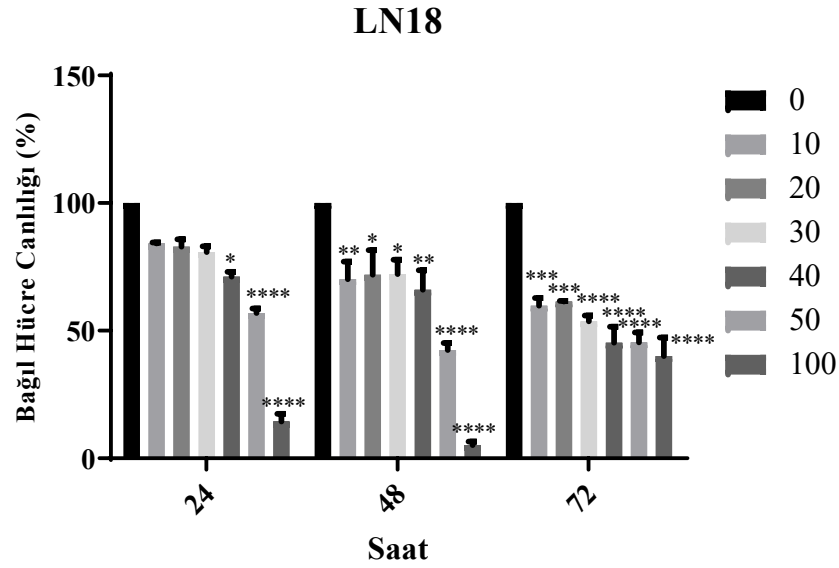
3.5. ÜÇ BOYUTLU HÜCRE KÜLTÜRÜ

BD Matrigel Matrix (katalog no: 356234) kullanımı ile gerçekleştirilen 3 boyutlu hücre kültürü için 96 kuyucuklu petriyeler kullanılacaktır. 50 µl matrijel içerisinde 5000 hücre, 50 µl DMEM ile 1:1 oranında karıştırılacak ve her kondisyondan 4 tekrarlı olacak şekilde 96 kuyucuklu petri kuyularına yerleştirilecektir. Hücre ekilen kuyulara daha sonra 100 µl toplam hacimde seçili dozlarda ilaçlar eklenecektir. Çevre boş kuyulara buharlaşmayı önlemek amacıyla steril 1X PBS eklenecektir. Her gün mikroskop ile takip edilen kuyucuklarda sferoid oluşturan hücre popülasyonları belirlenecek (yaklaşık 14 gün) ve her gün sferoid boyutları kontrol edilerek çapları ölçülecektir.

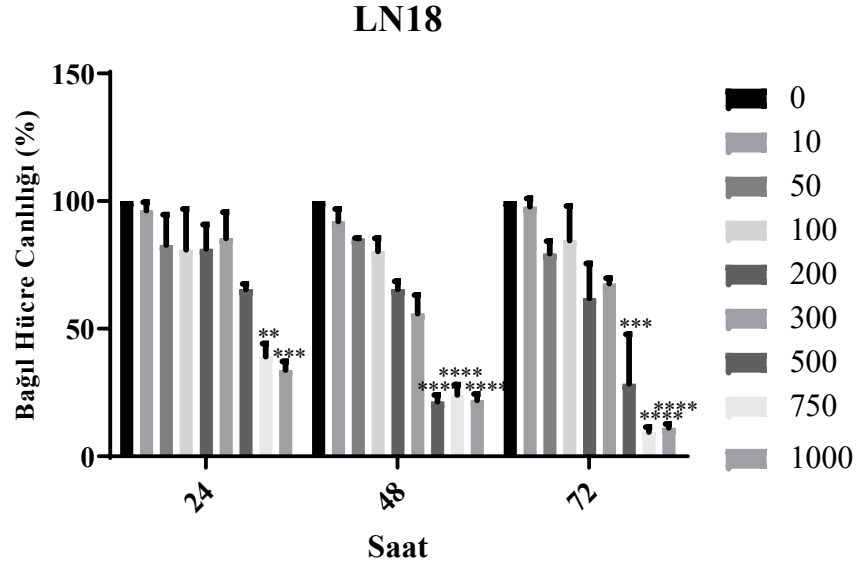
4. SONUÇLAR

4.1. TEMOZOLOMİD, EPIBRASSİNOLİD VARLIĞINDA TEMOZOLOMİDE DİRENÇLİ LN18 HÜCRE HATTINDA BAĞIL HÜCRE CANLILIĞINI AZALTMIŞTIR

TMZ ve EBR'nin TMZ dirençli hücre hattı olan LN18 üzerindeki etkilerini irdelemek için MTT testi yapılmıştır. Zamana bağlı olarak doz uygulamaları sonucu en uygun doz seçimi yapılmıştır. LN18 hücrelerinin 48 saat sonunda 30 μ M ve 40 μ M EBR dozlarında sırasıyla yaklaşık %70 ve %65'lik sağkalım gösterdiği tespit edilmiştir (**** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$) (Şekil 4.1). TMZ uygulamasının ardından ise 48 saat sonunda 200 μ M'lik doz uygulamasının LN18 hücre canlılığını yaklaşık %65 seviyesine indirdiği gözlenmiştir (Şekil 4.2).



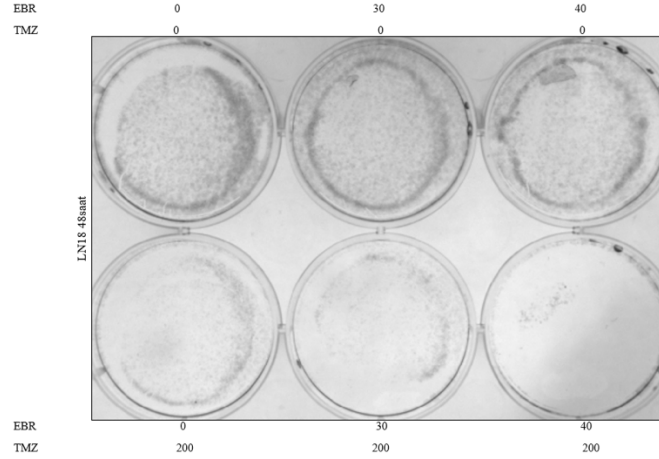
Şekil 4. 1 MTT testi ile LN18 hücre hattında EBR (μ M) uygulamasının neden olduğu hücre canlılığı kaybının gösterilmesi.



Şekil 4. 2 MTT testi ile LN18 hücre hattında TMZ (μ M) uygulamasının neden olduğu hücre canlılığı kaybının gösterilmesi.

4.2. TEMOZOLOMİD EPİBRASSİNOLİD VARLIĞINDA LN18 HÜCRELERİNİN KOLONİ OLUŞTURMA POTANSİYELİNİ ZAYIFLATMIŞTIR

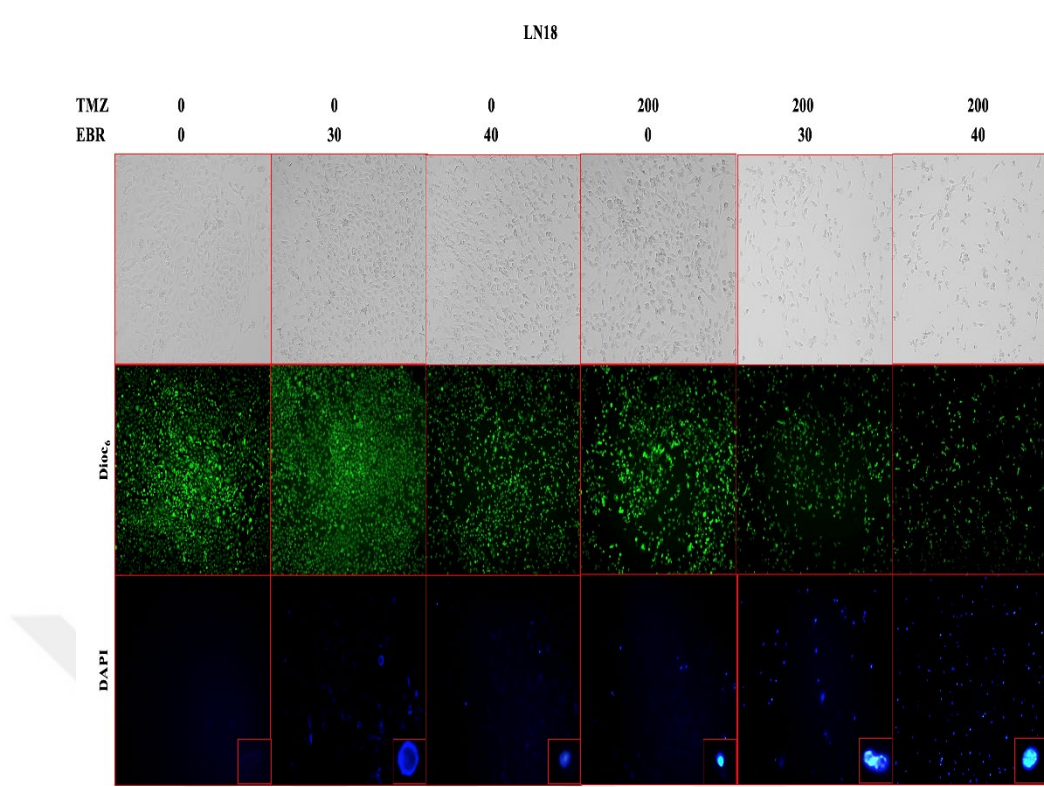
Koloni oluşumu deneyi yapılarak TMZ ve/veya EBR uygulamasının LN18 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyelleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. LN18 hücreleri belirtilen dozlarda TMZ ve/veya EBR'ye 48 saat boyunca tabi tutulduktan sonra ilaç uygulanan medya uzaklaştırılarak DMEM (+) ile muamele edilmiştir. 10 günün sonunda hücreler 3:1 oranındaki metanol/asetik asit ile fiks edilip kristal viyole ile boyanmıştır. Uygulama sonucunda EBR'nin tek başına kullanımının LN18 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyellerine anlamlı bir etkisinin olmadığını gösterse de TMZ ile birlikte kullanımının LN18 hücrelerinin koloni potansiyelini anlamlı bir biçimde zayıflattığı tespit edilmiştir. Bunun yanında TMZ ve EBR uygulamasının LN18 hücreleri üzerinde sitotoksik bir etkisinin olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4. 3 TMZ ve EBR uygulamasının LN18 hücre hattında koloni oluşumuna etkisinin kristal viyole boyaması sonrası tayini.

4.3. TEMOZOLOMİD VE EPİBRASSİNOLİDİN BİRLİKTE KULLANIMININ LN18 HÜCRELERİNDE APOPTOZU TETİKLEDİĞİ DIOC6 ve DAPI BOYAMALARIYLA GÖSTERİLMİŞTİR

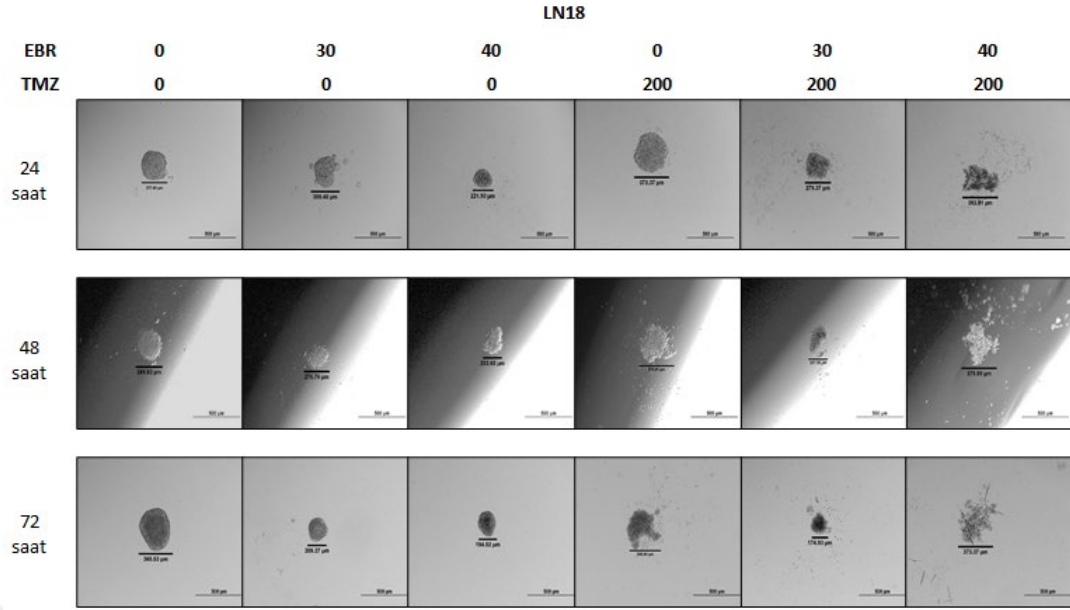
DiOC6 ve DAPI floresan boyamaları hücrelerde apoptoz seviyelerinin artışı tespit etmek için kullanılmaktadır. DiOC6, hücrelerin mitokondriyal membran potansiyelindeki değişimi göstermektedir. Mitokondriyal membran potansiyelinin zayıflaması hücrelerin apoptotik ölüme gittiğini gösteren bir işarettir. DAPI ise ilaç uygulamasının ardından hücrelerde meydana gelen DNA fragmentasyonunu işaret etmektedir. DNA fragmentasyonundaki artış hücredeki apoptoz seviyelerinin artışı göstermektedir. LN18 hücrelerinin 48 saat sonunda doza bağımlı olarak mitokondriyal membran potansiyellerinde zayıflama ve DNA fragmentasyonlarında artış gözlenmiştir (Şekil 4.4).



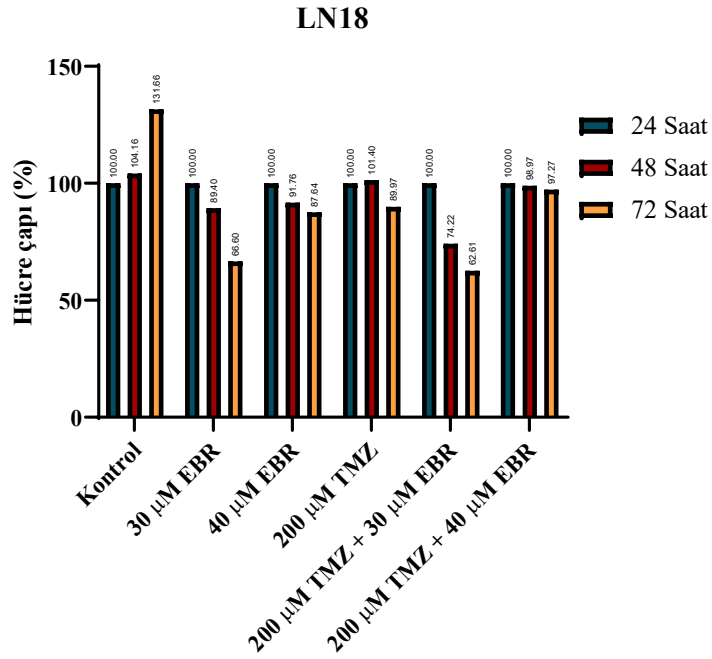
Şekil 4. 4 48 saat EBR ve TMZ uygulamalarının ardından LN18 hücrelerinin DiOC₆ ve DAPI boyamaları flüoresan mikroskobu altında gözlemlenmiştir (DiOC₆ Eksitasyon: 488 nm, Emisyon: 525 nm, DAPI Eksitasyon: 350 nm, Emisyon: 420 nm)

4.4. TEMOZOLOMİD VE EPİBRASSİNOLİDİN BİRLİKTE KULLANIMI LN18 HÜCRELERİNİN ÜÇ BOYUTLU YAPI OLUŞTURMA POTANSİYELİNİ ZAYIFLATMIŞTIR

LN18 hücreleri üzerinde yapılan asılı damlacık deneyi sonucunda TMZ'nin EBR ile birlikte kullanımının ve EBR'nin tek başına kullanımının sferoid çaplarında küçülmeye neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). Hücrelerin çapları ilaç uygulamaları sonucunda 24, 48 ve 72 saat sonlarında ölçülerek tespit edilmiştir.



Şekil 4. 5 LN18 hücrelerine belirlenen konsantrasyonlarda TMZ ve/veya EBR uygulaması sonucunda yapılan asılı damlacık deneyi sonuçları. Hücrelerin petri kaplarının kapağına ekilmesinin ardından numaralandırılarak belirlenen saatler sonunda mikroskop altında gözlenerek boyutları ölçülmüştür.

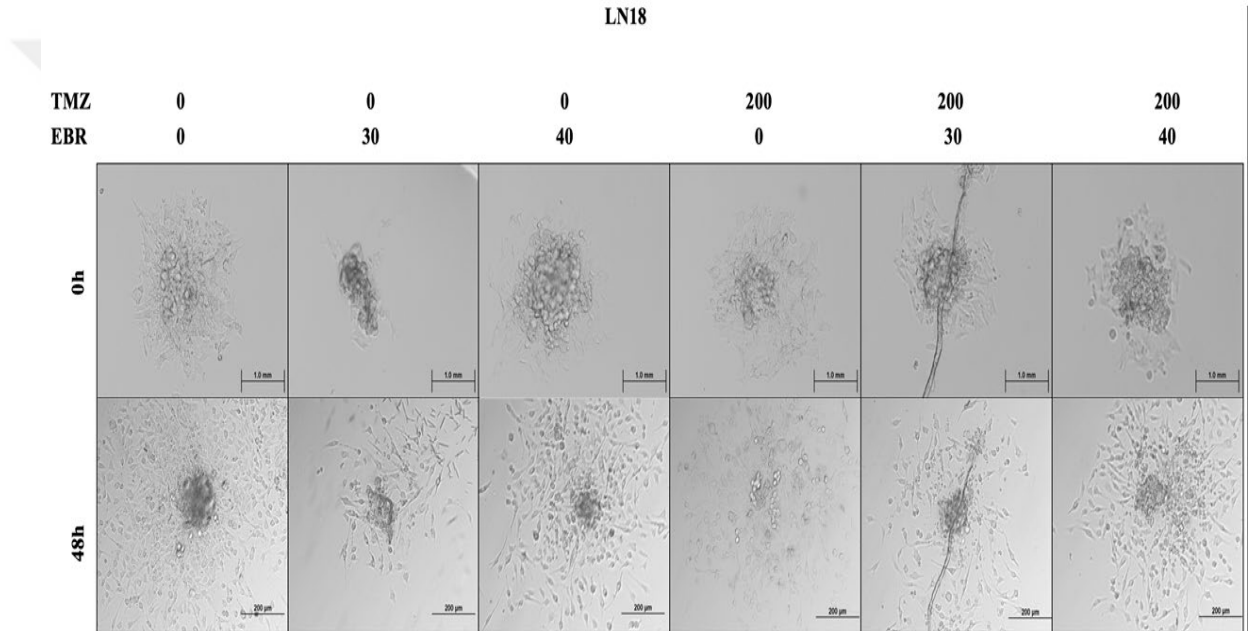


Şekil 4. 6 TMZ ve/veya EBR uygulaması sonucunda LN18 hücrelerinin sferoid çaplarındaki değişimin yüzdesel grafik gösterimi.

TMZ'ye karşı dirençli olan LN18 hücre hattında kontrol grubunda sferoid çapında artış gözlenmektedir. Yalnızca TMZ uygulanan grupta ise anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. EBR'nin uygulanmış olduğu gruplarda ise anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. 200 µM TMZ + 30 µM EBR uygulanan grupta yaklaşık %40'lık bir azalma

görülmüştür. 200 μ M + 40 μ M EBR uygulanan grupta ise çapta anlamlı bir değişik olmamasına rağmen hücre morfolojisinde zamana bağlı olarak bir bozunma gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).

LN18 hücrelerinin üç boyutlu durumlarının incelenmesi için 3D Matrigel yöntemi de kullanılmıştır. Kontrol grubunda LN18 hücrelerinin üç boyutlu yapı oluşturarak büyüdüğü görülmüştür. EBR uygulamalarında ise doza ve zamana bağımlı bir şekilde üç boyutlu yapılarda bozunma ve çaplarda ufalma görülmektedir. TMZ ve EBR'nin bir arada kullanıldığı dozlarda ise yine üç boyutlu yapılarda küçülme ve büyüme seviyelerinde azalma görülmektedir (Şekil 4. 7).



Şekil 4. 7 TMZ ve/veya EBR uygulaması ardından LN18 hücrelerinin çaplarındaki değişimin Matrigel kullanılarak üç boyutlu hücre kültürü yöntemiyle incelenmesi.

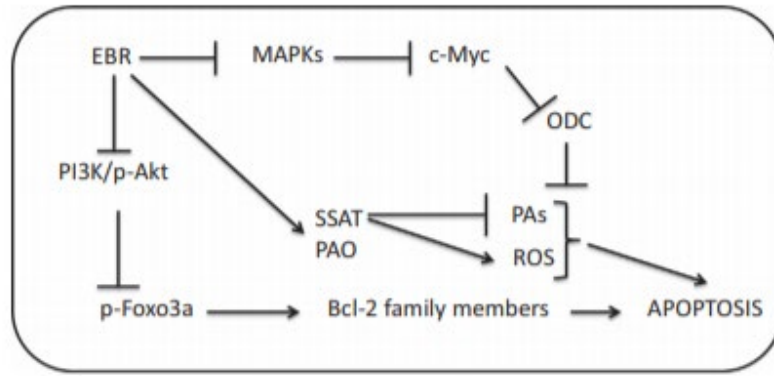
5. TARTIŞMA

GBM, merkezi sinir sisteminin tüm primer malign tümörlerinin %77-81'ini temsil eden, en yaygın görülen malign primer beyin tümörüdür. Dünya Sağlık Örgütü tarafından derece IV yaygın astrositik ve oligodendrogial tümör olarak sınıflandırılmıştır. Primer GBM görülme ortalama yaşı 62'dir ve medyan sağkalım yaklaşık 14,6 aydır. Tıbbi ve cerrahi ilerlemelere rağmen hayatta kalma oranları hayal kırıklığı yaratacak kadar düşük kalırken, GBM ile ilişkili kötü prognoz iyi belgelenmiştir [96].

Birkaç uluslararası çabaya rağmen, GBM tedavisi klinik onkolojide hala en zorlu görevdir. Son on yılda, çok sınırlı başarı ile bir dizi farklı tedavi araştırılmıştır. Hastaların hayatta kalma oranını artırmak için birkaç kemoterapötik ajan, GBM tedavisindeki etkinlikleri açısından test edilmiştir. TMZ (metilleme ajanı) gibi alkileyici ajanlar bazı avantajlar göstermiş ve GBM'nin çoğunda klinik olarak kullanılmıştır. TMZ'nin sitotoksitesinden sorumlu ana mekanizma, guanin üzerindeki N7 ve O6 pozisyonunda DNA'yı metile etmektir; bu, DNA eksik eşleşme onarım sisteminin metillenmiş guanin için tamamlayıcı bir baz bulmada başarısız olmasına yol açar. Böylece, DNA'da uzun ömürlü çentiklere neden olur ve sonuç olarak G2-M sınırındaki hücre döngüsünü bloke eder ve apoptozu tetikler [63]. Bununla birlikte, tümör hücrelerinde yüksek seviyelerde MGMT aktivitesinin zayıf TMZ yanıtı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. MGMT, tümör hücrelerini alkileyici kemoterapötik ajanlara karşı koruyan kritik bir DNA onarım proteindir [1].

Brassinosteroidler, hormonal dengenin düzenlenmesi, protein ve nükleik asit sentezinin aktivasyonu, enzimatik aktivite, hücre döngüsü ve hücre büyümesi dahil olmak üzere çok sayıda fizyolojik etkiye sahip steroid türevli moleküllerdir. Bitkilerdeki iyi tanımlanmış etkilerin yanı sıra, bunların memeli hücrelerindeki rolleri tam olarak anlaşılmamıştır ve şu anda anti-kanser ajanları olarak araştırılmaktadır [7]. BR'ler bitkilerde büyüme ve farklılaşmayı teşvik edici rol oynasa da BR türevlerinden biri olan EBR'nin memeli steroidlerine benzer yapıdaki G1 / M'de hücre döngüsü

tutulmasına neden olduğu ve bu da hormona bağlı meme ve prostat kanseri hücre hatlarında apoptoza yol açtığı gösterilmiştir. Bu nedenle, EBR'nin steroid memeli ligandlarına, östrojen veya androjenlere bağlanan nükleer hormon reseptörleri (NHR'ler) ile etkileşime girerek apoptozu indükleyebileceği öne sürülmüştür. EBR uygulaması sonucunda kolon kanseri hücre hatlarında üç önemli yanıt gözlenmiştir. Bunlar Foxo3a'nın PI3K / Akt yolağının inhibisyonu yoluyla defosforilasyonu, MAPK'lar tarafından c-Myc indüksiyonu ve sonuçta PA havuzunda azalma ve son olarak PA katabolik makinenin aktivasyonu ROS oluşumunu sağladı. Kolon kanseri hücre hattında EBR'nin potansiyel apoptoz indükleyici rolü şematize edilmiştir (Şekil 5. 1).



Şekil 5. 1 Kolon kanseri hücre hattı olan HCT116 ve HT-29'de EBR tarafından indüklenen apoptozun şematize edilmiş hali [8].

LN18 hücre hatlarının IC50 değerlerinin yapılan çalışmalarda yaklaşık 511 μ M olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte LN18 hücrelerinde p53'ün mutant özellik gösterdiği görülmüştür [2]. EBR'nin ise Obakan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada prostat kanseri hücrelerinde p53 varlığından bağımsız olarak apoptozu indüklediği belirlenmiştir [97].

Bu bilgiler doğrultusunda LN18 hücrelerinin bağıl hücre canlılığı MTT tekniği ile tespit edilmiştir. Hücresel işlevlerini yerine getirebilen mitokondriler hücrelerin tetrazolyum tuzlarını redükte etmiştir ve bu şekilde formazan yapı oluşumunu sağlamıştır. Bu reaksiyon, formazan kristallerinin oluşturduğu renk değişimini ortaya çıkartmış ve bu şekilde hücre canlılığı tespit edilmiştir. Bağıl hücre canlılığında EBR uygulamasının ardında 48 saatin sonunda yaklaşık %30 ve %35'lik bir azalma gözlenmiştir. TMZ uygulamasının ardından ise 48 saatin sonunda bağıl hücre canlılığında yaklaşık %35'lik bir azalma görülmüştür (Şekil 4. 1 ve 4. 2). Yüksek MGMT seviyelerine sahip olan LN18 hücre hatlarında TMZ direnci başka çalışmalarda da gösterilmiştir. LN18'in TMZ direncini kırmak üzere yapılmış olan bir çalışmada MTT testinde 48 saat sonunda aynı doz TMZ uygulamasında benzer bağıl hücre canlılığı tespit edilmiştir. Kombine terapi yöntemi olarak TMZ'nin etkinliğinin artırılması adına MGMT direnci olan hücrelerde MGMT etkinliğinin zayıflatılması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda yapılan çalışmada ursolik asidin etksi irdelenmiştir. Ursolik asidin anti inflamatuvar, anti viral ve sitotoksik etkileri bilinmektedir. TMZ ile ursolik asidin bir arada kullanımının MGMT dirençli hücre hatlarında MGMT ekspresyonunda zayıflamaya neden olduğu ifade edilmiştir. Bu zayıflamaya bağlı olan hücre canlılığındaki azalış DAPI ve hücre canlılığı testleriyle gösterilmiştir [98].

Hücrelerin mitokondriyal etkinliğinin tespiti açısından yapılan boyama çalışmalarında mitokondriyal membran potansiyellerindeki değişim irdelenmiştir. TMZ'nin EBR varlığında etkinliğini artırdığı görülmüştür. Bu TMZ'nin MGMT direnci gösteren hücrelerdeki etkinliğini artırma konusunda EBR'nin potansiyel apoptotik bir rolü olabileceğini göstermektedir (Şekil 4. 4). Apoptotik etkinin gösterilmesi adına yapılan boyamalardan birisi olan DAPI boyaması yapılarak hücrelerin DNA fragmentasyonlarındaki değişiklik de incelenmiştir. Dışsal ve içsel apoptotik yollar hücresel küçülme, DNA fragmentasyonu ve en sonunda apoptozu meydana getiren bir kaspaz kaskadı sonucunda gerçekleşir. Bu mekanizma GBM hücrelerinde oldukça deregüle olmuş durumdadır [84]. Yapılan çalışmada DAPI boyaması sonucunda LN18 hücrelerinde doza bağımlı olarak 48 saat sonunda DNA fragmentasyonunun arttığı görülmektedir. TMZ ve EBR'nin tek başına olan kullanımlarda olan fragmentasyon seviyesinin birlikte kullanımlarından daha az etkili olduğu gözlenmiştir. Bu TMZ'ye

direnç gösteren LN18 hücrelerinin TMZ'nin, EBR ile birlikte uygulanmasına daha zayıf bir yanıt verdiğini göstermektedir.

LN18 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyellerindeki değişim koloni oluşturma deneyiyle gözlenmiştir. Hücreler 48 saat boyunca belirtilen dozlarda EBR ve/veya TMZ'ye tabi tutulmuştur. 48 saatin sonunda tüm grupların medyaları taze medyalarla değiştirilerek koloni oluşumları incelenmiştir. EBR'nin tek başına uygulanmasında koloni miktarını azaltmada çok etkili olmadığı gözlenmiştir. Ancak TMZ ile birlikte uygulandığı her iki durumda da kontrol ve diğer tüm uygulama gruplarına kıyasla koloni miktarında anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada LN18'in gösterdiği TMZ direncinin ortadan kaldırılması için aldehit dehidrojenazın rolü incelenmiştir. Aldehit dehidrojenazın TMZ direncini desteklediği öne çıkarılan bu çalışmada TMZ ile birlikte aldehit dehidrojenaz inhibitörü olan 4-dietilaminobenzaldehit (DEAB) kullanılmıştır. Çalışma kapsamında yapılan deneylerde TMZ'nin tek başına ve/veya DEAB varlığında LN18 hücrelerindeki koloni oluşturma potansiyeli üzerindeki etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuca bakıldığında TMZ'nin tek başına koloni miktarlarında anlamlı bir azalmaya sebep olmadığı ancak DEAB ile birlikte uygulanmasının koloni miktarlarındaki azalmayı işaret ettiği görülmüştür. Bununla birlikte DEAB'ın da tek başına uygulamasının tıpkı TMZ'de olduğu gibi tek başına anlamlı bir etki göstermediği görülmüştür [99]. TMZ ve EBR'nin birlikte uygulama sonuçlarına bakıldığında benzer bir şekilde EBR'nin, TMZ'nin koloni miktarını azaltmak üzerine olan etkisini artırdığı görülmektedir (Şekil 4. 3)

Asılı damla deneyi uygulanarak sferoid çapları ölçülmüş, doza ve zamana bağımlı olarak LN18 hücrelerinin çaplarındaki değişim gözlenmiştir. Kontrol grubunda zamana bağlı olarak sferoid çaplarındaki artış görülürken EBR ve TMZ uygulamaları sonucunda çaplarda yüzdesel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. LN18 hücrelerinin TMZ'nin tek başına uygulamasında direnç gösterdiği söylenebilir. TMZ uygulamasının ardından yaklaşık %10'luk bir küçülme görülmüştür. Ancak EBR'nin tek başına veya TMZ ile birlikte -özellikle 30 μ M dozda- anlamlı bir şekilde sferoid çaplarını küçülttüğü gösterilmiştir.

Matrigel yöntemi kullanılarak hücrelerin üç boyutlu karakterlerindeki değişim incelenmiştir. Matrigel, fare tümör hücreleri tarafından salgılanan laminin, nidojen, kollajen IV ve heparan sülfat proteoglikanlar (perlecan) gibi birçok faktörü içeren ve birçok normal dokuda bulunan kompleks bazal membran mikroçevresine benzeyen bir ekstrasellüler matriks karışımıdır [100]. LN18 hücrelerinin oluşturmuş olduğu üç boyutlu yapılarda kontrol grubunun sağlıklı bir şekilde büyüdüğü ve çoğaldığı görülmüştür. TMZ'nin varlığında ise LN18 hücrelerinin üç boyutlu morfolojilerinde başlangıç saatlerine kıyasla değişim görülmektedir. Kontrol grubuna göre baktığımızda hücre miktarında az da olsa bir azalma ve sferoid yapısında değişim tespit edilmiştir. Hücrelerin birbirleriyle olan bağlantılarında da kontrol grubuna kıyasla azalma gözlenmiştir. Bu TMZ ve EBR uygulamasının anjiyogenez üzerinde de bir etkisinin olabileceğini göstermiştir. GBM hücrelerinin sferoid çaplarındaki değişimlerin üzerine yapılan bir çalışmada TMZ uygulaması sonucunda invaziv profillerindeki farklılıklar incelenmiştir. 100 µM TMZ uygulaması sonucunda LN18 hücrelerinin sferoid çaplarının 5 gün sonunda yaklaşık 1.5 katına çıktığı görülürken kontrol grubunda ise çapın yaklaşık 3 kat arttığı görülmüştür [101]. Bu sonuçlar TMZ'nin üç boyutlu ortamdaki LN18 hücrelerinin sferoid çaplarının büyümesini etkilediği tespit edilmiştir. EBR'nin ise TMZ ile birlikte, kontrol grubuna kıyasla LN18 hücrelerinin birbirleriyle olan bağlantılarının zayıflamasında rol oynadığı görülmüştür.

Daha önce yapılan çalışmalarda TMZ'nin TMZ dirençli hücre hatlarında etkisinin artırılması için apoptoz indükatörleri, miRNA'lar, sitotoksik ajanlar denenmiştir. Ursolik asit gibi bitkisel kaynaklı tedavi yöntemleri GBM hücreleri üzerinde denenmiş olsa da literatürde brassinosteroid uygulaması henüz denenmemiştir. Brassinosteroidlerin kanser hücreleri üzerinde hücre büyümesi ve hücre döngüsü gelişimi üzerindeki etkileri bilinmektedir. Bir brassinosteroid olan EBR'nin ise kolon, prostat kanseri gibi kanser tiplerinde apoptotik etkileri gösterilmiştir. EBR'nin potansiyel bir anti kanser ilacı adayı olması TMZ'nin etkinliğinin artırılması yönünde bir kullanım alanı olabileceğini göstermektedir. Elde edilen veriler TMZ'ye dirençli olduğu bilinen LN18 hücre hatlarında EBR'nin TMZ etkisini tekrar artırabileceğini işaret etmektedir. Bu bilgilerin ışığında yapılacak çalışmalar EBR ve TMZ uygulamasının LN18 hücrelerinde oluşturduğu değişimlerin hangi molekülleri ve

moleküler yolakları etkilediğini bulmayı hedeflemektedir. COVID-19 salgını sebebiyle hedeflenmiş olan immunoblotlama, hücre sağ kalım testi, yara iyileşmesi deneyi ve hücre akış sitometrisi çalışmaları gerçekleştirilememiştir. Sonraki çalışmalarda EBR ve TMZ uygulaması sonrasındaki protein düzeyindeki anlatımlardaki değişimlerin arkasındaki mekanizma araştırılıp *in vivo* çalışmalar ile desteklenmesi amaçlanmaktadır.



6. KAYNAKÇA

- [1] F. Hanif, K. Muzaffar, K. Perveen, S. M. Malhi, and S. U. Simjee, “Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment,” *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2017.
- [2] S. Y. Lee, “Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme,” *Genes and Diseases*. 2016.
- [3] J. Tang, Z. Han, and J. Chai, “Q&A: What are brassinosteroids and how do they act in plants,” *BMC Biol.*, 2016.
- [4] Z. Wei and J. Li, “Brassinosteroids Regulate Root Growth, Development, and Symbiosis,” *Molecular Plant*. 2016.
- [5] P. Krishna, “Brassinosteroid-Mediated Stress Responses,” *Journal of Plant Growth Regulation*. 2003.
- [6] P. Obakan-Yerlikaya *et al.*, “Calreticulin is a fine tuning molecule in epibrassinolide-induced apoptosis through activating endoplasmic reticulum stress in colon cancer cells,” *Mol. Carcinog.*, 2017.
- [7] P. Obakan, C. Barrero, A. Coker-Gurkan, E. D. Arisan, S. Merali, and N. Palavan-Unsal, “SILAC-based mass spectrometry analysis reveals that epibrassinolide induces apoptosis via activating endoplasmic reticulum stress in prostate cancer cells,” *PLoS One*, 2015.
- [8] D. Coskun, P. Obakan, E. D. Arisan, A. Çoker-Gürkan, and N. Palavan-Ünsal, “Epibrassinolide alters PI3K/MAPK signaling axis via activating Foxo3a-induced mitochondria-mediated apoptosis in colon cancer cells,” *Exp. Cell Res.*, 2015.

- [9] K. Adacan, P. Obakan-Yerlikaya, E. D. Arisan, A. Coker-Gurkan, R. I. Kaya, and N. Palavan-Unsal, "Epibrassinolide-induced autophagy occurs in an Atg5-independent manner due to endoplasmic stress induction in MEF cells," *Amino Acids*, 2020.
- [10] R. Singh, A. Letai, and K. Sarosiek, "Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019.
- [11] S. Nagata, "Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells," *Annu. Rev. Immunol.*, 2018.
- [12] J. P. Thakkar *et al.*, "Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma," *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2014.
- [13] K. Rock *et al.*, "A clinical review of treatment outcomes in glioblastoma multiforme - The validation in a non-trial population of the results of a randomised Phase III clinical trial: Has a more radical approach improved survival?," *Br. J. Radiol.*, 2012.
- [14] M. P. Lovely *et al.*, "Care of the adult patient with a brain tumor.," *J. Neurosci. Nurs.*, 2014.
- [15] F. Ohka, A. Natsume, and T. Wakabayashi, "Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme," *Neurology Research International*. 2012.
- [16] D. A. Reardon, "Therapeutic Advances in the Treatment of Glioblastoma: Rationale and Potential Role of Targeted Agents," *Oncologist*, 2006.
- [17] H. S. Phillips *et al.*, "Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis," *Cancer Cell*, 2006.
- [18] H. Ohgaki *et al.*, "Genetic pathways to glioblastoma: A population-based study," *Cancer Res.*, 2004.
- [19] P. Kleihues and H. Ohgaki, "Primary and secondary glioblastomas: From

concept to clinical diagnosis,” *Neuro. Oncol.*, 1999.

- [20] C. Hartmann *et al.*, “Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: Implications for classification of gliomas,” *Acta Neuropathol.*, 2010.
- [21] D. N. Louis *et al.*, “The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary,” *Acta Neuropathologica*. 2016.
- [22] D. Choi, L. Montermini, D. K. Kim, B. Meehan, F. P. Roth, and J. Rak, “The impact of oncogenic egfrviii on the proteome of extracellular vesicles released from glioblastoma cells,” *Mol. Cell. Proteomics*, 2018.
- [23] American Brain Tumor Association, “Glioblastoma (GBM) | American Brain Tumor Association | Learn More,” *Glioblastoma (GBM)*, 2019. .
- [24] R. Stupp *et al.*, “Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma,” *N. Engl. J. Med.*, 2005.
- [25] R. Wang *et al.*, “Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium,” *Nature*, 2010.
- [26] H. Ohgaki and P. Kleihues, “The definition of primary and secondary glioblastoma,” *Clinical Cancer Research*. 2013.
- [27] K. Watanabe, O. Tachibana, K. Sato, Y. Yonekawa, P. Kleihues, and H. Ohgaki, “Overexpression of the EGF Receptor and p53 Mutations are Mutually Exclusive in the Evolution of Primary and Secondary Glioblastomas,” *Brain Pathol.*, 1996.
- [28] G. Iacob and E. B. Dinca, “Current data and strategy in glioblastoma multiforme,” *Journal of medicine and life*. 2009.
- [29] C. Adamson *et al.*, “Glioblastoma multiforme: A review of where we have been and where we are going,” *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2009.

- [30] M. P. W. A. Houben, C. M. van Duijn, J. W. W. Coebergh, and C. C. Tijssen, "[Gliomas: the role of environmental risk factors and genetic predisposition].," *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, 2005.
- [31] J. A. Schwartzbaum, J. L. Fisher, K. D. Aldape, and M. Wrensch, "Epidemiology and molecular pathology of glioma," *Nature Clinical Practice Neurology*. 2006.
- [32] L. B. Daniels, M. Shaya, M. L. Nordberg, C. D. Shorter, M. Fowler, and A. Nanda, "Glioblastoma multiforme in two non-nuclear family members.," *J. La. State Med. Soc.*, 2007.
- [33] M. O. Taskapilioglu, U. Aktas, P. Eser, S. Tolunay, and A. Bekar, "Multiple extracranial metastases from secondary glioblastoma: A case report and review of the literature," *Turk. Neurosurg.*, 2013.
- [34] P. Y. P. Lam, E. Ditomaso, H. K. Ng, J. C. S. Pang, M. F. Roussel, and N. M. Hjelm, "Expression of p19(INK4d), CDK4, CDK6 in glioblastoma multiforme," *Br. J. Neurosurg.*, 2000.
- [35] R. McLendon *et al.*, "Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways," *Nature*, 2008.
- [36] G. C. Kabat, A. M. Etgen, and T. E. Rohan, "Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma?," *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2010.
- [37] V. S. Benson, K. Pirie, J. Green, D. Casabonne, and V. Beral, "Lifestyle factors and primary glioma and meningioma tumours in the Million Women Study cohort," *Br. J. Cancer*, 2008.
- [38] C. S. Cobbs *et al.*, "Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma," *Cancer Res.*, 2002.
- [39] V. Spinelli, O. Chinot, C. Cabaniols, R. Giorgi, P. Alla, and M. P. Lehuicher-Michel, "Occupational and environmental risk factors for brain cancer: a pilot case-control study in France," *Press. Medicale*, 2010.

- [40] M. Wrensch, Y. Minn, T. Chew, M. Bondy, and M. S. Berger, "Epidemiology of primary brain tumors: Current concepts and review of the literature," *Neuro. Oncol.*, 2002.
- [41] M. Wrensch, J. L. Fisher, J. A. Schwartzbaum, M. Bondy, M. Berger, and K. D. Aldape, "The molecular epidemiology of gliomas in adults.," *Neurosurgical focus*. 2005.
- [42] M. E. Scheurer, E. S. Amirian, S. L. Davlin, T. Rice, M. Wrensch, and M. L. Bondy, "Effects of antihistamine and anti-inflammatory medication use on risk of specific glioma histologies," *Int. J. Cancer*, 2011.
- [43] C. M. Kitahara *et al.*, "Association between adult height, genetic susceptibility and risk of glioma," *Int. J. Epidemiol.*, 2012.
- [44] F. Hochberg, P. Toniolo, and P. Cole, "Nonoccupational risk indicators of glioblastoma in adults," *J. Neurooncol.*, 1990.
- [45] C. Nieder, A. L. Grosu, S. Astner, and M. Molls, "Treatment of unresectable glioblastoma multiforme," *Anticancer Res.*, 2005.
- [46] J. R. Simpson *et al.*, "Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: Results of three consecutive radiation therapy oncology group (RTOG) clinical trials," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1993.
- [47] J. P. Posti *et al.*, "Presenting symptoms of glioma in adults," *Acta Neurol. Scand.*, 2015.
- [48] E. M. Sizoo *et al.*, "Symptoms and problems in the end-of-life phase of high-grade glioma patients," *Neuro. Oncol.*, 2010.
- [49] C. Peca *et al.*, "Early clinical and neuroradiological worsening after radiotherapy and concomitant temozolomide in patients with glioblastoma: Tumour progression or radionecrosis?," *Clin. Neurol. Neurosurg.*, 2009.
- [50] F. G. Barker *et al.*, "Age and radiation response in glioblastoma multiforme,"

Neurosurgery, 2001.

- [51] D. Karnofsky and J. Burchenal, "The clinical evaluation of chemotherapeutic agents in cancer," in *Evaluation of chemotherapeutic agents*, 1949.
- [52] A. Shergalis, A. Bankhead, U. Luesakul, N. Muangsin, and N. Neamati, "Current challenges and opportunities in treating glioblastomas," *Pharmacol. Rev.*, 2018.
- [53] W. A. Freed-Pastor and C. Prives, "Mutant p53: One name, many proteins," *Genes Dev.*, 2012.
- [54] C. W. Brennan *et al.*, "The somatic genomic landscape of glioblastoma," *Cell*, 2013.
- [55] C. Smith and J. W. Ironside, "Diagnosis and pathogenesis of gliomas," *Curr. Diagnostic Pathol.*, 2007.
- [56] S. J. Nelson and S. Cha, "Imaging glioblastoma multiforme," *Cancer J.*, 2003.
- [57] S. Agnihotri *et al.*, "Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies," *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2013.
- [58] A. Omuro and L. M. DeAngelis, "Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review," *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2013.
- [59] M. M. Mrugala, "Advances and Challenges in the Treatment of Glioblastoma: A Clinician's Perspective," *Discov. Med.*, 2013.
- [60] S. Kesari, "Understanding glioblastoma tumor biology: The potential to improve current diagnosis and treatments," in *Seminars in Oncology*, 2011.
- [61] A. D. Norden and P. Y. Wen, "Glioma therapy in adults," *Neurologist*. 2006.
- [62] H. B. Newton, "Overview of Pathology and Treatment of Primary Brain Tumors," in *Handbook of Neuro-Oncology Neuroimaging: Second Edition*, 2016.

- [63] J. Scott, Y. Y. Tsai, P. Chinnaiyan, and H. H. M. Yu, "Effectiveness of radiotherapy for elderly patients with glioblastoma," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2011.
- [64] J. E. Chang, D. Khuntia, H. I. Robins, and M. P. Mehta, "Radiotherapy and radiosensitizers in the treatment of glioblastoma multiforme," *Clin. Adv. Hematol. Oncol.*, 2007.
- [65] "Cancer incidence in five continents. Volume IX.," *IARC Sci. Publ.*, 2008.
- [66] L. L. H. Tsang, P. B. Farmer, A. Gescher, and J. A. Slack, "Characterisation of urinary metabolites of temozolomide in humans and mice and evaluation of their cytotoxicity," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1990.
- [67] B. J. Denny, L. L. H. Tsang, J. A. Slack, R. T. Wheelhouse, and M. F. G. Stevens, "NMR and Molecular Modeling Investigation of the Mechanism of Activation of the Antitumor Drug Temozolomide and Its Interaction with DNA," *Biochemistry*, 1994.
- [68] S. R. Wedge, J. K. Porteous, B. L. May, and E. S. Newlands, "Potentiation of temozolomide and BCNU cytotoxicity by O6-benzylguanine: A comparative study in vitro," *Br. J. Cancer*, 1996.
- [69] S. A. Kyrtopoulos *et al.*, "DNA adducts and the mechanism of carcinogenesis and cytotoxicity of methylating agents of environmental and clinical significance," *Cancer Detect. Prev.*, 1997.
- [70] S. D'Atri *et al.*, "Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis," *Mol. Pharmacol.*, 1998.
- [71] J. Zhang, M. F.G. Stevens, and T. D. Bradshaw, "Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance," *Curr. Mol. Pharmacol.*, 2011.
- [72] A. Lim and B. F. Li, "The nuclear targeting and nuclear retention properties of a human DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase are both required for its nuclear localization: the possible implications.," *EMBO J.*, 1996.

- [73] A. E. Pegg, "Repair of O6-alkylguanine by alkyltransferases," *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.*, 2000.
- [74] A. E. Pegg, M. E. Dolan, and R. C. Moschel, "Structure, Function, and Inhibition of O6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase," *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 1995.
- [75] K. S. Srivenugopal, X. H. Yuan, H. S. Friedman, and F. Ali-Osman, "Ubiquitination-dependent proteolysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O6-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea," *Biochemistry*, 1996.
- [76] M. D. Grove *et al.*, "Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen [12]," *Nature*. 1979.
- [77] A. Bajguz, "Metabolism of brassinosteroids in plants," *Plant Physiology and Biochemistry*. 2007.
- [78] J. Li, "Brassinosteroids," in *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 2013.
- [79] S. Fujioka and A. Sakurai, "Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids," *Physiol. Plant.*, 1997.
- [80] A. Piotrowska and A. Bajguz, "Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates," *Phytochemistry*. 2011.
- [81] N. B. Mandava, "Plant Growth-Promoting Brassinosteroids," *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1988.
- [82] P. Obakan, E. D. Arisan, A. Calcabrini, E. Agostinelli, Ş. Bolkent, and N. Palavan-Unsal, "Activation of polyamine catabolic enzymes involved in diverse responses against epibrassinolide-induced apoptosis in LNCaP and DU145 prostate cancer cell lines," *Amino Acids*, 2014.
- [83] S. Elmore, "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death," *Toxicologic*

Pathology. 2007.

- [84] C. Krakstad and M. Chekenya, "Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: Opportunities for targeted therapeutics," *Molecular Cancer*. 2010.
- [85] S. Ghavami, C. Kerkhoff, M. Los, M. Hashemi, C. Sorg, and F. Karami-Tehrani, "Mechanism of apoptosis induced by S100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of metal ions," *J. Leukoc. Biol.*, 2004.
- [86] R. Kim, "Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy," *Cancer*. 2005.
- [87] I. M. Ghobrial, T. E. Witzig, and A. A. Adjei, "Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy," *CA. Cancer J. Clin.*, 2005.
- [88] S. Yuan and C. W. Akey, "Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation," *Structure*. 2013.
- [89] Y. You *et al.*, "The suppression of apoptosis by α -herpesvirus," *Cell Death Dis.*, 2017.
- [90] S. M. Kilbride and J. H. M. Prehn, "Central roles of apoptotic proteins in mitochondrial function," *Oncogene*. 2013.
- [91] G. Verma and M. Datta, "The critical role of JNK in the ER-mitochondrial crosstalk during apoptotic cell death," *Journal of Cellular Physiology*. 2012.
- [92] R. J. Youle, "Cellular demolition and the rules of engagement," *Science*. 2007.
- [93] R. J. Youle and A. Strasser, "The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008.
- [94] H. Puthalakath, D. C. S. Huang, L. A. O'Reilly, S. M. King, and A. Strasser, "The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex," *Mol. Cell*, 1999.
- [95] T. Akiyama *et al.*, "Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of

proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim,” *EMBO J.*, 2003.

- [96] N. Grech, T. Dalli, S. Mizzi, L. Meilak, N. Calleja, and A. Zrinzo, “Rising Incidence of Glioblastoma Multiforme in a Well-Defined Population,” *Cureus*, 2020.
- [97] P. Obakan, E. D. Arisan, A. Coker-Gurkan, and N. Palavan-Unsal, “Epibrassinolide-induced apoptosis regardless of p53 expression via activating polyamine catabolic machinery, a common target for androgen sensitive and insensitive prostate cancer cells,” *Prostate*, vol. 74, no. 16, pp. 1622–1633, Dec. 2014.
- [98] Z. Zhu, S. Du, F. Ding, S. Guo, G. Ying, and Z. Yan, “Ursolic acid attenuates temozolomide resistance in glioblastoma cells by downregulating O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) expression,” *Am. J. Transl. Res.*, vol. 8, no. 7, pp. 3299–3308, 2016.
- [99] A. Schäfer *et al.*, “Aldehyde dehydrogenase 1A1--a new mediator of resistance to temozolomide in glioblastoma,” *Neuro. Oncol.*, vol. 14, Nov. 2012.
- [100] S. Sakiyama-Elbert, P. J. Johnson, S. I. Hodgetts, G. W. Plant, and A. R. Harvey, “Chapter 36 - Scaffolds to promote spinal cord regeneration,” in *Spinal Cord Injury*, vol. 109, J. Verhaagen and J. W. McDonald, Eds. Elsevier, 2012, pp. 575–594.
- [101] A. Magro, A. Magro, S. Shrestha, and K. Brundage, “Apoptotic Effects of Temozolomide and Naturopathic Agents upon Glioblastoma Cells,” *J. Oncol. Transl. Res.*, vol. 04, no. 02, 2018.

7. EKLER

Tablo 7. 1 Kullanılan cihazlar

Ürün Adı	Ürün Kodu	Firma
Akış Sitometrisi Cihazı	AC6531180147	BD Biosciences
Buzdolabı	4263TMB	Arçelik
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Distile Su Cihazı	TANKPE030	Millipore Direct q-5UV
Dondurucu (-80°C)	U725	New Brunswick Scientific
Elektroforez	1658004	Bio-Rad
Floresan Mikroskopu	1X71	Olympus
Güç Kaynağı	1645050	Bio-Rad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
İnkübatör	51026280	Thermo Scientific
Inverted Mikroskop	XDS-1B	SOIF
Kuru Isıtıcı Blok	FN120	Nüve
Laminar Flow	12469 2000	Thermo Scientific

Laminar Flow	LN090	Nüve
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart Equipment
Mikropipet (0,5-10 µl)	EH52836	Thermo Scientific
Mikropipet (20-200 µl)	EH46925	Thermo Scientific
Mikropipet (100-1000 µl)	T27274	Thermo Scientific
Optik Mikroskop	701	Ivymen
Otoklav	OT401	Nüve
pH Metre	N315	SEM BIO
Santrifüj Cihazı	5417R	Eppendorf
Santrifüj Cihazı	5810R	Eppendorf
Santrifüj Cihazı	22331	Eppendorf
Soğutmalı Etüv	ES120	Nüve
Sıvı Azot Tankı	Arpege 40	Air Liquide
Spektrofotometre	2100	Amershan

Tablo 7. 2 Kullanılan Kimyasallar

Ürün Adı	Ürün Kodu	Firma
2-merkaptetanol	S4805940 517	Merck
2-merkaptetanol	M7522	Sigma-Aldrich
Akrilamid/Bis-akrilamid %30 çözelti	A9099	Sigma-Aldrich
Amonyum persülfat	A2941	Applchem
Ampisilin	P06-07100	PAN-Biotech
Asetik asit	27225	Sigma-Aldrich
Bakır sülfat	02791	Merck
Commase mavisi	A3480	Applchem
Disodyum EDTA	2937	Applchem
Disodyum fosfat	A4229	Applchem
DMSO	K46505343 517	Merck
DMSO	D2650	Sigma-Aldrich
Etanol	CAS 64-17-5	AlkoMed
Floksuridin	F0503	Sigma-Aldrich

Glisin	3570	Calbiochem
Hidrojen peroksit	K39218400838	Merck
Hidroklorik asit	K43804717239	Merck
İzopropanol	K44518295321	Merck
Kalsiyum klorür	02382	Merck
Luminol	A2185	Applichem
Magnezyum sülfat	05886	Merck
Metanol	24229	Sigma-Aldrich
MTT ayıracı	M2128-5G	Sigma-Aldrich
p-Kumarik asit	C9008-1G	Sigma-Aldrich
Ponceau kırmızısı	A1405	Applichem
Saf etanol	32221	Sigma-Aldrich
Sodyum dodesil sülfat	UN1888	Applichem
Sığır serum albümin	A2153	Sigma-Aldrich
Sodyum klorür	A2941	Applichem
TEMED	A1148 0100	Applichem
Tris-baz	648310	Calbiochem

Tris-hidroklorik asit	648317	Calbiochem
Tween20	S6740684 348	Merck
Yağsız süt tozu	SC-2325	Santa-Cruz Biotechnology

Tablo 7. 3 Kullanılan Hücre Kültürü Aparatları

Ürün Adı	Ürün Kodu	Firma
100 mm petri	93100	TPP
12 kuyucuklu petri	92012	TPP
6 kuyucuklu petri	92006	TPP
60 mm petri	93060	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
25 cm ² hücre büyütme kabı	90026	TPP
75 cm ² hücre büyütme kabı	90076	TPP
Fetal sığır serumu	10500-064	Gibco
Hemositometre	640110	Marienfeld-Superior
Penisilin/streptomisin	15140-122	Gibco
RPMI 1640	09521	ScienCell
Tripsin-EDTA	25200-056	Gibco

Tablo 7. 4 SDS-PAGE jel içeriği

	Alt Jel	Üst Jel
Distile su	3,4 ml	3,075 ml
Tris-HCl	2,5 ml (1,5 M pH: 8,8)	1,125 ml (0,5 M pH: 6,8)
%10 SDS	0,1 ml	0,05 ml
Akrilamid/Bis-Akrilamid	4 ml	0,67 ml
APS	0,08 ml	0,04 ml
TEMED	0,01 ml	0,005 ml
Toplam	10,09 ml	4,965 ml

7.1.1.1. 10X TBS

86,6 g NaCl, 12,11 g Tris-Baz tartılıp behere alınır. Üzerine çözünmesi için bir miktar distile su eklenir ve pH 8'e ayarlanır. pH ayarlamasından sonra üzerine distile su eklenerek toplam hacim 1000 ml'e tamamlanır.

7.1.1.2. 1X TBS Tween-20

1X TBS içerisine 500 µl Tween 20 eklenerek hazırlanır.

7.1.1.3. *Yürütme tamponu*

30,3 g Tris-Baz, 144 gr glisin ve 10 g SDS tartılarak 1000 ml distile su içinde çözülür. Jel yürütmesi esnasında hazırlanan 10X yürütme tamponu 1X'e dönüştürülerek kullanılır.

7.1.1.4. *Transfer tamponu*

200 ml 10X yürütme tamponunun üzerine 650 ml distile su eklenir. Çözelti 150 ml metanol ile 1000 ml'e tamamlanır.

7.1.1.5. *Yürütme jeli*

Proteinler ağırlıklarına göre ayrılmaları için %12'lik, yükleme jeli olarak %4'lük SDS poliakrilamid jelde yürütülür. Jel içeriği Ekler bölümünde Tablo 4'de gösterilmiştir.

7.1.1.6. *Bradford ayırıcı*

25 mg Commasie Blue boyası; 12,5 ml %95'lik etanol, 25 ml %85'lik asetik asit 212,5 ml distile su içinde çözündürülür.

7.1.1.7. *%10 (w/v) Amonyum Persülfat (APS)*

1 g APS 10 ml distile su içersinde çözündürülerek hazırlanır ve -20°C'de saklanır.

7.1.1.8. *Kemiluminesans çözeltisi*

A ve B çözeltisi olarak ikiye ayrılır. A çözeltisi için; 9 ml distile suyun içerisine 1 ml 1M Tris-HCl (pH:8,5), 45 µl kumarik asit, 100 µl luminol eklenir. B çözeltisi için; 9 ml distile suyun içerisine 1 ml 1 M Tris-HCl (pH:8,5), 6 µl H₂O₂ eklenir. İki çözelti karanlıkta karıştırılarak kullanılır.