

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİETER İYONOFORLARIN NÖROBLASTOMDA POTANSİYEL
ANTİ-KANSER ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Gamze SANLAV
ORCID:0000-0003-4256-8326**

**ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
Temel Onkoloji Bütünleşik Doktora Programı**

DOKTORA TEZİ

**İZMİR
AĞUSTOS 2024**

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2018970204

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİETER İYONOFORLARIN NÖROBLASTOMDA
POTANSİYEL ANTİ-KANSER ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Gamze SANLAV
ORCID:0000-0003-4256-8326**

**ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
Temel Onkoloji Bütünleşik Doktora Programı**

DOKTORA TEZİ

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nur OLGUN
ORCID:0000-0001-9591-0207**

**Bu araştırma DEU Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından
TDK-2022-2650 proje numarası ve Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı
(TUSEB) tarafından A GRUBU ACİL AR-GE PROJE DESTEK programı
2022-ACİL-08 12100 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**İZMİR
AĞUSTOS 2024**

TEZ KABUL ONAYI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Onkoloji Anabilim Dalı, Temel Onkoloji Bütünleşik Doktora programı öğrencisi Gamze SANLAV tarafından hazırlanan “Polieter İyonoforların Nöroblastomda Potansiyel Anti-Kanser Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı tez çalışması 22/08/2024 günü, 11.00/12.00 saatleri arasında yapılan tez savuna sınavında aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü
Onkoloji AD.
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
ORCID: 0000-0002-7658-5565

İmza

Üye: Prof. Dr. Ayşe Gülden DİNİZ
İzmir Demokrasi Üniversitesi, Patoloji A.D
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
ORCID: 0000-0001-5743-5222
İmza

Üye: Prof. Dr. Refik Emre ÇEÇEN
Dokuz Eylül Üniversitesi, Pediatrik Onkoloji A.D
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
ORCID: 0000-0003-0330-4715
İmza

Üye: Doç. Dr. Eda ATASEVEN
Ege Üniversitesi, Pediatrik Onkoloji A.D
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
ORCID: 0000-0003-3419-5814
İmza

Üye: Doç. Dr. Elif ATAĞ
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıbbi Onkoloji A.D.
Tezi onaylıyorum/onaylamıyorum
ORCID: 0000-0002-2803-9287
İmza

Prof. Dr. Nur OLGUN
Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü
Onkoloji AD.
(Danışman, Oy Kullanmıyor)
ORCID: 0000-0001-9591-0207
İmza

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum “Polieter İyonoforların Nöroblastomda Potansiyel Anti-Kanser Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı Doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza

Gamze SANLAV

Tarih:

TEŞEKKÜR

Uzun ve meşakatli ancak bir o kadar da eğitici olan, hayatıma hem bilimsel hem de kişisel gelişim açısından fazlaca yetkinlik kazandıran doktora eğitimim boyunca bu süreci beraber paylaştığım çok kıymetli kişilere teşekkür etmeyi kendime bir borç bilmekteyim.

Başta her zaman yol gösterici olan ve desteğini hep hissettiğim saygıdeğer tez danışman hocam Prof. Dr. Nur OLGUN'a çok teşekkür ederim. İkinci tez danışman hocam Prof. Dr. Zekiye ALTUN'a bu süreçte hem kıymetli fikirleri ile yolumu aydınlattığı için hem de moral desteğe ihtiyacım olduğunda ilgisini asla esirgmeden her koşulda destek olduğu için çok çok teşekkür ederim. Anabilim Dalımızın saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Safiye AKTAŞ ve Prof. Dr. Hilal KOÇDOR'a destekleri için teşekkür ederim.

Yol arkadaşlarım olan, anlamanın ve anlaşılmanın kıymetini bana bu süreçte hep hissettiren sevgili ekip arkadaşlarım Selen Kum ÖZŞENGİZER'e ve Seher DELEK'e; tez çalışmamızı beraber tasarladığımız her zaman neşesiyle beni karşılayan Güner YAMAN'a; arkadaşlığını ve tecrübelerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen Merve TÜTÜNCÜye ve Sena ÖKMEN'e; tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Halil ATEŞ'e teşekkür ederim.

Bugün bu satırları yazabiliyorsam eğer bunda en büyük emeği geçen canım annem Meral SANLAV'a, canım babam Serhat SANLAV'a ve canım kardeşim Berk SANLAV'a bir teşekkürden çok daha fazlasını borçluyum ancak bu vesile ile sizlere bu kadar sevgi dolu ve destekleyici bir aile olduğunuz için binlerce kez teşekkür ederim.

Akademik hayatım boyunca beni sevgisi ile hep destekleyen, yardımlarını esirgemeyen hayat arkadaşım Berk AKÇAR'a kalpten teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TABLO DİZİNİ	i
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	iv
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi.....	1
1.2. Araştırmanın Amacı	3
1.3. Araştırmanın Soru ve Hipotezleri.....	4
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Nöroblastom.....	5
2.1.1. Nöroblastom Etiyolojisi	5
2.1.2. Nöroblastom Epidemiyolojisi ve Klinik Sunumu	7
2.1.3. Nöroblastomun Tedavisi ve Prognozu	11
2.2. Kanserde Ölüm Mekanizmaları	13
2.2.1. Hücre Ölümü.....	13
2.2.2. Apoptotik Hücre Ölümü.....	15
2.2.3. Nekrotik Hücre Ölümü.....	19
2.2.4. Otofaji	20
2.3. Polieter İyonoforlar	26
2.3.1. Polieter İyonoforların Kimyasal Yapısı ve Etki Mekanizması	27
2.3.2. Polieter İyonoforlar ve Otofaji.....	29
2.3.3. Polieter İyonoforlar ve Kanser	30
2.4. K41-A.....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Araştırmanın Tipi.....	33
3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı	33
3.3. Çalışma Materyali	34
3.4. Araştırmanın Değişkeni	34
3.5. Verilerin Değerlendirilmesi	51

3.6. Araştırmanın Sınırlılıkları	52
3.7. Etik Kurul Onayı	53
4. BULGULAR	54
4.1. Hücre Canlılık Analizleri	54
4.2. Mikroskopi Görüntüleri	57
4.3. Akım Sitometrik Apoptoz ve Nekroz Tayini	60
4.4. Akım Sitometrik Otofaji Tayini	63
4.5. Eş-zamanlı Kantitatif PCR (Q-PCR) Analizleri	69
4.6. In Vivo Nöroblastom Ksenograft Modelinde Tümör Boyut Değişimlerinin İncelenmesi	74
4.7. In Vivo Nöroblastom Ksenograft Modelinde Apoptotik ve Otofajik Belirteçlerin İmmünohistokimyasal Analizi	75
5. TARTIŞMA	78
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	83
7. KAYNAKLAR	84
8. EKLER	101
8.1. Ek 1. Etik Kurul Raporu	101
8.2. Ek.2 Tezle İlişkili Araştırma Makaleleri	102
8.3. Ek 3. Tezle İlişkili Bildiriler	111
8.4. Ek.4 Katkı	117
8.5. Ek.5.Özgeçmiş	105

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. TPOG Nöroblastom 2020 Protokolü çalışmasında kullanılan Uluslararası Nöroblastom Risk Grup Evreleme Sistemi (INRGSS) kriterleri (TPOG-2020 protokolünden (www.tpog.org.tr) alınmıştır.).....	9
Tablo 2. TPOG Nöroblastom 2020 Protokolü çalışmasında kullanılan risk gruplaması kriterleri (TPOG-2020 protokolünden (www.tpog.org.tr) alınmıştır.)	9
Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler	35
Tablo 4. Q-PCR Reaksiyonlarında Kullanılan Primerler	43
Tablo 5. In vivo deneylere ait zaman ve gruplar tablosu	48



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Morfolojik olarak ayırt edilebilen hücre ölümü tiplerinin basitleştirilmiş gösterimi.....	14
Şekil 2. İntrinsik apoptotik yolak. BH3-only proteinleri apoptotik strese yanıt olarak yukarı doğru düzenlenir.	17
Şekil 3. Ekstrinsik yol, bir ölüm ligandının bir ölüm reseptörüne bağlanmasıyla başlar.	18
Şekil 4. Memeli hücrelerinde üç tip otofaji.	21
Şekil 5. Otofaji süreci birkaç ardışık adımdan oluşur.	24
(1) Başlatma. (2) Fagofor çekirdeklenmesi. (3) Fagofor uzaması. (4) Otofagozomun lizozom ile füzyonu ve kargonun otolizozomda parçalanması (111).	25
Şekil 6. Bazı önemli polietar antibiyotiklerin doğrusal kimyasal yapıları (145).	28
Şekil 7. Membran boyunca iyon taşıma mekanizması (148).	29
Şekil 8. K41-A ve sisplatinin 24, 48 ve 72 saat sürelerde SH-SY5Y hücrelerinde farklı dozlarda (0-100µM) hücre canlılığına etkisi.....	54
Şekil 9. SH-SY5Y hücrelerinde K41-A ve CDDP doz/konsantrasyon-canlılık grafikleri.....	55
Şekil 10. K41-A ve sisplatinin 24, 48 ve 72 saat sürelerde KELLY hücrelerinde farklı dozlarda (0-100µM) hücre canlılığına etkisi.....	56
Şekil 11. KELLY hücrelerinde K41-A ve CDDP doz/konsantrasyon-canlılık grafikleri.....	56
Şekil 12. 41,98 µM K41-A ve 99,57 µM CDDP ile inkube edilen SH-SY5Y hücrelerinin mikroskopi görüntüleri (24, 48 ve 72 saat).....	58
Şekil 18. 39,17 µM K41-A ve 48,34 µM CDDP ile inkube edilen hücrelerinin mikroskopi görüntüleri (24, 48 ve 72 saat)	60
Şekil 19. SH-SY5Y hücrelerinde AnnexinV/PI analiz sonuçlarına ait akım sitometri histogramları	61
Şekil 20. SH-SY5Y hücrelerinde AnnexinV/PI analiz sonuçlarına ait yüzde oranlarını gösteren grafik (* p≤0.05, ** p≤0,01, *** p≤0,001)	61
Şekil 21. KELLY hücrelerinde AnnexinV/PI analiz sonuçlarına ait akım sitometri histogramları	62

Şekil 22. KELLY hücrelerinde AnnexinV/PI analiz sonuçlarına ait yüzde oranlarını gösteren grafik (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)	63
Şekil 23. SH-SY5Y hücrelerinde otofaji analiz sonuçlarına ait akım sitometri histogramları	66
Şekil 24. K41-A ve CDDP uygulamasına bağlı olarak SH-SY5Y hücrelerinde otofaji oranlarını gösteren grafik (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).....	66
Şekil 25. KELLY hücrelerinde otofaji analiz sonuçlarına ait akım sitometri histogramları	68
Şekil 26. K41-A ve CDDP uygulamasına bağlı olarak SH-SY5Y hücrelerinde otofaji oranlarını gösteren grafik (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).....	69
Şekil 27. K41-A ve CDDP uygulamasına bağlı olarak SH-SY5Y hücrelerinde Q-PCR ile gen ekspresyonlarının değişimlerinin incelenmesi (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)	71
Şekil 28. K41-A ve CDDP uygulamasına bağlı olarak KELLY hücrelerinde Q-PCR ile gen ekspresyonlarının değişimlerinin incelenmesi (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).....	73
Şekil 30. In vivo nöroblastom ksenograft modelinde tedavi gruplarına ait temsili immunohistokimyasal mikroskopi görüntüleri	76
Şekil 31. In vivo nöroblastom ksenograft modelinde tedavi gruplarına ait ortalama apoptotik ve otofajik protein ekspresyon skorları tablosu	77
Şekil 32. In vivo nöroblastom ksenograft modelinde tedavi gruplarına ait ortalama apoptotik ve otofajik protein ekspresyon skorları grafiği (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).....	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABC	ATP sentaz bağlayıcı kaset
ADAM	Bir disintegrin ve metalloproteinaz
ALK	Anaplastik lenfoma kinaz
AMPK	Adenozin monofosfat ile aktifleştirilen protein kinaz
APAF-1	Apoptotik peptidaz aktive edici protein
ATG	Otofaji ilişkili gen/protein
BAP	Bilimsel araştırma projeleri
BAK	Bcl-2 homolog antagonisti
BAX	Bcl-2 ilişkili x proteini
BCL-2	B-hücreli lenfoma 2
BID	BH3 ile etkileşen ölüm agonisti
BMP	Kemik morfojenik proteini
BSL-2	Biyogüvenlik seviyesi-2
CAS3	Kaspaz 3
CAS8	Kaspaz 8
CAS9	Kaspaz 9
CAT	Katyonik amfifilik izleyici
CDDP	Sisplatin
CDNA	Komplementer DNA
CDKN	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü
C-FLIP	FLICE-benzeri inhibitör protein
CHOP	C/EBP-homolog proteini
CMA	Şaperon aracılı otofaji

COA	Koenzim A
COG	Çocuk onkoloji grubu
CQ	Klorokinon
CSC	Kanser kök hücresi
DAB	3',3-Diaminobenzidin
DAPK	Ölümle ilişkili protein kinaz
DISC	Ölüm indükleyen sinyal proteini
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sulfoksit
DNA	Deoksiribonükleotid asit
DR	Ölüm reseptörleri
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EFS	Olaysız sağkalım
EMT	Epitelyal mezenkimal geçiş
ELISA	Enzim-bağlı immunosorbent test
ER	Endoplazmik retikulum
FADD	Fas ilişkili ölüm bölgesi
FASL	Fas ligand
FBS	Fetal Bovin Serum
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HCQ	Hidroksiklorokin
HRP	Horseradish peroksidaz
HSC	Isı şok kognat proteini

IAP	Inhibitör apoptoz proteinleri
IC50	Inhibitör konsantrasyon 50
IDRF	Image-defined risk faktörleri
INRG	Uluslararası nöroblastom risk grupları
INRGSS	Uluslararası nöroblastom risk sınıflandırma sistemi
INPC	Uluslararası nöroblastom patoloji sınıflandırması
LAMP2A	Lizozomla ilişkili membran proteini 2
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LD50	Letal doz 50
MDR	Çoklu ilaç direnci
MOMP	Mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu
MON	Monensin
MMP	Matriks metalloproteinaz
MRNA	Mesajcı RNA
MTOR	Mammalian target of rapamycin
NB	Nöroblastom
NIG	Nigerisin
NK	Doğal öldürücü hücre
ODC	Ornitin dekarboksilaz
OS	Sağkalım
PARP	Poli (ADP-riboz) polimeraz
PBS	Fosfat salin tamponu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PI	Propidyum iyodür

PI3P	Fosfatidilinositol 3-fosfat
PKS	Poliketid sentaz
PTEN	Fosfataz ve tensin homologu
QPCR	Kantitatif PCR
RIP	Reseptör Interaksiyon
RCD	Düzenlenmiş hücre ölümü
RL	Lizis tamponu
RNA	Ribonükleotid asit
ROS	Reaktif oksijen parçaları
RTK	Reseptör tirozin kinaz
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RPM	Devir/dakika
SC	Subkutan
SMAC	Sekonder Mitokondriyal Aktivatör Kaspaz
TNF	Tümör nekroz faktörü
TPOG	Türk Pediatrik Onkoloji Grubu
TRADD	Tümör nekroz faktörü reseptörü tip 1-ilişkili DEATH alanı proteini
TRAF2	Tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili faktör-2
TRAIL	TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligandlar
TUSEB	Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı
ULK	Unc-51-benzeri otofaji-aktive eden kinaz
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
WIPI2	WD tekrar alanı fosfoinositid etkileşimli protein
WST-1	Suda çözünebilen tetrazolyum tuzu

XIAP

X kromozom bağımlı IAP



POLİETER İYONOFORLARIN NÖROBLASTOMDA POTANSİYEL ANTİ-KANSER ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Doktora Tezi

Gamze SANLAV

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Onkoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Nöroblastom, sempatik sinir sisteminin nöral krest progenitör hücrelerinden kaynaklanan ve küçük çocukları etkileyen gelişimsel bir neoplazmadır. Yüksek risk hastalarda sağkalım oranları yoğun multimodal kemoterapiye rağmen oldukça düşüktür. Bu nedenle mevcut kemoterapötik yaklaşımlara yardımcı ya da alternatif ajanların geliştirilmesi önem arz etmektedir. Polieter iyonoforlar, doğal olarak oluşan bileşiklerin çok büyük ve önemli bir grubudur. Son yıllarda bu tür bileşiklere olan ilginin arttığı gözlenmektedir. Polieter iyonoforların ökaryotik hücredeki birincil rolünün, makrofajlarda iyonların transmembran değişimi nedeniyle proton gradyanının kaybı olduğunu, bunun da lizozomlarda pH'ın artmasına ve lizozomal bozunmanın engellenmesine neden olduğunu gösterilmiştir. Otofajinin tümör başlangıcı ve gelişiminde önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. Tümör hücreleri koruyucu otofajiyi indüklediğinde, otofajinin inhibisyonu apoptozu aktive ederek tümör hücrelerini tedaviye duyarlı hale getirmenin bir yolunu sağlayabilir.

Bu çalışma, K41-A'nın nöroblastom hücre hatlarında ve in vivo nöroblastom ksenograft modelinde potansiyel anti-kanserojenik etkilerini değerlendirmeyi amaçlamaktadır. K41-A'nın otofaji ve apoptoz üzerindeki etkisi otofaji (LC3-II, p62/SQSTM1 ve Beclin-1) ve apoptoz (PARP-1, kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9) ile ilişkili protein ve mRNA seviyeleri ile değerlendirilmiştir.

Yapılan tez çalışmasında SH-SY5Y ve KELLY nöroblastom hücre hatlarında K41-A'nın tek başına ve sisplatin ile birlikte anti-kanser etkinliği incelenmiştir. Her iki hücre hattında da K41-A tek başına ve sisplatin ile birlikte anti-proliferatif etki göstermiş olup sisplatinle birlikte uygulandığında her iki ajanın tek başlarına uygulandığı gruplara kıyasla anlamlı derecede hücre canlılığını azaltmayı başarmıştır. K41-A'nın anti-proliferatif etkisinden sorumlu mekanizmasını aydınlatmak amacıyla hücre ölüm yolları araştırılmıştır. K41-A'nın nöroblastom hücre hatlarında otofaji inhibisyonu ile birlikte aynı zamanda apoptoz indüksiyonuna neden olduğu gözlenmiştir. Sisplatin ve K41-A birlikte uygulandığında ise hücrelerde daha yüksek oranda apoptoz gerçekleştiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, K41-A sisplatin uygulamasına bağlı olarak artan otofajiyi nöroblastom hücrelerinde inhibe etmektedir. Böylece sisplatinin indüklediği koruyucu otofajiyi ortadan kaldırarak hücrelerin apoptoza yönelmesine yardımcı olur. Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen in vivo nöroblastom ksenograft modeli sayesinde ise K41-A'nın nöroblastom tümör büyümesini anlamlı derecede yavaşlattığı ve bu anti-karsinojenik etkinin sisplatin ile kombinasyon halinde bu etkinin daha da belirgin olduğu gösterilmiştir. In vitro sonuçlar ile uyumlu olarak in vivo sonuçlar da K41-A'nın apoptoz indüksiyonu yaparken hücresel otofajiyi inhibe ettiği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Nöroblastom, K41-A, hücre ölümü, apoptoz, otofaji

Tez sayfa adedi:119

Danışman: Prof. Dr. Nur OLGUN

INVESTIGATION OF ANTI-CANCER EFFECTS OF POLYETHER IONOPHORES IN NEUROBLASTOMA

Doctorate Thesis

Gamze SANLAV

DOKUZ EYLÜL UNIVERSITY, HEALTH SCIENCE INSTITUTE

Department of Oncology

ABSTRACT

Neuroblastoma is a developmental neoplasm arising from neural crest progenitor cells of the sympathetic nervous system and affects young children. Survival rates in high-risk patients are very low despite intensive multimodal chemotherapy. Therefore, it is important to develop adjuvant or alternative agents to current chemotherapeutic approaches. Polyether ionophores are a very large and important group of naturally occurring compounds. In recent years, there has been an increasing interest in such compounds. Research indicates that the main function of polyether ionophores in eukaryotic cells is to prevent lysosomal degradation by increasing the pH of lysosomes through the loss of the proton gradient caused by ion exchange across membranes in macrophages. It is thought that autophagy is crucial for the beginning and growth of tumors. Inhibiting autophagy might potentially make tumor cells more susceptible to treatment by inducing apoptosis, which happens when tumor cells produce protective autophagy.

This study aims to evaluate the potential anti-carcinogenic effects of K41-A in neuroblastoma cell lines and in an in vivo neuroblastoma xenograft model. The effects of K41-A on autophagy and apoptosis were evaluated by autophagy (LC3-II, p62/SQSTM1 and Beclin-1) and apoptosis (PARP-1, caspase-3, caspase-8 and caspase-9) related protein and mRNA levels.

In the thesis study, the anti-cancer activity of K41-A alone and in combination with cisplatin in SH-SY5Y and KELLY neuroblastoma cell lines was investigated. In both cell lines, K41-A alone and in combination with cisplatin showed anti-proliferative effect and when administered together with cisplatin, it significantly decreased cell viability compared to the groups in which both agents were administered alone. Cell death pathways were investigated to elucidate the mechanism responsible for the anti-proliferative effect of K41-A. It was observed that K41-A induced autophagy inhibition and apoptosis induction in neuroblastoma cell lines. When cisplatin and K41-A were administered together, a higher rate of apoptosis was shown to occur in the cells. However, K41-A inhibits cisplatin-induced autophagy in neuroblastoma cells. Thus, it eliminates the protective autophagy induced by cisplatin and helps the cells to apoptosis. The in vivo neuroblastoma xenograft model performed within the scope of this thesis study showed that K41-A significantly slowed down neuroblastoma tumor growth and this anti-carcinogenic effect was even more pronounced in combination with cisplatin. Consistent with the in vitro results, in vivo results also showed that K41-A inhibited cellular autophagy while inducing apoptosis.

Keywords: Neuroblastoma, K41-A, cell death, apoptosis, autophagy

Pages: 101

Advisor: Prof. Dr. Nur OLGUN

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Nöroblastom çocukluk çağıının en sık karşılaşılan ekstrakraniyal solid tümörü olup Türkiye'de pediyatrik kanserlerin yaklaşık %7.5'ini oluşturmaktadır(1). Nöroblastom, 8.000 canlı doğumda 1'i etkileyen nispeten nadir bir hastalıktır. Ancak nöroblastom çocukluk çağı kanserlerine bağlı ölümlerin %12-15'ini oluşturur ve çocukluk çağıının en yaygın ve ölümcül ekstrakranial tümörüdür (2–5) Nöroblastom yüksek sıklıkla sporadik oluşum gösterir. Nöroblastom adrenal bezde veya sempatik sinir sistemi boyunca herhangi bir seviyede görülebilir (1). Nöroblastom için ortalama tanı yaşı 17-18 aydır ve hastaların yaklaşık %40'ı tanı sırasında 1 yaştan altındadır, hastaların %5'inden azı ise 10 yaştan üzerindedir (6). Çoğunlukla tümör biyolojisine bağlı olan heterojen klinik seyre sahiptir. Nöroblastom, erken başlangıç yaşı, 1 yaştan üzerindeki çocuklarda tanıda metastaz görülme sıklığı ve bebeklerde tümörlerin spontan regresyon eğilimi gibi benzersiz özellikler sergiler (7).

Bu geniş yelpaze göz önüne alındığında, tedavi stratejilerinin yönetilmesi için hastaları klinikopatolojik özelliklerine göre sınıflandırmak için Uluslararası Nöroblastom Risk Sınıflandırması (INRG) oluşturulmuştur (8). Hastaların risk grubuna göre sınıflandırılmasındaki amaç, uzun dönem komplikasyonlarını önlemek için düşük riskli hastalarda tedaviyi azaltmak ve genel sağkalımı arttırmak için yüksek riskli hastalar için tedavileri arttırmak ve hedeflemektir (9) Uluslararası Risk sınıflandırması yaşa, evreye, histolojiye, MYCN gen amplifikasyon durumuna, tümör hücresi ploidisine ve segmental kromozoma bağlıdır. Tahmini hayatta kalma oranı >%98 olan asemptomatik düşük riskli hastaların tedavisi genellikle gözlem veya cerrahidir. Tahmini hayatta kalma oranı >%90 olan orta riskli hastalar, yanıtı göre ayarlanmış orta dozlarda rezeksiyon ve rezeksiyonla birlikte kemoterapi gerektirmektedir. Yüksek riskli hastalar ameliyattan önce birden fazla kombinasyon kemoterapisine tabi tutulur ve ardından miyeloablative otolog hematopoietik kök hücre nakli ve lokal radyasyonla konsolidasyon ve son olarak idame fazı olarak farklılaşma terapisi ile immünoterapi ile tedavi edilmektedirler. Bu yoğun tedavi uygulamalarına rağmen yüksek risk grubu hastalarda 5 yıllık sağkalım oranları %40-50 civarında seyretmektedir (9–11).

Polieter bileşikleri, doğal poliketidlerin geniş bir sınıfına ait olan güçlü antimikrobiyal ve antikanser ajanlardır. Bir dizi çalışma, monensin (Mon) ve nigerisin (Nig) gibi poliyeter iyonoforların etki mekanizmasının, lizozomlarda pH artışına ve lizozomal degradasyonun blokajına neden olan membran boyunca proton gradyan kaybı olduğunu ortaya koymuştur (12,13). Lizozomun düzgün işleyişinin, çeşitli hücresel yollarda, özellikle otofajideve kapsamlı düzenleyici katabolik süreçlerde sağlıklı hücrenin yaşam döngüsünde çok önemli olduğu bilinmektedir (14).

Tedaviyi takiben, daha yüksek otofaji aktivitesi ile ilişkili artan hücre sağkalımının gözlemlenmesi, otofaji inhibitörlerini mevcut antikanser tedavileriyle birleştiren stratejilerin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu bağlamda, klorokin (CQ) veya türevi hidroksiklorokin (HCQ), kanser hücrelerini anti-kanser tedavilerine duyarlı hale getirir. CQ ve HCQ, lizozomal aktiviteyi inhibe ederek otofaji vakuollerinin (otofagolizozomlar) işlenmesini ve olgunlaşmasını bloke eder. Bazı veriler, otofaji inhibisyonunun ve otofagozom birikiminin, HCQ tarafından indüklenen hızlandırılmış hücre ölümüne katkıda bulunduğunu göstermektedir (15). Potansiyel antikanser molekülleri olarak poliyeter iyonoforların Bedir ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmalarda, bu ajanların hem otofajiyi hem de apoptozu over, kolon, akciğer, prostat, pankreas ve meme kanseri hücre hatlarında hedefleyebileceğini ortaya koymuştur (16,17). Bu çalışmalarda izole edilen poliyeter metabolitlerin kanser hücrelerine karşı, sağlıklı hücrelerle karşılaştırıldığında daha yüksek potansiyelle sitotoksikite gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca bu metabolitlerin, otofajiyi inhibe ederken aynı zamanda apoptotik hücre ölümünü indüklediği bu çalışmalarda in-vitro koşullarla ortaya konmuştur (16).

Nöroblastom tedavisinde kullanılan antikanser ilaçlar arasında en yaygın olarak kullanılanlardan biri klinik kemoterapide tanıtılan ilk platin bazlı molekül olan cis-diamindikloroplatinum(II) (cisplatin, cDDP)'dir (18,19). Sisplatinin sitotoksik aktivitesine ilişkin klasik görüş, DNA ile etkileşimi sonucu bu etkiyi gösterdiğini vurgular. Sisplatin, DNA hasar tepkisini, hücre döngüsü durmasını ve apoptozu tetikleyen, DNA ile farklı tipte eklentiler (monoaddüktler, zincir içi çapraz bağlar, DNA-protein çapraz bağları) oluşturur(20). Sisplatinin yüksek hücresel aktivitesine ve nöroblastomda yüksek risk grubu hastalarda uygulanan yoğun kemoterapiye rağmen tedavi yanıtı ve sağkalım oranları halen düşüktür(9). Bu oran sisplatinin diğer

kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanılması ile artırılabilir ve böylece sağlıklı hücrelerdeki toksik etkisi de düşürülebilir. Bu şekilde kemoterapötiklerden birkaçının birlikte kullanımı daha etkin sonuç ve daha düşük sağlıklı doku toksisitesine neden olabileceğinden son yıllarda birçok kanser tedavisinde başvurulmuş seçeneklerden birisi olarak dikkat çekmektedir (21,22).

2019 yılında Khan ve ark. Türkiye'nin Doğu Akdeniz kıyısının ev sahipliği yaptığı bir aktinobakteri suşu olan *Streptomyces cacaoi*'yi izole ettiler ve fermentasyon, fraksiyonlama ve saflaştırma işlemleri sonucunda polieter-tipi bir metabolit olan K41-A'yı izole etmeyi başardılar. K41-A ve insan endometriyal karsinoma (HeLa), insan kemik metastazı prostat kanseri hücre hattı (PC-3), insan akciğer adenokarsinom hücre hattı (A549), insan kolorektal adenomarsinom hücre hattı (CaCo-2), insan akciğer fibroblast hücre hattı (MRC-5) ve *Cercopithecus aethiops* böbrek hücre hattı (Vero) üzerinde yaptıkları in vitro çalışmalar sonucunda K41-A'nın kanser hücrelerine daha yüksek potansiyelle sitotoksikite gösterdiği saptanmıştır. Yine K41-A'nın otofajiyi inhibe ederken aynı zamanda apoptotik hücre ölümünü indüklediği in vitro şartlarda ortaya konmuştur (16,17). Söz konusu polieter iyonofor metabolit olan K41-A yukarıda bahsedildiği üzere farklı kanser hücre hatlarında anti-proliferatif etki açısından potansiyel bir ajan olarak ortaya çıkmıştır ancak, K41-A metabolitinin çocuklarda en sık görülen ekstrakraniyal solid tümör olan nöroblastom üzerindeki potansiyel anti-kanser etkileri bugüne dek incelenmemiştir.

Bu çalışma, ülkemizde bulunan bir aktinobakteri suşundan izole edilmiş olan, bir polieter iyonofor metabolit K41-A'nın nöroblastom üzerindeki etkilerini in-vitro ve in-vivo koşullarda ortaya koymayı amaçlayan ilk çalışma olmayı amaçlamıştır. Bu şekilde nöroblastom tedavisinde potansiyel antikanser bileşik olması açısından bu metabolitin potansiyel anti-proliferatif etkileri ilk defa bu çalışma ile ortaya konmuştur.

1.2. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı *Streptomyces cacaoi*'den izole edilen polieter iyonofor metabolit olan K41-A'nın nöroblastomda potansiyel anti-kanser etkilerini hem in-vitro hem de in-vivo nöroblastom ksenograft modeli ile ortaya koymak ve bu süreçte etkili olan hücre ölüm mekanizmalarını aydınlatmaktır.

1.3. Araştırmanın Soru ve Hipotezleri

- S.caacoi'den elde edilmiş, polieter iyonofor bir metabolit olan K41-A, nöroblastomda in-vitro koşullarda ve in-vivo fare modelinde anti-tümör tedavi yanıtında etkilidir.
- S.caacoi'den elde edilmiş, polieter iyonofor bir metabolit olan K41-A, in-vitro koşullarda ve in-vivo nöroblastom fare modelinde sisplatin ile kombine uygulamada tek başına sisplatin uygulamasına göre daha fazla anti-tümör tedavi yanıtı oluşturur.
- S.caacoi'den elde edilmiş, polieter iyonofor bir metabolit olan K41-A, in-vitro koşullarda ve in-vivo nöroblastom fare modelinde tek başına ve sisplatin ile kombine uygulamada otofajik ve apoptotik hücre ölümünü deęiřtirerek anti-tümör etki gösterir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nöroblastom

2.1.1. Nöroblastom Etiyolojisi

Nöroblastom, sempatik sinir sisteminin nöral krest progenitör hücrelerinden kaynaklanan ve küçük çocukları etkileyen gelişimsel bir neoplazmadır (5,23).

Nöral krest hücreleri yalnızca omurgalılarda bulunan bir hücre popülasyonudur. Nöral krest embriyonik ektodermden köken alır ve kapandıktan sonra nöral tüpten gelişir (24). Nöral krest hücrelerinin çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşması, çeşitli anatomik yapıların ortaya çıkmasına katkıda bulunur ve hücrelerin polariteyi kaybettiği ve azaltılmış adezyon kazandığı bir süreç olan epitelyalden mezenkimal geçişe (EMT) bağlı olarak ortaya çıkar. Bu da nöral krest hücrelerinin delaminasyonunu ve nöral tüpten migrasyonunu sağlar. Bu hücreler tek tek veya kolektif olarak belirli yollar boyunca göç eder ve embriyonun çok sayıda, genellikle uzak kısımlarına ulaşır ve burada sonunda melanositler, kraniofasial kıkırdak hücreleri ve kemikleri, düz kas hücreleri, periferik nöronlar ve glial hücreler de dahil olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşırlar (25). Epigenetik ve transkripsiyonel programlardan oluşan bir kompleks, nöral krest hücrelerinin delaminasyonunu, göçünü ve göç sonrası farklılaşmasını düzenler. Bu programlar histon modifikasyonunu, DNA metilasyonunu ve kemik morfogenetik proteinlerinin (BMP) ve transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu içerir (26).

Nöral krestin multipotent progenitör hücreleri yetişkin organizmada çok çeşitli tümörlere köken olabilmektedir. Nöral krest progenitör hücrelerinin farklı lokalizasyonu ve spesifikasyonu nedeniyle, bunlardan kaynaklanan tümörler heterojen bir grup oluşturur ve vücutta farklı yerlerden kaynaklanabilir. Bunlar arasında melanom ve nöroblastom gibi yaygın yetişkin ve pediatrik kanserlerin yanı sıra paraganglioma, feokromositoma, schwannoma, esthesioneuroblastoma, malign periferik sinir kılıfı tümörleri, granüler hücre tümörleri, nörofibrom, perinurioma, nörotekoma, sinir kılıfı miksoması ve medüller tiroid kanseri gibi daha az yaygın diğer tümör türleri de bulunmaktadır (27). Snail, Twist, SoxE ve FoxD ailelerinin üyeleri

de dahil olmak üzere nöral krest gelişimi için kritik olan farklı transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu birçok kanserde upregüle edilir (28,29). Hem nöral krest hücreleri hem de tümör hücreleri şaşırtıcı derecede benzer EMT süreçlerinden geçer ve her iki hücre türü de hücre invazyonunu ve migrasyonunu kolaylaştıran matriks metaloproteinazları (MMP'ler) ve ADAM metaloproteinazları (a disintegrin and metalloproteinase) ifade eder (30).

Nöroblastom gelişimi ve progresyonunun biyolojik yönleri uzun süredir kapsamlı bir şekilde incelenmiş olsa da, patogenezinin erken aşamaları hakkında çok az şey bilinmektedir ve bu tümörün kaynaklandığı hücreler henüz net bir şekilde tanımlanmamıştır. Yakın zamana kadar, nöroblastomun gelişmekte olan sempatik sinir sistemi hücrelerinden, muhtemelen normalde sempatik ganglion hücrelerine ve adrenal kromaffin hücrelerine (katekolamin salgılayan adrenal korteks hücreleri) farklılaşan sempatoadrenal progenitör hücrelerden kaynaklandığına inanılıyordu (31). Bir nöral krest hücrelerinin katekolaminerjik/adrenal kromafin hücrelerine mi yoksa sempatik bir nörona mı farklılaşacağı kemik morfogenetik proteinlerine (BMP'ler) bağlıdır (32). Sox10 (33,34) ve Mash1 (35) dahil olmak üzere bir dizi transkripsiyon faktörü BMP'ler tarafından indüklenir ve bu da göç eden nöral krest hücrelerinin sempatoadrenal hücrelere farklılaşmasını düzenler.

MYC transkripsiyon faktörleri ailesinin üyeleri (cMYC, MYCN ve L-MYC) hücre büyümesi ve farklılaşmasında önemli bir rol oynar (36). MYCN ifadesi, embriyonik gelişimin sonraki aşamalarında göç eden nöral krest hücrelerinde başlar ve cMYC ifadesinin aşağı regülasyonu ile birlikte görülür. MYCN'nin ana işlevi nöral krest hücrelerinin kendini yenileme ve proliferatif yeteneklerini korumaktır (37). Olgun sempatik nöronlarda MYCN'nin artmış ifadesi hücre döngüsünün ilerlemesini indükler ve apoptozu engeller (38,39). İnsan nöral krest kök hücrelerinde MYCN'nin susturulması, G0/G1 fazında hücre döngüsünün durmasına ve Cdkn1a, Cdkn2a ve Cdkn2b ifadesinde önemli bir artışa yol açar ve aynı zamanda G1/S geçişini kolaylaştıran Cyclin D1 ifadesinde önemli bir azalma meydana gelir (40). MYC ailesinin aynı üyeleri nöroblastomun gelişimi ve ilerlemesinde önemli, hatta kritik bir rol oynamaktadır. Özellikle, MYCN onkogeninin amplifikasyonu nöroblastomlu

hastalarda kötü prognoz ile ilişkilidir (41). MYCN doğru şekilde ifade edilmezse tümör oluşumunu tetikleyebilir (42).

Anaplastik lenfoma kinaz (ALK) geni reseptör tirozin kinaz (RTK) süper ailesine aittir. ALK, embriyogenez sırasında gelişmekte olan merkezi ve periferik sinir sisteminde (43) ve sinyalizasyonunun hücre proliferasyonu ve farklılaşması arasındaki dengeyi düzenleyebildiği nöral krestin gelişmekte olan sempatoadrenal hattında ifade edilir (44). Yakın zamanda ALK ekspresyonunun nöroblastik tümörlerin daha az farklılaşmış durumuyla ilişkili olduğu ve nöroblastomda ALK aşırı ekspresyonu insidansının daha farklılaşmış ganglionöroblastom ve ganglionöromadan önemli ölçüde daha yüksek olduğu gösterilmiştir (45,46).

Sox2 ve Nanog, kök hücrelerin kendini yenileme yeteneğini sürdürmek için gerekli en önemli faktörlerdir. Pandian ve arkadaşları, bu proteinlerin her ikisinin de ifade düzeylerinin nöroblastomun kanser kök hücrelerinde önemli ölçüde arttığını göstermiştir. Kantitatif transkripsiyonel profillemeye, nöroblastomun kanser kök hücrelerinde kök durumuyla ilişkili BMP'ler, Notch2, Slug ve Twist1 dahil olmak üzere 29 molekülün ekspresyonunda artış olduğunu göstermiştir (47).

2.1.2. Nöroblastom Epidemiyolojisi ve Klinik Sunumu

Çocukluk çağıının en sık karşılaşılan ekstrakraniyal solid tümörü olup Türkiye'de pediatrik kanserlerin yaklaşık %7.5'ini oluşturmaktadır (1). Nöroblastom, 8.000 canlı doğumda 1'i etkileyen nispeten nadir bir hastalıktır. Ancak nöroblastom çocukluk çağı kanserlerine bağlı ölümlerin %12-15'ini oluşturur ve çocukluk çağıının en yaygın ve ölümcül ekstrakranial tümörüdür (2–5)

Tüm nöroblastik tümörlerin yaklaşık yüzde 97'sini oluşturan nöroblastomlar heterojen olup vücuttaki yerleşim yerleri, histopatolojik durumları ve biyolojik özellikleri açısından farklılık göstermektedirler. Büyük ölçüde tümörün konumuna, boyutuna, invazyon derecesine, katekolamin salgısının etkilerine ve paraneoplastik sendromlarla ilişkili semptomlara bağlı olduğundan, hastanın klinik görünümünde birçok faktör rol oynar. Tümörlerin yaklaşık %65'i karın bölgesinde ortaya çıkar ve bunların yarısı adrenal bezin medullasında lokalize olur. Ancak boyunda (%5),

göğüste (%20) veya pelviste (%5) ortaya çıkabilirler ve hastaların %1'inde saptanabilir bir primer yoktur (5,48) Nöroblastomun ayırt edici özelliği, spontan regresyon gösteren tümörlerden (infantların ~%50'si), kemoradyoterapi, immünoterapi ve kök hücre transplantasyonu gibi multimodal tedavilere sıklıkla dirençli olan geniş çapta yayılmış tümörlere kadar değişebilen geniş klinik davranış yelpazesi ile heterojen klinik sunumudur (2,49,50). Bu heterojenlik, buna uygun olarak, nöroblastom hastalarının sağkalım oranlarına da yansır. Düşük ve orta riskli hastalarda 5 yıllık sağkalım oranları %85 ila 90 iken tedaviye dirençli olan yüksek risk grubunda genel sağkalım oranları %40'ın altındadır (51).

Nöroblastomun klinik heterojenitesi çok sayıda biyolojik ve klinik faktörle (tümör evresi, hastanın yaşı ve tümör histolojisi, genetik ve kromozomal anormallikler gibi) yakından ilişkili olsa da moleküler temeli büyük ölçüde bilinmemektedir. Örneğin, yaygın hastalığı olan bebeklerin büyük çoğunluğunda kemoterapi ve cerrahi sonrasında olumlu sonuçlar elde edilebilirken, ileri evre hastalığı olan 18 aydan büyük hastaların çoğu, yoğun multimodal tedaviye rağmen progresif hastalık nedeniyle ölmektedir (52).

Nöroblastoma hastalarının tedavi stratejilerinin yönetilmesi için hastaları klinikopatolojik özelliklerine göre sınıflandırmak için Uluslararası Nöroblastom Risk Sınıflandırması (INRG) oluşturulmuştur (8). Hastaların risk grubuna göre sınıflandırılmasındaki amaç, uzun dönem komplikasyonlarını önlemek için düşük riskli hastalarda tedaviyi azaltmak ve genel sağkalımı arttırmak için yüksek riskli hastalar için tedavileri arttırmak ve hedeflemektir (9) Uluslararası Risk sınıflandırması yaşa, evreye, histolojiye, MYCN gen amplifikasyon durumuna, tümör hücresi ploidisine ve segmental kromozoma bağlıdır. *International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC)* sınıflandırmasına göre risk grupları düşük risk, orta risk ve yüksek risk olacak şekilde belirlenmekte ve bu risk gruplarına göre tedavi rejimleri uygulanmaktadır. Ülkemizde de *Türk Pediatrik Onkoloji Grubu'nun (TPOG)* tarafından yürütülen Nöroblastom 2020 Protokol'üne göre risk sınıflandırılması yapılmakta ve tedavi stratejileri belirlenmektedir. TPOG-NB 2020 Protokolünde kullanılan Uluslararası Nöroblastom Risk Grup Evreleme Sistemi (INRGSS) Evreleme sistemi Tablo 1 ve 2'de özetlenmiştir.

Tablo 1. TPOG Nöroblastom 2020 Protokolü çalışmasında kullanılan Uluslararası Nöroblastom Risk Grup Evreleme Sistemi (INRGSS) kriterleri (TPOG-2020 protokolünden (www.tpog.org.tr) alınmıştır.)

Uluslararası Nöroblastom Risk Grup Evreleme Sistemi, INRGSS	
L1	IDRFs* listesiyle tanımlanan vital yapılarda tutulum göstermeyen lokalize ve bir vücut kompartmanında sınırlı tümör
L2	Bir veya daha fazla IDRFs varlığı ile birlikte lokorejyonel tümör
M	Uzak metastatik hastalık (Evre MS dışında)
MS	Yaş <18 ay; Cilt, Karaciğer ve/veya Kemik iliği ile sınırlı metastatik hastalık

Tablo 2. TPOG Nöroblastom 2020 Protokolü çalışmasında kullanılan risk gruplaması kriterleri (TPOG-2020 protokolünden (www.tpog.org.tr) alınmıştır.)

INGR Evre	Yaş (ay)	Histolojik kategori	Tümör farklılaşma derecesi	MYCN Amplifikasyon	11q Aberasyonu	Ploidi	Risk Grubu
L1/L2	Herhangi	Ganglionörom Matür, Ganglionöroblastom intermikst	Herhangi	Negatif	Herhangi	Herhangi	ÇOK DÜŞÜK RISK
L1	Herhangi	Ganglionöroblastom - Nöroblastom	Herhangi	Negatif	Herhangi	Herhangi	ÇOK DÜŞÜK RISK

MS	<18ay	Ganglionöroblastom - Nöroblastom	Herhangi	Negatif	Yok	Herhangi	ÇOK DÜŞÜK RİSK
L2	<18ay	Ganglionöroblastom (matür ve intermikst dışında) - Nöroblastom	Herhangi	Negatif	Yok	Herhangi	DÜŞÜK RİSK
L2	≥18ay	Ganglionöroblastom nodüler - Nöroblastom	Diferansiye	Negatif	Yok	Herhangi	DÜŞÜK RİSK
M	<18ay	Ganglionöroblastom - Nöroblastom	Herhangi	Negatif	Yok	Hiperdiploid	DÜŞÜK RİSK
L2	<18ay	Ganglionöroblastom - Nöroblastom	Herhangi	Negatif	Var	Herhangi	ORTA RİSK
L2	≥18ay	Ganglionöroblastom - Nöroblastom	Andiferansiye, Az diferansiye	Negatif	Yok	Herhangi	ORTA RİSK
L2	≥18ay	Ganglionöroblastom - Nöroblastom	Diferansiye	Negatif	Var	Herhangi	ORTA RİSK
M	<18ay	Ganglionöroblastom - Nöroblastom	Herhangi	Negatif	Yok	Diploid	ORTA RİSK
MS	<18ay	Ganglionöroblastom - Nöroblastom	Herhangi	Negatif	Var	Herhangi	ORTA RİSK
L1	Herhangi	Ganglionöroblastom - Nöroblastom (Matür GN dışında)	Herhangi	Pozitif	Herhangi	Herhangi	YÜKSEK RİSK
L2	Herhangi	Ganglionöroblastom - Nöroblastom	Herhangi	Pozitif	Herhangi	Herhangi	YÜKSEK RİSK
M	<18ay	Ganglionöroblastom - Nöroblastom	Herhangi	Pozitif	Herhangi	Herhangi	YÜKSEK RİSK
M	≥18ay	Ganglionöroblastom - Nöroblastom	Herhangi	Negatif	Herhangi	Herhangi	YÜKSEK RİSK

MS	<18ay	Ganglionöroblastom - Nöroblastom	Herhangi	Pozitif	Herhangi	Herhangi	YÜKSEK RİSK
----	-------	-------------------------------------	----------	---------	----------	----------	----------------

2.1.3. Nöroblastomun Tedavisi ve Prognozu

Nöroblastomun heterojen klinik göstermesi nedeniyle, tedavi öngörülen davranışa yani risk grubuna göre seçilmektedir. Genel olarak düşük riskli nöroblastomda, cerrahi ile biyolojik faktörler ne olursa olsun yaşam oranları oldukça iyidir. Cerrahi, düşük riskli hastalığı olan çoğu hasta için tercih edilir. Bebeklik döneminin ötesinde düşük riskli tümörleri olan hastaların çoğunda cerrahi endikedir (53,54). Ameliyatla tedavi edilen hastalar genellikle adjuvan kemoterapiye ihtiyaç duymazlar. Her ne kadar düşük riskli hastalığı olan hastalar için ameliyat tercih edilen seçenek olsa da küçük tümörleri olan çok daha genç hastalardan oluşan bir alt grup (örn. INRGSS evre L1 hastalığı) tipik olarak yalnızca gözlemlerle tedavi edilir. Evre 1 hastalığı olan çocuklarda yalnızca ameliyatla iki ila beş yıllık olaysız sağkalım (EFS) oranları yüzde 93'ten fazladır; Nüksler daha ileri cerrahi veya kemoterapi ile başarılı bir şekilde yönetilebildiği için beş yıllık genel sağkalım (OS) oranları yaklaşık %90 civarındadır (53,54).

Düşük riskli L1/L2 hastaları için tedavinin temel dayanağı, mümkünse tam cerrahi rezeksiyon olmuştur. Ancak son zamanlarda, COG pilot çalışmasında bildirildiği üzere, tanıyı doğrulamak için biyopsi yapılmasa bile tek başına gözlemin, semptomları olmayan ve hacmi 16 ml'den az adrenal tümörü olan 6 aylıktan küçük bebeklerde uygun bir yaklaşım olduğu gösterilmiştir (55).

Kemoterapi erken tedavi rejimlerinin bir bileşeniydi ancak hasta sonuçlarına zarar vermeden ardışık klinik denemeler sonucunda yavaş yavaş kaldırıldı (53,54). Bu, cerrahi rezeksiyon ve ardından gözlem veya kemoterapi uygulanan INSS evre 2A ve 2B hastalığı olan 915 bebek ve çocuk için randomize olmayan bir COG klinik çalışmasıyla (P9641) gösterilmiştir. Kemoterapi, semptomatik hastalığı olan veya bu hastalık riski taşıyan, tanı sırasında yüzde 50'den az tümör rezeksiyonu olan veya yalnızca ameliyattan sonra rezeke edilemeyen ilerleyici hastalığı olan hastalar için

endikedir. Beş yıllık OS ve EFS, yalnızca ameliyatla tedavi edilen hastalarda, ameliyat ve kemoterapiyle tedavi edilenlerle karşılaştırıldığında benzerdir (56).

Küçük, asemptomatik adrenal kitleleri olan yenidoğanlar, hepatomegalisi olmayan evre MS (4S) hastalığı olan bebekler ve <5 cm lokalize hastalığı olan bir yaşından küçük bebekler için sadece gözlem ile tedavi önerilir (57).

Orta riskli nöroblastomu olan çocuklar için, tek başına cerrahi yerine cerrahi rezeksiyonla birlikte veya cerrahi rezeksiyon olmadan orta derecede yoğun multimodal neoadjuvan kemoterapi (örneğin, siklofosamid, doksorubisin, bir platin ajanı ve etoposid ile) önerilmektedir (58–60) Tedavinin amacı, en azından kısmi bir yanıt (yumuşak doku kitlelerinde en az yüzde 50 azalma) ve metastatik hastalığın çözülmesini sağlamak için yeterli bir kemoterapi süresi (müteakip cerrahi ile veya cerrahi olmadan) elde etmektir (61).

Tedaviye kombine modalite yaklaşımının gerekçesi, Çocuk Kanseri Grubu'nun (COG) orta evre hastalığı olan çocuklara beş kür kemoterapi, ardından cerrahi, bir kür daha kemoterapi, gross rezidüel hastalık için radyasyon tedavisi ve dört kür daha kemoterapi uyguladığı bir rapordan gelmektedir (58). Olumlu biyolojiye sahip hastalar için dört yıllık EFS yüzde 100 iken, en az bir olumsuz biyolojik özelliği olan bebekler için EFS yüzde 90'dır.

Hastalığın ilerlemesi ve mortalite açısından en yüksek risk altında olan hastalar genellikle 18 aylıktan büyük olan ve yaştan bağımsız olarak MYCN amplifikasyonu gibi olumsuz belirteçlere sahip yayılmış hastalığı veya lokalize hastalığı olan hastalardır. Yüksek riskli hastalık, son yirmi yılda 5 yıllık sağkalımda %29'dan %50'ye varan iyileşmeye rağmen, genel olarak kötü uzun vadeli sonuçlara sahiptir (62,63). Bu nedenle, tedavi yoğunluğunun sürekli olarak artırılmasına odaklanılmış, bunun sonucunda hastalar ve aileler için uzun süreli ve yoğun bir seyir izlenmiş ve hastanede yatış süresi önemli ölçüde artmıştır. Yüksek riskli hastalar arasında tanı anında 18 aydan büyük olan M evresi ve MYCN amplifikasyonu olan herhangi bir yaş ve evredeki hastalar yer almaktadır. Olumsuz histolojiye sahip ve yaşı 18 aydan büyük olan L2 hastaları da sıklıkla yüksek risk grubuna dahil edilir, ancak bu alt grupta miyeloablatif tedavinin yararı kesin olarak gösterilmemiştir (63). Tedavi, tümör

yükünü azaltarak cerrahi rezeksiyona daha uygun hale getirmek için tipik olarak bir platin ilacı, antrasiklinler ve alkilleyici ajanlar içeren çoklu indüksiyon kemoterapisi döngüsü ile başlar. Daha sonra primer tümörü çıkarmak için cerrahi yapılır. Bunu otolog kök hücre transplantasyonu ile bir veya iki kür miyeloablative tedavi ve ardından primer tümör yatağına radyasyon izler. İdame tedavisi izotretinoin ile farklılaştırma tedavisi ve anti-GD2 monoklonal antikor ve sitokinlerle immünoterapiden oluşur. Tedavi süresi yaklaşık 18 ay veya gecikmeler varsa daha uzundur (8).

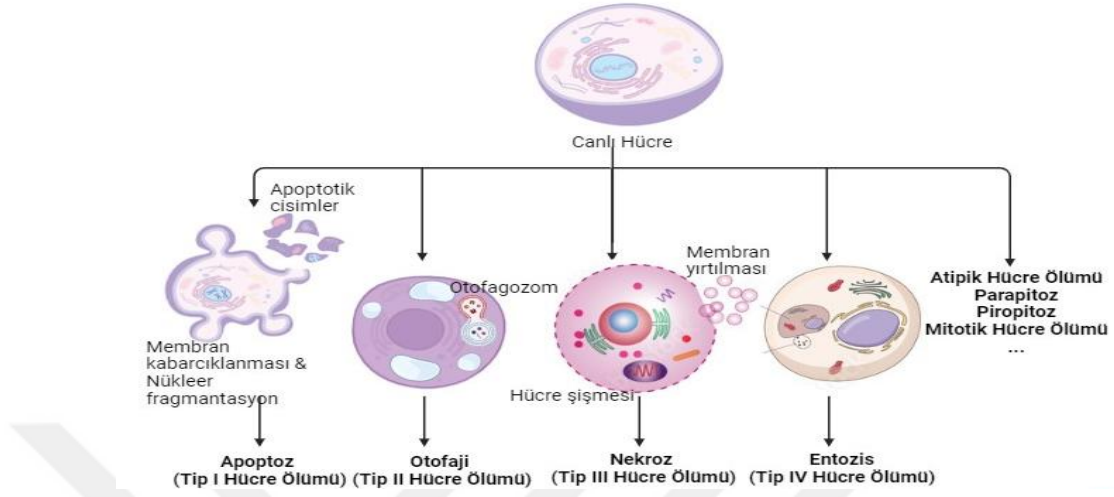
Nöroblastomda ALK inhibitörleri, Aurora kinaz inhibitörleri, Raf kinaz inhibitörleri, VEGF inhibitörleri, TRK inhibitörleri ve ornitin dekarboksilaz (ODC) inhibitörleri gibi hedefe yönelik küçük moleküllü inhibitörler de geliştirilmekte olup, bazıları nükseden hastalıkta aktivite göstermekte ve bu da oral yaşam uzatma seçeneği sağlayabilmektedir (8).

2.2. Kanserde Ölüm Mekanizmaları

2.2.1. Hücre Ölümü

Hücre ölümü (özellikle hücre intiharı), hasarlı hücreleri ortadan kaldırarak fizyolojik homeostazın korunmasında temel bir rol oynar ve aynı zamanda zarar verici uyarılara karşı anormal bir patolojik tepki de olabilir (64). Basit bir ifadeyle, hücre ölümü iki şekilde gerçekleşebilir. Bir yol, genlerin kontrolü altında aktif hücre ölümü sürecini tanımlayan fizyolojik bir hücre ölümü şekli olan apoptozdur (programlanmış hücre ölümü veya “hücre intiharı”; günümüzde tip I hücre ölümü olarak sınıflandırılmaktadır). Bu şekilde ölen hücreler, örneğin gelişim veya doku homeostazı sırasında, sitoplazmik büzülme, nükleer yoğunlaşma ve membran ve organel bütünlüğünün korunmasını içeren morfolojik özellikler sergiler (65). Diğer önemli hücre ölümü tipi, stres olaylarına yanıt olarak ortaya çıkan kontrolsüz bir hücre ölümü şekli olan nekrozdur (tip III hücre ölümü). Bu hücreler, hücre yaralanması, metabolik bozukluklar, patojenik istila veya fizyolojik doku hasarı gibi stres faktörlerinin bir sonucu olarak şişer ve patlar. Buna ek olarak, diğer iki hücre ölümü türü de sıklıkla ayırt edilir: Otofaji ile ilişkili hücre ölümü (tip II), hücre içeriğinin otofaji tarafından kendi kendine sindirilmesiyle tetiklenen başka bir programlı hücre ölümü türü ve

entozis (tip IV hücre ölümü) (66). Dördü de belirli uyaranlara yanıt olarak devreye giren farklı ve bazen örtüşen sinyal yolları aracılığıyla gerçekleştirilebilir (67).



Şekil 1. Morfolojik olarak ayırt edilebilen hücre ölümü tiplerinin basitleştirilmiş gösterimi.

(A) İki klasik ana tip, apoptoz (tip I) ve nekroz (tip III). Son araştırmalar ayrıca iki tip arasında ayrım yapmaktadır: (B) otofajik hücre ölümü (tip II) ve (C) entozis (tip IV). (D) Diğer (moleküler) tipler “atipik hücre ölümü” terimi altında gruplandırılmıştır (66).

Kanserler düzensiz hücre ölümü ve enflamatuvar yanıtlarla karakterize edildiğinden, mevcut tedavi stratejilerinin çoğu, malign olmayan hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerinde seçici olarak hücre ölümünü indüklemeyi amaçlamaktadır (68). Spontan hücre ölümü ile karşılaştırıldığında, düzenlenmiş hücre ölümü (RCD), genetik veya farmakolojik müdahalelerle modüle edilebilen spesifik sinyal iletim yolları tarafından kontrol edilir (69). RCD süreçlerinin farklı ölümcül alt rutinleri, kanserin ilerlemesini ve tedaviye yanıtı farklı şekilde etkiler (68,70). Bununla birlikte, kanser hücreleri RCD yollarını alt üst eden mutasyonlar edinerek antikanser tedavilere dirençli hale gelebilir ve hücre ölüm mekanizmasının atlatılması kanserin ayırt edici özelliklerinden biridir (71–73).

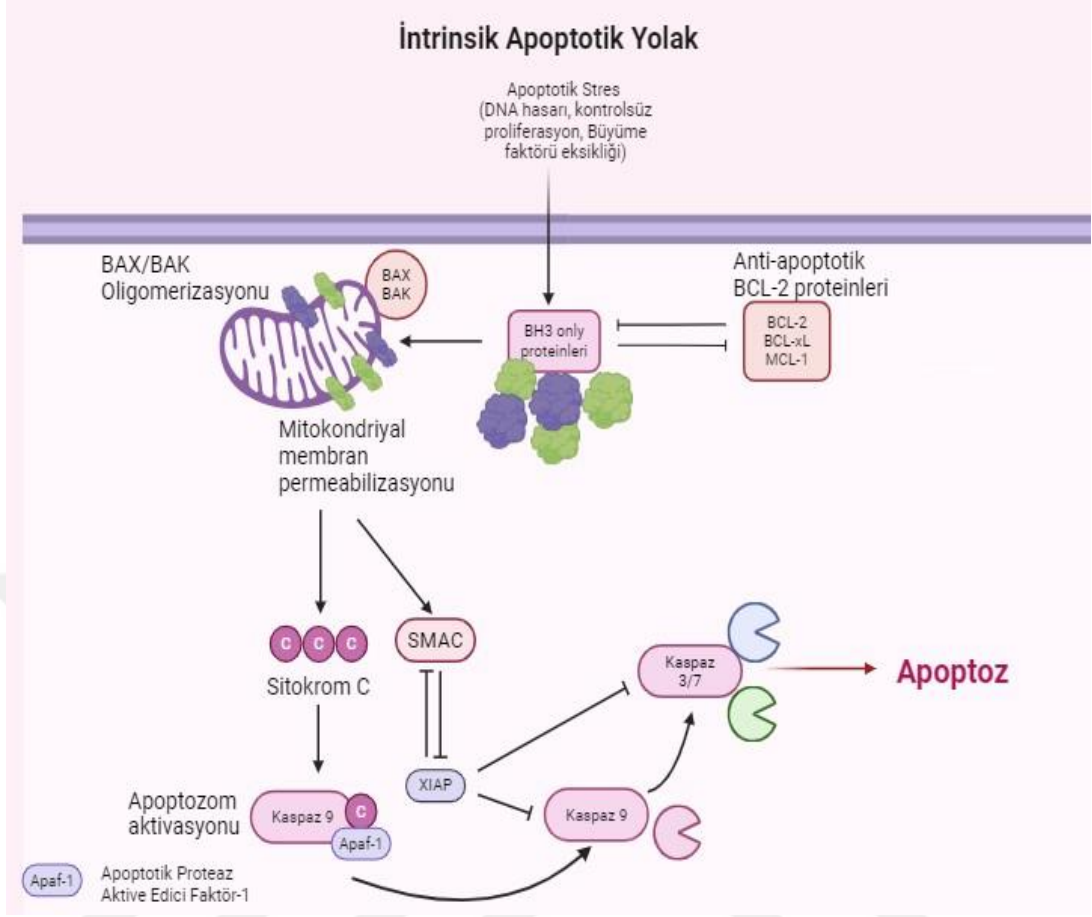
2.2.2. Apoptotik Hücre Ölümü

Kerr ve arkadaşları (1972) “apoptoz” terimini, bir katastrofik olayı (örneğin donma veya yanma) nedeniyle değil, fizyolojik bir intihar süreci sonucunda ölen hücreleri ifade etmek için kullanmayı önermiştir. İkincisi morfolojik olarak farklı bir süreç olan nekrozdur (65). Ayrıca apoptoz ve nekrozu kanser bağlamında ele almışlar ve hücre ölümünün uzun zamandır kötü huylu neoplazmların bir özelliği olarak bilindiğine dikkat çekmişlerdir. Başlangıçta çok az araştırmacı onların çalışmalarını dikkate aldı, ancak 1980'lerin sonunda işler değişti. Hücre ölümüne yönelik mevcut büyük ilgi, moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasından, apoptozun metazoanlar için yaşamın temel bir parçası olduğunun kabul edilmesinden ve hücrelerin apoptoza uğrama şeklinin solucanlardan memelilere kadar korunmuş olmasından kaynaklanmaktadır. Buna ek olarak, hücrelerin kendilerini öldürememesi insanlarda kanser gelişimiyle doğrudan bağlantılıdır ve tedaviye karşı direnci artırabilir (74).

Apoptoz, hücre büzülmesi, membran kabarcıklaşması ve kromatinin yoğunlaşması (piknoz) ile karakterize edilir (65). Kaspaz proteazlarının aktivasyonunun eşlik ettiği hücre ölümü olarak da tanımlanabilmektedir (75). Apoptotik hücre ölümü iki ana sinyal yolağı tarafından tetiklenmektedir: mitokondriyal (intrinsik) yolak ve ölüm reseptörü aracılı (ekstrinsik) yolak. İkincisi klasik bir ligand-reseptör etkileşimini içerir.

Apoptoz, bir sistein protein sınıfına ait olan kaspaz proteinleri (sistein aspartil spesifik proteazlar) tarafından hedef proteinlerin parçalanmasıyla gerçekleşir (76). Kaspaz proteaz aktivitesi, yüzlerce çeşitli proteini parçaladıkları için başarılı apoptoz için gereklidir (77). Dört başlatıcı kaspaz proteini (kaspaz-2, -8, -9, 10) ve üç yürütücü kaspaz proteini (kaspaz-3, -6, -7) vardır (76). Yürütücü kaspazlar hedef proteinleri parçalayarak hücrenin ölümüne yol açar. Yolaklar yüksek oranda düzenlenmiştir, böylece apoptoz yalnızca sinyal verildiğinde gerçekleşir. Özellikle intrinsik yolak, proapoptotik efektör proteinleri, proapoptotik BH3-only proteinleri ve antiapoptotik BCL-2 proteinlerini içeren B-hücreli lenfoma-2 (BCL-2) protein ailesi tarafından düzenlenir (77). Antiapoptotik BCL-2 proteinleri, proapoptotik BCL-2 proteinleri olan BCL-2-ilişkili X proteini (BAX) ve BCL-2 homolog antagonist katilinin (BAK) inhibisyonu yoluyla apoptozu engeller (76). BH3-only proteinleri antiapoptotik BCL-2 proteinlerini inhibe eder.

İntrinsik apoptoz mekanizması mitokondri ve mitokondriyal proteinleri kullanır (Şekil 2). Hasarlı DNA'ya sahip veya onkogenleri yukarı üzenlenmiş hücreler bu yolu uyabilir (79). Büyüme faktörü azlığı, yüksek Ca^{2+} seviyeleri, DNA hasarı ve mikrotübül hedefleyen ajanlar bu yolağı uyarırlar (78). Genel olarak intrinsik apoptotik yolak, BCL-2 protein ailesi tarafından düzenlenir (76). Çeşitli apoptotik uyarılar, BH3-only proteinlerinin yukarı regülasyonu ile sonuçlanır ve bunlar daha sonra BAX ve BAK'ı aktive ederler (80). BAX, bir tümör baskılayıcı gen olan p53 (81) tarafından regüle edilir. BAX ve BAK aktive olduktan sonra oligomerleşerek mitokondriyal dış membran permeabilizasyonuna (MOMP) yol açar. MOMP, intrinsik apoptozun tanımlayıcı olayıdır ve geri dönüşü olmayan nokta olarak kabul edilir (77). Permeabilizasyon, sitokrom c, ikinci mitokondri türevli kaspaz aktivatörü (SMAC) ve Omi gibi membranlar arası proteinlerin salınmasına izin verir. Sitokrom c'nin salınması üzerine sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1), dATP ve prokaspaz-9'dan apoptozom oluşur (78). Apoptozom içinde, prokaspaz-9 kaspaz-9'a dönüştürülür (76) ve bu da yürütücü kaspaz-3 ve -7'yi aktive eder (67). Cellat kaspazlar hızla hücre ölümüne yol açan proteinleri parçalamaya başlar. Kaspaz 3 aktivasyonunun sık kullanılan bir belirteci, apoptoz geçiren hücrelerde yaygın olarak gözlenen poli(ADP-riboz) polimerazın (PARP) parçalanmış formudur (82).

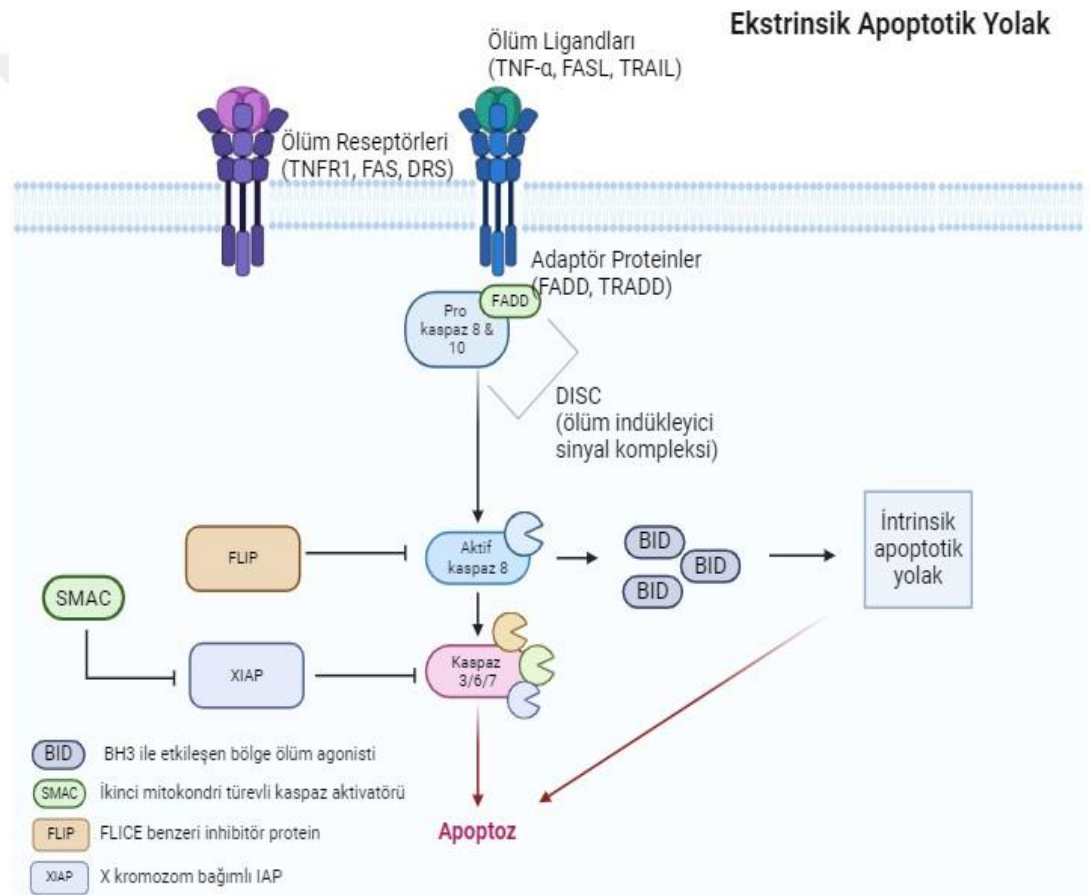


Şekil 2. İntrinsik apoptotik yolak. BH3-only proteinleri apoptotik strese yanıt olarak yukarı doğru düzenlenir.

BAX (BCL-2-ilişkili X proteini) ve BAK'ı (BCL-2 homolog antagonist katili) aktive ederek oligomerize olurlar ve mitokondriyal membran permeabilizasyonuna neden olurlar. Sitokrom c, SMAC (ikinci mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü) ve Omi salınır ve prokaspaz-9, dATP, sitokrom c ve APAF-1'den apoptozom kompleksi oluşur. Kaspazlar daha sonra aktive olur ve apoptozla sonuçlanan hücresel proteinleri parçalamaya başlar. Oklar aktivasyonu, T çubukları ise inhibisyonu temsil etmektedir (83).

Ekstrinsik yolak apoptozu indüklemek için hücre dışı sinyaller kullanır (Şekil 3). Ölüm ligandları olarak adlandırılan hücre ölümünü başlatan proteinler, tümör nekroz faktörü (TNF) ailesi ölüm reseptörlerine bağlanır (76). Ölüm ligandları arasında Fas ligand (Fas-L), TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) ve tümör nekroz faktörü (TNF) bulunmaktadır (84). Ölüm reseptörüne bir adaptör protein bağlanır

(76,85); adaptör proteinler arasında Fas-ilişkili ölüm alanı (FADD) ve TNF reseptör-ilişkili ölüm alanı (TRADD) bulunur (84). Başlatıcı prokaspaz-8 ve -10, adaptör proteine bağlanarak ölüm indükleyici sinyal kompleksini (DISC) oluşturur (76,85). Prokaspazlar, adaptör proteine bağlanan bir ölüm efektör alanına (DED) sahiptir (84). Prokaspaz-8 ve -10 DISC tarafından aktive edilir. Yürütücü kaspazlar-3, -6 ve -7 daha sonra aktive olarak hücre ölümüne yol açan proteinlerin ve hücre iskeletinin bölünmesini başlatır. DISC, kaspaz-8'e homolog olan ancak kaspaz aktivitesinden yoksun olan inhibitör c-FLICE benzeri inhibitör protein (c-FLIP) tarafından düzenlenir (76).



Şekil 3. Ekstrinsik yol, bir ölüm ligandının bir ölüm reseptörüne bağlanmasıyla başlar.

Bir adaptör protein reseptöre bağlanır. Adaptör protein ve prokaspaz-8 ve -10'dan DISC (ölüm indükleyici sinyal kompleksi) oluşur. Kaspaz-8 aktive olur, bu da kaspaz-3, -6 ve -7'yi ve BID'yi (BH3 etkileşimli-domain ölüm agonisti) aktive eder. BID, intrinsik yolu aktive eden BAX ve BAK'ı aktive etmeye devam eder. Kaspaz-3, -6 ve

-7 hücre ölümüyle sonuçlanan yürütücü kaspazlardır. Oklar aktivasyonu, T çubukları ise inhibisyonu temsil etmektedir (83).

Kanserin ayırt edici özellikleri, hücre tipinden bağımsız olarak tüm kanser hücrelerinde mevcuttur; bunlar arasında kontrolsüz büyüme, anjiyogenez ve apoptozdan kaçınma yer almaktadır (76,79). Kanserin önlenmesi apoptozun ana işlevlerinden biridir (77). Tipik olarak, kanser hücresinde inhibe edilen apoptotik yolak intrinsik yoldur, ancak kanser hücresi apoptozu çok çeşitli şekillerde inhibe edebilir. Apoptozun inhibisyonu, kanser hücrelerinin uzun süre hayatta kalmasını sağlar ve tümör ilerlemesi sırasında invazyonu ve hücre çoğalmasını arttırmak ve anjiyogenezi başlatmak için gerekli olan belirli mutasyonların oluşması ve birikmesi için daha fazla zaman kazandırır (78).

Kanser hücrelerinin apoptozdan kaçmasının birçok yolu vardır: kaspaz işlevi bozulabilir veya apoptoz başlatıcı sinyaller baskılanabilir. Antiapoptotik BCL-2 proteinlerinin yukarı regülasyonu ve BAX ve/veya BAK kaybı en çok görülen apoptozdan kaçış yöntemleridir. BCL-2 bir onkogen olarak kabul edilmez, ancak içindeki mutasyonlar tümör gelişimini destekler. BCL-2 proteininin aşırı ekspresyonu, türüne bakılmaksızın tüm kanserlerin yarısından fazlasında mevcuttur (77). Bu durum, bazı antikanser ilaçları da içeren herhangi bir intrinsik apoptotik uyarana dirençli tümör hücreleriyle sonuçlanır (78). Kanser hücrelerinin antikanser ilaçların indüklediği apoptozla karşı direnç kazanmasını sağlayan bir diğer mekanizma da PARP ekspresyonunun hiperaktif edilmesidir. Kanser hücrelerinin PARP'ları hiperaktif ederken sıklıkla cis-diammineplatinum(II) dichloride (cisplatin, CDDP) direnci geliştirdiği ve dolayısıyla PARP inhibitörlerinin sitotoksik etkilerine duyarlı hale geldiği gösterilmiştir.

2.2.3. Nekrotik Hücre Ölümü

Hücre sel nekroz veya nekrotik hücre ölümü, ortak bir paydası olan çok çeşitli hücre ölüm süreçlerini kapsar: plazma membran bütünlüğünün kaybı ve ardından sitoplazmik sızıntı (86). Nekroz, örneğin yüksek sıcaklıkta, donma-çözülme takiben veya mekanik strese bağlı olarak hücre bütünlüğünü bozacak kadar büyük bir hasarın sonucu olarak meydana gelebilir. Bu gibi durumlarda, hücre ölümü pasif bir süreç olarak ilerler ve herhangi bir özel sinyal yolağının aktifleşmesini gerektirmez. Plazma

zarının yırtılması ile karakterize edilen nekrotik morfoloji aynı zamanda apoptotik veya otofajik hücre ölüm süreçlerinin ileri aşamalarında, ölen hücreler fagositoz yoluyla ortamdaki temizlenemediğinde de görülebilir. Bu süreç sekonder nekroz olarak adlandırılır ve herhangi bir hücresel sinyalleşmeden bağımsızdır. Bununla birlikte, nekrotik hücre ölümü her zaman rastgele veya pasif bir süreç olmak zorunda değildir ve yönlendirilmiş bir sinyal akışının sonucu olarak da gerçekleşebilir (67).

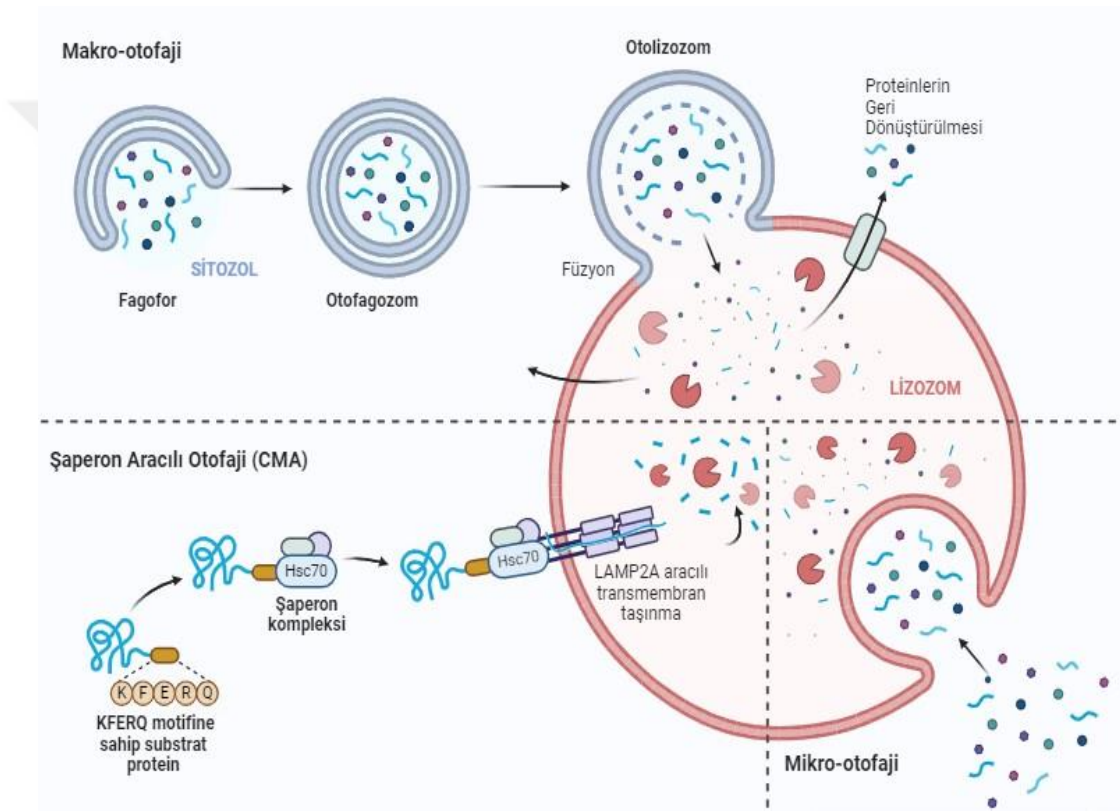
RIP'ye bağlı nekroz gibi, hücrelerde birkaç başka nekroz sinyali meydana gelebilir. Örneğin iskemi/reperfüzyon hasarı (I/R), bir doku geçici olarak kan akışından mahrum kaldığında ve daha sonra eski haline döndüğünde hücre ölümüne neden olur. Yüksek düzeyde kalsiyum akışı ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu bu tür hücre ölümüyle ilişkilendirilmiştir (87). Bunlar kısmen, mitokondriyal iç zarın küçük çözünen maddelere karşı geçirgen hale geldiği mitokondriyal geçirgenlik geçişine neden olarak hücre ölümünü tetikler (88).

2.2.4. Otofaji

2016 yılında Yoshinori Ohsumi, otofaji ve bunun insan sağlığı ve hastalıkları üzerindeki etkisi konusundaki çalışmaları nedeniyle Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü'ne layık görülmüştür (89). Otofaji, normal ve stresli koşullar altında hücre homeostazını ve hayatta kalmayı sürdürmeye yardımcı olan, evrimsel olarak korunmuş bir bozunma sürecidir. Bu hücre içi katabolik yolda, lizozomlara taşınan hasarlı sitoplazmik bileşenler lizozomal asit hidrolaz enzimleri tarafından parçalanır; ortaya çıkan amino asitler, yağ asitleri, şekerler ve nükleotitler gibi bileşenler sitozole salınır ve daha sonra hücresel metabolizma için kullanılır (90,91).

Üç temel otofaji türü tanımlanmıştır: mikro-otofaji, Şaperon aracılı otofaji (CMA) ve makro-otofaji. Her biri morfolojik olarak farklı olsa da üçü de kargonun parçalanma ve geri dönüşüm için lizozoma gönderilmesiyle sonuçlanır (Şekil 4) (92). Mikro-otofaji yolu, hasarlı ve gereksiz sitozolik bileşenlerin doğrudan lizozomal membran tarafından yakalanmasını ve ortadan kaldırılmasını içerir (93,94). Bu yol aynı zamanda organel boyutunun ve membran kompozisyonunun korunmasında da rol oynar (94). CMA, kargoyu ayırmak için membranöz yapıları kullanmaması, bunun yerine belirli bir peptid motifi içeren kargo proteinlerini işaretlemek için şaperonları

aracı olarak kullanması bakımından mikro-otofajiden ayrılır (95). CMA'da, spesifik bir KFERQ motifine sahip fazla ve hasarlı proteinler, ısı şoku proteini 70 (HSC-70) ve yardımcı şaperonları tarafından lizozomal membranın yakınına taşınır ve daha sonra lizozomla ilişkili membran proteini 2A (LAMP2A) adı verilen bir lizozomal membran proteini ile etkileşime girerek lizozomlara taşınır (94). Mikro-otofaji ve CMA'nın aksine, makro-otofaji kargonun lizozomdan uzakta tutulmasını içerir. Bu durumda, çift membranlı veziküllerin (otofagozomlar) de novo sentezi, kargoyu ayırmak ve daha sonra lizozoma taşımak için kullanılır (96).



Şekil 4. Memeli hücrelerinde üç tip otofaji.

Makro-otofaji, kargoyu ayırmak ve lizozoma taşımak için sitozolik çift zarlı veziküllerin yani otofagozomların de novo oluşumuna dayanır. Şaperon aracılı otofaji, tek tek katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinleri lizozomal membran boyunca taşır. Mikro-otofaji, kargonun doğrudan lizozomal membranın invajinasyonu yoluyla alımını içerir. Her üç otofaji türü de kargonun parçalanmasına ve parçalanma ürünlerinin geri dönüştürülerek hücre tarafından yeniden kullanılmak üzere sitozole

geri verilmesine yol açar. HSC-70: ısı şoku proteini 70, LAMP2A: lizozomla ilişkili membran proteini 2A(97).

Üç tip otofaji arasında makro-otofaji en çok araştırmacı tarafından çalışılanıdır. Makro-otofaji yapısal olarak düşük bir seviyede gerçekleşir ve sitoplazmik materyali biyosentetik süreçlerde veya enerji üretiminde kullanılacak metabolitlere dönüştürerek hücrenin hayatta kalmasını sağlamak için besin veya enerji açlığı gibi stres koşulları altında daha fazla indüklenebilir (96). Normal büyüme koşulları altında makro-otofaji, özellikle hasarlı veya gereksiz organelleri parçalayarak hücresel bakıma yardımcı olur (92). Bu nedenle, makro-otofaji öncelikle sitoprotektif bir mekanizmadır; ancak, aşırı kendi kendini bozma zararlı olabilir. Buna göre, otofajik işlev bozukluğu akciğer, karaciğer ve kalp hastalıkları, nörodejenerasyon, miyopatiler, kanser, yaşlanma ve diyabet gibi metabolik hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli insan patolojileriyle ilişkilidir (98).

Bugüne kadar 30'dan fazla otofaji ile ilişkili gen ve protein (otofaji ile ilişkili genler için ATG ve proteinleri için Atg) tanımlanmıştır (99,100). Otofaji süreci birkaç adımdan oluşur:

1. İlk adım, fagofor membran oluşumunun indüklenmesini içerir.
2. Çekirdeklenme; sitoplazmik bileşenlerin fincan şeklinde bir yapı oluşturan fagofor membran tarafından yutulması.
3. Uzama/genişleme; fagofor membran sitoplazmik bileşenleri çevreleyebilmek için genişler. Ortaya çıkan yapı, iki tabakalı membrana sahip bir yapı olan otofagozom olarak adlandırılır.
4. Füzyon ve degradasyon; otofagozomlar lizozomlarla birleşerek otolizozomları (genellikle otofagolizozomlar olarak adlandırılır) oluşturur ve ardından kargoları lizozomal hidrolaz tarafından yok edilir. Ortaya çıkan bileşenler hücresel enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere sitozole salınır (100,101).

Otofajik akış, açlık, hipoksi, büyüme faktörleri eksikliği, ATP/AMP oranı, hücre içi Reaktif oksijen türleri (ROS) oranları, patojenler veya kimyasal ilaçlar gibi içsel ve

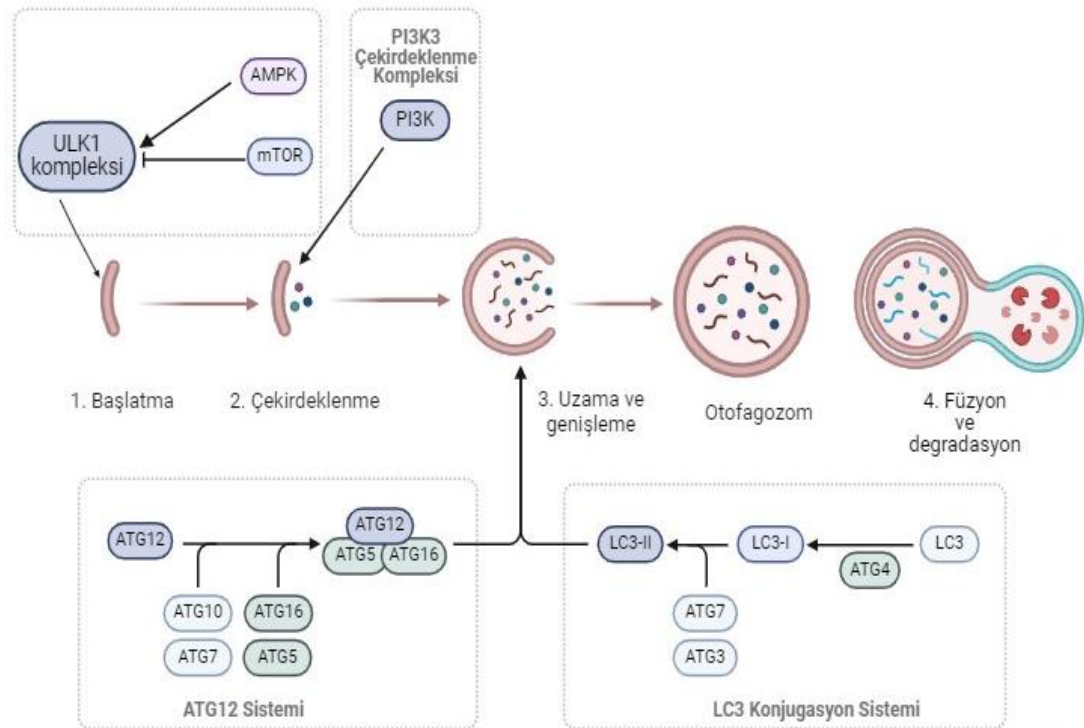
dışsal stresler tarafından tetiklenebilir (102). Memelilerde, fagofor öncelikle Fosfatidilinositol 3-fosfat (PI3P) için zenginleştirilmiş bir lipid çift katmanlı membran olan omegasom adı verilen Endoplazmik retikulum (ER) membranının bir alt alanında oluşur (103).

ULK1/2, 200 kDa'lık FAK ailesi etkileşimli protein (FIP200), Atg13 ve Atg101'den oluşan Unc-51 benzeri kinaz (ULK) kompleksi, fagofor oluşumunun başlatılmasından sorumludur (100). İlk adım, memeli rapamisin hedefi (mTOR) ve AMP ile aktive olan Protein Kinaz (AMPK) yolları tarafından düzenlenir. Normal koşullar altında ve yeterli amino asit ve büyüme faktörlerinin varlığında, Fosfatidilinositol 3-kinaz kompleksi 1 (PI3KC1) mTORC1 alt birimini aktive ederek mTOR kompleksinin aktivitesine yol açar ve böylece ULK kompleksinin iki alt birimi olan ULK1 ve Atg13'ün fosforilasyonu yoluyla otofaji başlatılmasını önler. Açlık koşullarında, mTORC1 başlatma kompleksinden ayrılarak ULK kompleksinin aktivasyonuna neden olur (100). Aslında ULK1, Atg13, Atg101 ve FIP200'ü fosforlar ve aktive eder. Aktivasyondan sonra ULK kompleksi genişleyen fagofor membranına lokalize olur. Başlatma kompleksi ayrıca mTORC1'i baskılayan AMPK'nın aktivasyonu ile de indüklenir. AMPK ise glikoz kısıtlaması ve ATP/AMP oranının azalmasıyla aktive olur (104,105).

Çekirdeklenme aşamasında, ULK1 proteini fosforile olur ve bir sınıf II fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3KC3) kompleksini aktive eder. Bu kompleks, Bcl-2 ile etkileşen miyozin benzeri sarmal (Beclin1), Vacuolar protein sıralama 34 (Vps34), Vps15 ve Atg14L'den oluşur (106). Beclin1 proteini, çekirdeklenme adımıyla yer alan faktörler için bir substrattır (107). PI3KC3 kompleksi ayrıca fagoforlarda fagofor çekirdeklenmesi için gerekli olan yerel PI3P üretir. PI3P, WD-tekrar alanı fosfoinozitid etkileşimli 2'nin (WIPI2) aktifleşmesini teşvik eder ve bu da fagofor uzaması için Atg12-Atg5-Atg16L kompleksini aktifleştirir (103). Başlatma ve çekirdeklenmede yer alan proteinler, plazma membranı, ER, mitokondri (106,108) veya Golgi aparatından (104,108) oluşturulabilen ve genişletilebilen fagofor membranının (103) oluşumuna katılır.

Uzama adımıyla, fagofor membranının genişlemesi ve kapanmasında rol oynayan iki ubikitin benzeri konjugasyon sistemi tanımlanmıştır (94,109): İlk

sistemde, Atg12 aktive edilir ve Atg5'e konjuge edilir. Atg7 (E1 ligaz) Atg12 aktivasyonunda rol oynar ve Atg10 (E2 ligaz) Atg12-Atg5 konjugasyonuna yardımcı olur (110). Atg12-Atg5 daha sonra Atg16L1 ile ilişkilendirilir ve böylece Lipidatlar mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3 (LC3) lipidasyonu için bir konum sağlayan otofaji uzama kompleksi oluşur (94). WIPI2'nin Atg16L'ye bağlanması, Atg12-Atg5-Atg16L kompleksinin otofagozom membranında yer almasını sağlar (110). İkinci sistemde, Atg4B tarafından bölünme yoluyla LC3 (ATG8 olarak da bilinir) LC3-I'ye dönüştürülür ve bu da LC3-II üretmek için sitoplazmada Fosfatidiletanolamin (PE) ile konjuge edilir. Daha sonra LC3-II otofagozom membranında birikerek yükün tanınmasına neden olur (94,107). LC3-II aynı zamanda bir otofagozom işaretleyicisi olarak görev yapar ve otofagozom olgunlaşması için gereklidir (107,109,110). Olgunlaşma ve kapanmadan sonra, otofagozom lizozom ile birleşir ve bu da sonuçta otofagozom kargosunun bozulmasına yol açar. Füzyon adımı Ras-ilişkili bağlanma proteinleri (Rabs), Çözünür N-etilmaleimide duyarlı faktör bağlanma proteinleri (SNARE'ler) ve bağlanma kompleksleri gibi çeşitli proteinler yer alır (110) (Şekil 5).



Şekil 5. Otofaji süreci birkaç ardışık adımdan oluşur.

(1) Başlatma. (2) Fagofor çekirdeklenmesi. (3) Fagofor uzaması. (4) Otofagozomun lizozom ile füzyonu ve kargonun otolizozomda parçalanması (111).

2.2.4.1 Otofajinin Kanserdeki Rolü

Otofajinin tümör başlangıcı ve gelişiminde önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır (112,113). Otofaji dalgalanmasının temel seviyeleri karşılaştırıldığında, kanser hücrelerindeki proteoliz veya otofajik bozulma miktarının normal muadillerinden daha az olduğu görülmüştür (114,115). Bu diferansiyel ifade, tümörigenez ile azalmış otofaji seviyeleri arasında doğrudan bir bağlantı olduğunu düşündürmektedir. İlginç bir şekilde, birçok onkogen ve tümör baskılayıcı gen otofajik yolları etkiler ve otofajik sürecin düzensizleşmesi malign transformasyona katkıda bulunur. Örneğin, otofajiyi aktive etmek için yapısal giriş sinyalleri sağlayan p53, fosfataz ve tensin homolog (PTEN), ölümle ilişkili protein kinaz (DAPK), tüberoz skleroz 1 (TSC1) ve TSC2 gibi birçok tümör baskılayıcı protein çoklu kanserlerde mutasyona uğramaktadır (116).

Tersine, Akt, mTOR, Bcl-2 ve FLICE benzeri inhibitör protein (FLIP) gibi onkogenler otofajik süreçleri inhibe ederek yüksek otofaji sinyalinin tümör baskılanmasına katkıda bulunabileceğini gösterir (117,118). Çoğu kanserde, PI3K-Akt eksenini ya yukarı ya da aşağı yönlü düzenleyicilerde mutasyona uğrar. Böylece, mTOR'un aşağı yönlü aktivasyonu hücre büyümesinin uyarılmasını ve otofajinin inhibisyonunu destekler (119).

Tümör metastazı, birincil bölgedeki tümör hücrelerinin uzak organ bölgelerine göç ettiği ve buralarda kolonize olduğu karmaşık, çok aşamalı bir süreçtir (120). Primer tümörlerde, inflamatuvar hücreler hipoksi ve metabolik stres sonucu oluşan nekroza yanıt olarak tümör bölgelerine sızar (121,122). Hipoksi ve metabolik stres tarafından teşvik edilen koruyucu otofaji, metastazın başlaması için gerekli olan birincil bölgelerdeki enflamasyonu engeller. İlginç bir şekilde, otofaji nekrozu ve ardından makrofaj infiltrasyonunu azaltarak primer tümör büyümesini azaltır ve otofajinin genetik olarak engellenmesi hücre ölümüne, doku hasarına ve kronik inflamasyona neden olabilir (123).

Otofajinin antimetastatik özelliklerinin yanı sıra, tümör hücrelerinin metastatik potansiyelini artıran ters bir etkisi de olabilir. Ölüm ligandının indüklediği apoptozun, özellikle de TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligandın (TRAIL), T-hücreleri ve NK hücreleri tarafından metastazın baskılanmasının düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığı iyi bilinmektedir (124). Ancak son zamanlarda TRAIL'e dirençli kanser hücrelerinde koruyucu otofajinin düzenlendiği ve bunun da metastaz sırasında tümör hücrelerinin canlılığını ve hayatta kalmasını artırdığı gösterilmiştir (125,126).

Kanser hücreleri genellikle kusurlu otofajik kapasiteler gösterdiğinden, otofajinin indüksiyonu bir tümör baskılayıcı mekanizma olarak görülmektedir. Otofajik ölümün, “tip II programlı hücre ölümünün” indüklenmesi, apoptoza dirençli kanser hücreleri için yararlı bir terapötik yaklaşım olabilir ve kanser hücresi ölümünü teşvik etmede apoptoz ile birlikte tamamlayıcı bir yaklaşım sağlayabilir. Öte yandan, otofajinin tedavi aracılı tümör hücresi ölümüne karşı direnç sağladığı gösterilmiştir. Tümör hücreleri koruyucu otofajiyi indüklediğinde, otofajinin inhibisyonu apoptozu aktive ederek tümör hücrelerini tedaviye duyarlı hale getirmenin bir yolunu sağlayabilir. Antikanser ilaçların neden olduğu otofaji, hücre tipine ve genetik geçmişe bağlı olarak ortaya çıkabilir. Tedavinin türüne bağlı olarak, aynı hücrede farklı sinyal yolları aktive olabilir ve çeşitli otofaji türleri üretebilir. Otofajinin “koruyucu” mu yoksa “toksik” mi olacağını anlamak, daha fazla gelişme için kilit bir alandır ve belirli kanser bağlamlarında otofajiyi engellemenin veya teşvik etmenin uygun olup olmadığını tanımlayacaktır (127–129).

2.3. Polieter İyonoforlar

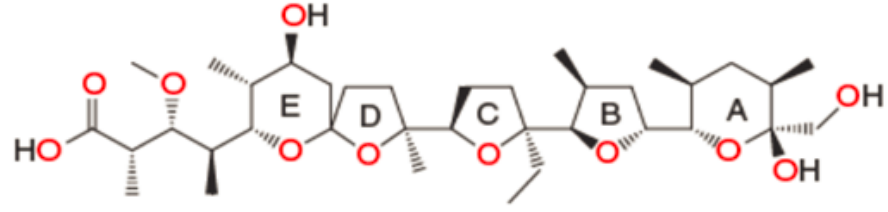
Polieter iyonoforlar, doğal olarak oluşan bileşiklerin çok büyük ve önemli bir grubudur. Son yıllarda bu tür bileşiklere olan ilginin arttığı gözlenmektedir. Bilinen 120'den fazla doğal olarak oluşan iyonofor vardır (130). İyonoforların başlıca ticari kullanımı koksidiyozu kontrol etmektir. Ayrıca ruminantlarda büyümeyi teşvik edici olarak da kullanılırlar. Bu bileşikler özellikle ruminal bakteri popülasyonunu hedef alarak üretim verimliliğini artırır (131).

Doğal polieter iyonofor antibiyotikler, güçlü antibiyotikler olan ve doğal olarak oluşan daha geniş iyonofor ailesine ait olan şaşırtıcı kimyasal yapılardır. İlk kez 1967

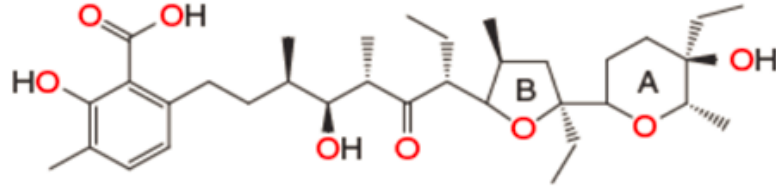
yılında kullanılan “iyonofor” teriminin, bir molekülün bir metal iyonunu bağlama ve hücre zarlarından taşınmasını kolaylaştırma yeteneğini ifade ettiği bilinmektedir. Bu kimyasal-fizyolojik özellik, polieter iyonoforları katyon taşıma mekanizmalarının incelenmesinde yararlı bir araç haline getirmiş ve biyolojik aktiviteleri için bir gerekçe olarak hizmet etmiştir (132–134). “Polieter” terimi, birkaç eter fonksiyonel grubuna sahip olan bu antibiyotik sınıfının kimyasal yapısını yansıtmaktadır (135). Polieter iyonoforlar, merdiven polieterlerin farklı ailelerini içeren ve çok çeşitli yüksek biyolojik aktiviteler sergileyen, çoklu C-O-C motiflerinin düzenli olarak meydana geldiği skualen türevleri olan bir organik madde sınıfıdır (136,137). Bununla birlikte, Nakanishi hipotezine göre, birçok deniz polieter metaboliti çoklu doymamış yağ asitlerinden biyosentezlenebilir (137,138). Bu polieter bileşikleri sınıfı tek hücreli deniz algleri, kırmızı deniz yosunları, deniz süngerleri ve koelenteratlar tarafından üretilir veya yumuşakçalar gibi bazı deniz organizmaları tarafından depolanır (139–142).

2.3.1. Polieter İyonoforların Kimyasal Yapısı ve Etki Mekanizması

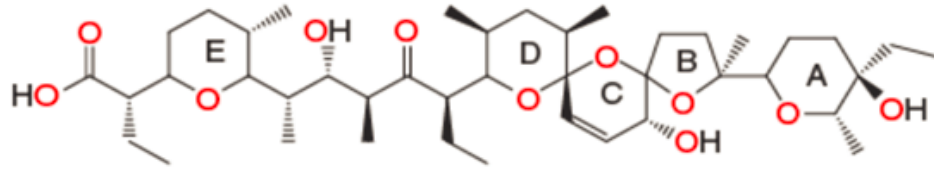
Öncelikle polieter antibiyotiklerin yapısı, doğrudan karbon-karbon (CC) bağı veya Spiro bağlantıları gibi alifatik kimyasal bağlarla bağlanmış çoklu tetrahidropiran ve tetrahidrofuran halkalarından oluşur. Bir terminal karboksilik asit grubu, birkaç hidroksil grubu, alt alkil grupları ve çeşitli fonksiyonel oksijen grupları da tam kimyasal yapının oluşumuna katkıda bulunur (Şekil 6). Bu gruplar metal iyonları ile kompleks oluşturmada önemli rol oynar (143). Polieter antibiyotikler, omurgalarında bulunan karbon atomlarının sayısına göre çeşitli gruplarda sınıflandırılır (143). Bunlar arasında en sık karşılaşılan bileşikler, tüm polieter sınıfı antibiyotiklerin yaklaşık %60'ını oluşturan 30 karbonlu iskeletlerdir. Geniş bir mikrobiyal enzim ailesi olan poliketid sentazlar (PKS'ler) 3, poliketid omurga uzantısı için yapı taşları olarak asetil-CoA ve propil-CoA'yı birleştirerek polieter antibiyotiklerin biyosentezini katalize eder (144).



Monensin



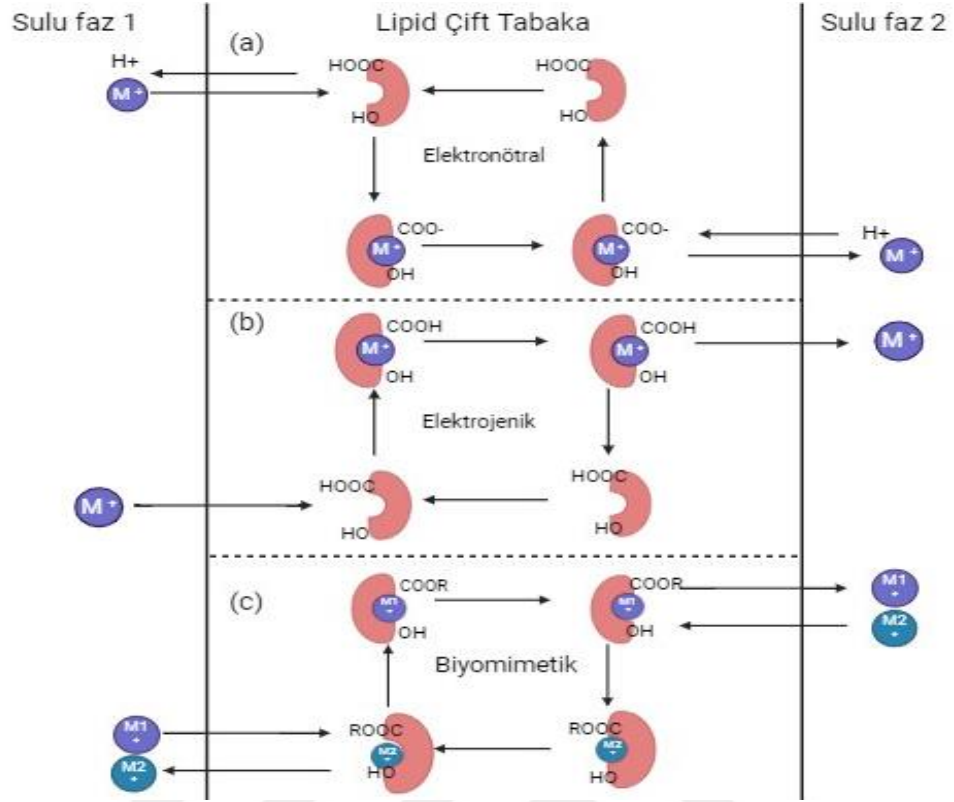
Lasolosit A



Salinomisin

Şekil 6. Bazı önemli polietar antibiyotiklerin doğrusal kimyasal yapıları (145).

Geleneksel olarak, tüm iyonoforların farklı mekanizmalarla biyolojik membranlar boyunca katyon/proton taşınmasından birincil olarak sorumlu olduğu kabul edilmektedir. Her bir bileşik tarafından izlenen bu farklı mekanizmaların araştırılması ve daha iyi bilinmesi, geniş biyolojik aktivite spektrumlarının daha iyi anlaşılmasına yol açmaktadır. Membran boyunca, yüksek hücre dışı Na^+ konsantrasyonu ve yüksek hücre içi K^+ konsantrasyonu gibi katyonların konsantrasyon gradyanı ve bunun tersi, hücrelerin normal fizyolojik davranışı için zorunludur (146). Öncelikle, iyonoforlar lipid çift tabaka veya plazma membranı boyunca katyon/proton taşıyarak bu Na^+/K^+ konsantrasyon gradyanının bozulmasına yol açar. İyonoforlar bunu hücrenin çevresindeki pH'a bağlı olarak üç farklı mekanizma (elektronötral, elektrojenik ve biyomimetik) ile gerçekleştirir (Şekil 7) (135,147,148).



Şekil 7. Membran boyunca iyon taşıma mekanizması (148).

2.3.2. Polieter İyonoforlar ve Otofaji

Başlangıçta, iyonoforların membran reseptörlerinin Golgi aparatından plazma membranına doğru taşınmasını engelleyerek Golgi bölgesinde vezikül oluşumuna ve sonuç olarak Golgi aparatının genişlemesine yol açabileceği bildirilmiştir (149). Bununla birlikte, daha sonraki çalışmalar, iyonoforların ökaryotik hücredeki birincil rolünün, makrofajlarda iyonların transmembran değişimi nedeniyle proton gradyanının kaybı olduğunu, bunun da lizozomlarda pH'ın artmasına ve lizozomal bozunmanın engellenmesine neden olduğunu ortaya koymuştur (150). Polieter antibiyotikler arasında, monensin ve nigerisin otofaji üzerindeki etkileri açısından incelenen en yaygın antibiyotiklerdir. Başlangıçta, monensinin hücre içinde otofajik vakuoller biriktirdiği rapor edilmiştir. Bu hücrelerde, elektron mikroskobu ile bu vakuollerin ortalama büyüklüğünün 4-5 küçük vakuolden oluşan normal vakuole kıyasla iki kat olduğu da gözlemlenmiştir (13). Daha ileri çalışmalar, monensinin otofaji yolunun terminal füzyon aşamasını, yani otofagozom ve lizozom füzyonunu inhibe ederek otofajik vakuollerin birikmesine yol açtığını ve HeLa hücre hattında

apoptozu tetiklediğini doğrulamıştır (151). Benzer şekilde, başka bir çalışmada, poliyeter antibiyotikler monensin ve nigerisin her ikisinin de MN9D nöronal hücrelerinde otofagozom ve lizozom füzyonu üzerindeki inhibitör etkilerini göstererek sitoplazmada otofajik vakuollerin birikmesine neden olduğu ortaya konmuştur. Buna paralel olarak, Western blot analizi, bu poliyeter antibiyotiklerin tedavisi üzerine kaspaz 3'ün parçalanması ile birlikte hem otofaji akış belirteçleri LC3-II hem de p62'nin biriktiğini göstermiştir (152). Bununla birlikte, monensinin rapamisin (mTOR inhibitörü) veya erlotinib (epidermal büyüme faktörü reseptörü inhibitörü) gibi antikanser ilaçlarla eşzamanlı tedavisinin, akciğer kanseri hücre hattı NCI-H1299'da sinerjik antikanser aktivitesinin artmasıyla sonuçlandığı gösterilmiştir. Otofajinin hayatta kalma yanlısı rolü nedeniyle, kanser tedavisi sırasında, özellikle otofajik yolun negatif düzenleyicisi olan mTOR'u inhibe eden rapamisin tedavisi durumunda, hücrelerin otofaji yoluyla ölümden kaçmayı başardığı iyi bilinmektedir. Bununla birlikte, monensin gibi otofaji inhibitörü ile eş zamanlı tedavi durumunda, Bax gibi pro-apoptotik proteinlerin ve bölünmüş kaspaz 3 ve poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) gibi apoptoz yürütücülerinin yüksek konsantrasyonuna yol açarken, bcl-2 ve bcl-xL gibi anti-apoptotik proteinlerin konsantrasyonu azalır. Buna paralel olarak, LC3-II ve p62 otofaji belirteçlerinin her ikisi de kombinasyon tedavisinde artmıştır, bu da apoptotik aktivitenin otofajinin inhibisyonu ile tetiklendiğini düşündürmektedir (153). Bir başka çalışma, monensin, nigerisin, salinomisin, narsin ve lasalosid gibi poliyeter antibiyotiklerin malign glioma hücrelerinde tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptoz ile indüklenen ligand (TRAIL) direncinin üstesinden geldiğini ortaya koymuştur. Bu poliyeter antibiyotikler, ER stresini, CHOP aracılı DR5 upregülasyonunu ve proteazomal degradasyonla c-FLIP downregülasyonunu tetikleyerek bu hücrelerin TRAIL aracılı apoptoza karşı duyarlılığını geri kazandırmış ve özellikle dirençli kanser hücre hatlarının tedavisinde kombinasyon terapisinde etkili moleküller haline getirmiştir (154).

2.3.3. Poliyeter İyonoforlar ve Kanser

Kapsamlı olarak araştırılan antibiyotik aktivitelere ek olarak, son çalışmalar bazı iyonoforların önemli antikanser özellikler gösterdiğini de ortaya koymuştur. Bu

bağlamda özellikle ilginç olan üç çok işlevli bileşik lasalosid asit, monensin ve salinomisin gibi görünmektedir (155).

Lasalosid asitin antikanser özellikleri, meme, kolon ve akciğer adenokarsinom hücre hatları da dahil olmak üzere bir dizi kanser hücre hattı üzerinde yapılan araştırmalarda kanıtlanmıştır (156). Daha da önemlisi, lasalosid asit tümör dışı hücreler üzerinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ilaç sisplatininden daha aktif ve aynı zamanda daha düşük sitotoksik özellikler sergilemiştir (156). Daha ileri çalışmalar lasalosid asidin insan prostat kanserine karşı olumlu etkilerini doğrulamıştır (157). Monensin ise prostat kanseri hücrelerine karşı ~5000 iyi bilinen ilaç ve ilaç benzeri bileşiğin tarandığı bir çalışmada, nanomolar konsantrasyonlarda, bu kanser hücrelerinin hücre büyümesini seçici olarak inhibe etme yeteneğini ortaya koyan sadece dört ajandan biri olarak tanımlanmıştır (158). Diğer bazı araştırmacılar ayrıca monensinin lenfoma ve kemorezistan bir pankreas kanseri varyantı da dahil olmak üzere diğer birçok kanser hücresi türünün çoğalmasını engellediğini göstermiştir (159–161). Ayrıca, bu antibiyotik kanser hücrelerine karşı diğer bileşiklerle birlikte sinerjik etkisiyle de bilinmektedir. Bir çalışmada, immünotoksin SWA11 risin A zincirinin sitotoksik aktivitesinin, protein sentezinin inhibisyonunu iki kat artırırken, klonojenik tümör hücrelerine karşı monensin tarafından 100 kat artırıldığı gösterilmiştir (162,163). Ayrıca, anti-proliferatif aktivitesi HeLa hücre hattının bir türevidir olan KB parent ve KB/MDR (çoklu ilaç direncine sahip KB) hücrelerine karşı tek başına ve doksorubisin ile kombinasyon halinde doksorubisinin dışı atılımını azalttığı gözlenmiştir. Monensin varlığında, KB/MDR hücrelerinde doksorubisinin hücre içi konsantrasyonunun üç kat artması nedeniyle doksorubisinin IC50 değerinin 5 kat azaldığı bildirilmiştir (164). Salinomisinin antikanser aktivitesi ise ilk olarak 2009 yılında, bu maddenin meme kanseri kök hücrelerinin (CSC'ler) seçici hedeflenmesinde taranan ~16.000 bileşik arasından en güçlü ajan olarak tanımlanmasıyla rapor edilmiştir (165). Bu sonuçlar, salinomisinin lösemik hücrelerde spesifik olarak apoptozu tetiklediği ve normal hücrelere karşı herhangi bir yan etkisi olmadığının gösterildiği başka bir çalışma ile desteklenmiştir (166). Ayrıca, bu antibiyotik, ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcısının yüksek ekspresyonuna sahip çoklu ilaca dirençli (MDR) lösemik CSC'lerde apoptozu indüklemiştir (167). Ayrıca, bu bileşiğin A-549 ve LNM35 gibi insan akciğer kanseri hücre hatlarında kaspaz 3/7 ile ilişkili apoptozu

indüklediği, metastaz ve invazyonu inhibe ettiği rapor edilmiştir (168). İnsan kolon kanseri hücre hatlarıyla yapılan bir çalışmada ise salinomisin, kolon kanseri tedavisi için yaygın olarak kullanılan sitostatik ilaç oksaliplatine kıyasla dikkate değer bir sitotoksik aktivite göstermiştir (169). Kemorezistan prostat kanseri hücre hatlarında (LNCaP, PC-3 ve DU-145), bu antibiyotik mitokondriyal depolarizasyon, sitokrom c salınımı ve ardından kaspaz 3'ün aktivasyonu ile apoptozla sonuçlanan reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesine neden olmuştur (170,171). Ayrıca, salinomisinin sisplatin, Taksol (Paklitaksel) ve 5-florourasile dirençli CSC'lere karşı etkinliği bildirilmiştir (171). Bu antibiyotiğin insan pankreas kanseri hücrelerine karşı gemsitabin ile kombinasyon halinde sinerjik etkisi de rapor edilmiştir (172). Uygun dozlarda kullanıldığında, salinomisinin kanser hastaları tarafından iyi tolere edildiğini belirtmek gerekir (173). Salinomisinin meme kanserine karşı etkinliğinin yanı sıra, ilaca duyarlı ve ilaca dirençli diğer kanser türlerini yok etmede de etkili olduğu bulunmuştur (174).

2.4. K41-A

K41-A, *Streptomyces* türlerinden izole edilen, Gram-pozitif bakterilere karşı antibakteriyel aktivite, anti-koksidal aktivite ve in vivo kümes hayvanları için gecikmiş toksisite bildirilen polisiklik bir polieter molekülüdür (175). Khan ve arkadaşları ile Gezer ve arkadaşları, Mersin Kıyı Şeridi'nden (Türkiye) elde edilen bir sediman örneğinden *Streptomyces cacaoi*'den K41-A izole etmişlerdir (16,17). Khan ve arkadaşları, K41-1'in insan servikal karsinom (HeLa), insan prostat kanseri (PC-3), insan akciğer adenokarsinomu (A549) ve insan kolorektal adenokarsinom (CaCo-2) hücreleri kullanılarak gösterilen antikanser özelliklere sahip olduğunu bildirmişlerdir (16). İzole edilen bu bileşiğin kanser hücre hatlarında otofaji üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Yazarlar, izole edilen polieter antibiyotiklerin otofajiyi inhibe edebileceğini öne sürmüşlerdir (16).

Bu çalışma, K41-A'nın nöroblastom hücre hatlarında ve in vivo nöroblastom ksenograft modelinde potansiyel anti-kanserojenik etkilerini değerlendirmeyi amaçlamaktadır. K41-A'nın otofaji ve apoptoz üzerindeki etkisi otofaji (LC3-II, p62/SQSTM1 ve Beclin-1) ve apoptoz (PARP-1, kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9) ile ilişkili protein ve mRNA seviyeleri ile değerlendirilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Deneyisel niteliğe sahip bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı

Ocak 2019- Eylül 2023 yılları içerisinde Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir. Mart 2022-Mayıs 2024

Eylül 2021- Mart 2022	Etik kurul kabulü (29.09.2021)
	Tez önerisinin hazırlanması (23.02.2022)
	Tez önerisi sunumu ve kabulü (02.03.2022)
Mart 2022- Ağustos 2022	TUSEB proje başvurusunun sunulması (04.04.2022)
	Ön deneylere başlanması
	TUSEB proje başvurusunun kabulü (16.08.2022)
Ağustos 2022- Aralık 2022	BAP projesinin sunulması (22.08.2022)
	BAP projesi kabulü (14.11.2022)
	Malzemelerin temin edilmesi
	Deneylere başlanması
Aralık 2022- Haziran 2024	Hücre canlılık deneylerinin tamamlanması
	Akım sitometri analizlerinin gerçekleştirilmesi
	In-vivo deneylerin tamamlanması
	İmmunohistokimyasal analizlerin tamamlanması
	Q-PCR analizlerinin gerçekleştirilmesi
	Makale kabul süreçlerinin tamamlanması (09.10.2023)
Haziran 2024-Eylül 2024	İstatiksel analizler
	Tez yazımı süreçlerinin tamamlanması
	Tezin makaleye dönüştürülmesi

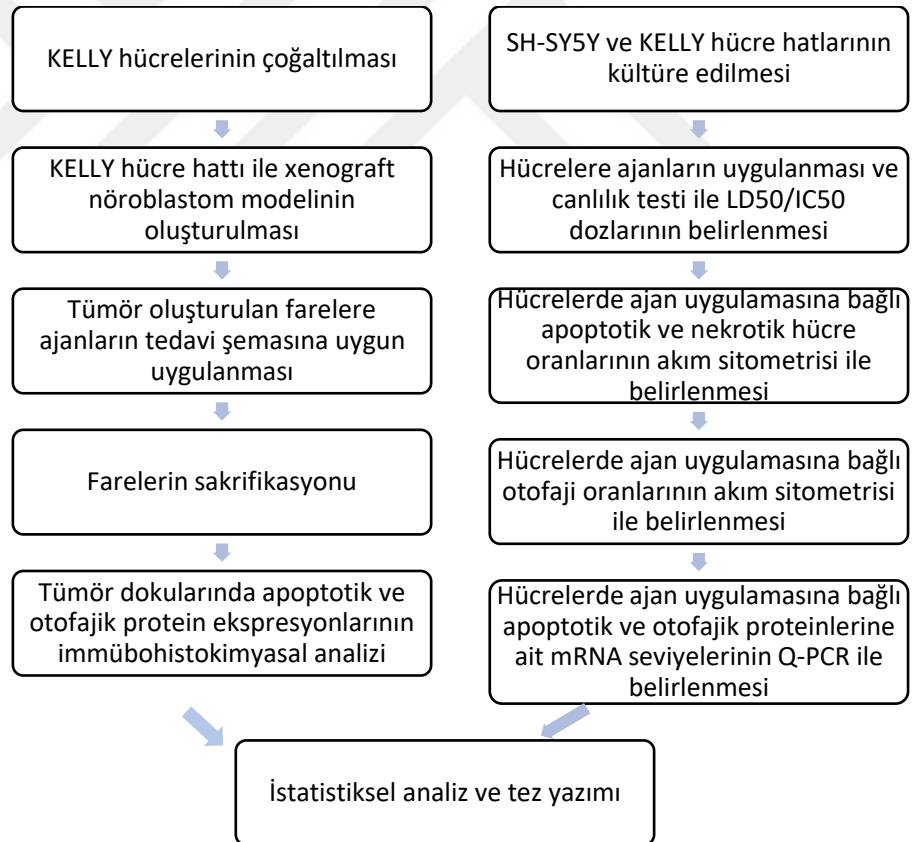
3.3. Çalışma Materyali

Çalışma kapsamında SH-SY5Y ve KELLY insan nöroblastom hücre hatları kullanılmıştır. Hücre hatlarımız hali hazırda Temel Onkoloji AD stoklarında bulunmaktadır. Deneysel çalışmalar bu hücre hatları üzerinde gerçekleştirilmiştir.

3.4. Araştırmanın Değişkeni

Bağımsız Değişken: K41-A, sisplatin, K41-A+sisplatin

Bağımlı Değişken: hücre canlılığı, hücre apoptoz oranı, hücre nekroz oranı, hücre otofaji oranı, in vivo apoptotik ve otofajik protein ekspresyonları, in vivo tümör boyutu, tümör büyüme hızı, in vivo apoptotik ve otofajik protein ekspresyonları



Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

Malzeme Adı	Markası/Kod	Kullanım Amacı
KELLY	RRID:CVCL_2092	Çalışmada kullanılan insan nöroblastom hücre hattı
SH-SY5Y	ATCC CRL-2266	Çalışmada kullanılan insan nöroblastom hücre hattı
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Cegrogen, E0500-160	Hücrelerin büyütülmesi için bazal ortam
RPMI-1640	Cegrogen, E0500-360	Hücrelerin büyütülmesi için bazal ortam
Fetal Bovin Serum (FBS)	Capricorn, FBS-HI-12B	Hücrelerin büyütülmesi için serum
L-glutamin	Capricorn, GLN-B	Hücrelerin büyütülmesi için esansiyal olmayan aminoasit
Penisillin-streptomisin	Capricorn, PS-B	Hücreleri enfeksiyondan korumak için antibiyotik
Trypsin-EDTA	Cegrogen, N0100-720	Hücreleri pasajlarken kaldırmak için kullanılan enzim
Fosfat salin tamponu (PBS)	Cegrogen, H0500-550	Hücreleri yıkama ve ortam kalıntılarını uzaklaştırma tamponu
Dimetil sulfoksit (DMSO)	Appllichem, A3672	Hücreleri dondurma için kullanılmaktadır
WST-1	Sciencecell, 8038	Hücre canlılığının ölçümünde kullanılmaktadır
Hücre kültür flaskları (25, 75,175 cm ²)	Biofil, TCF011050 – 012250 – 012600)	Hücreleri yetiştirmede kullanılan steril kaplar
96'lı kuyucuklu plaka (wellplate)	Corning, CLS3340	Hücre canlılık deneylerinde hücrelerin ekildiği plakalar
Serolojik pipet 2-5-10-25 ml	Biofil, GSP010002 – 010005 – 010010 - 010025	Hücre kültüründe besi ortamı eklemek ve uzaklaştırmak için kullanılır
Test tüpü (15ml-50ml)	Biofil, CFT011150 - 11500	Hücreleri santrifüj etmekte kullanılan konik tabanlı tüpler
Mikrosantrifuj tüpü 1.5ml	Isolab, 078.03.021	RNA izolasyonu, PCR deneylerinde santrifüj için kullanılan tüpler

Kryotüp	Isolab, 091.11.102	Hücre dondurmak için kullanılan özel kaplar
Cisplatin	Koçak Farma / 50mg/100ml infüzyon çözeltisi	Hücre canlılık deneylerinde kemoterapi ilacı olarak kullanılmıştır
Trypan blue	CDH, 899795	Hücre sayımında kullanılmıştır
Thoma lamı	Isolab, I.075.03.002.001	Hücre sayımında kullanılmıştır
AnnexinV/PI kit	Elabscience, E-CK-A211-100A	Akım sitometrisi deneylerinde boyama için kullanılmıştır
Otofaji kiti	Abcam, ab139484	Akım sitometrisi deneylerinde boyama için kullanılmıştır
5ml flow tüpü	Corning, 352235	Akım sitometri deneylerinde kullanılmıştır
RNA izolasyon kiti	Norgen Biotek, 17200	Hücre örneklerinden RNA izolasyonunda kullanılmıştır.
cDNA sentez kiti	Bio-Rad Laboratories iScript cDNA Synthesis Kit, 1708891	mRNA'dan cDNA sentezi için kullanılmıştır
Primerler	Oligomer Biyoteknoloji	PCR deneylerinde kullanılmıştır
DNaz/RNaz free water	Invitrogen, 10977015	Primerlerin ve DNA ve RNA'ların çözülmesi için kullanılmıştır
SYBR green	Bio-Rad Laboratories iTaq SYBR® Green Supermix iTaq Universal SYBR® Green Supermix, 172-510	QPCR'da gen ekspresyon deneyleri için kullanılmıştır.
Pipet uçları	VQIR, 613605 – 613606 - 613607	Tüm deney aşamalarında kullanılmıştır
Cleaved Kaspaz 3 antikoru	Elabscience, E-AB-30004	İmmünohistokimyasal deneylerde kullanılmıştır.
Cleaved Kaspaz 8 antikoru		İmmünohistokimyasal deneylerde kullanılmıştır.
Cleaved Kaspaz 9 antikoru	Proteintech, 10380-1-AP	İmmünohistokimyasal deneylerde kullanılmıştır.
Cleaved PARP-1 antikoru	Proteintech, 13371-1-AP	İmmünohistokimyasal deneylerde kullanılmıştır.
LC3A/B antikoru	Bostonchem, BOS-8878-R	İmmünohistokimyasal deneylerde kullanılmıştır.

Beclin-1 antikoru	Bostonchem, BOS-1353-R	İmmünohistokimyasal deneylerde kullanılmıştır.
p62 antikoru		
İmmünohistokimya sekonder kiti	Epredia, TP-060-HL	İmmünohistokimyasal deneylerde kullanılmıştır.
Hematoksilen	Bio-optica, 05-060021L	İmmünohistokimyasal deneylerde kullanılmıştır.
Lam/Lamel	Epredia J2800AMNZ	İmmünohistokimyasal deneylerde kullanılmıştır.

Hücrelerin Yetiştirilmesi:

İnsan kökenli N-MYC pozitif KELLY (RRID:CVCL_2092) ve N-MYC negatif SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) nöroblastom hücre hatları Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD laboratuvarından temin edilmiştir. SH-SY5Y hücreleri DMEM hücre kültür ortamları içine %10 fetal bovin serum, %1 L-glutamin ve %1 Penisilin-streptomisin eklenmiş çoğaltma ortamında 2 günde bir ortam değiştirilerek steril 37°C %10 CO₂ hücre kültürü inkübatöründe (Thermo, ABD) çoğaltılmıştır (176). KELLY hücreleri RPMI-1640 hücre kültür ortamları içine %10 fetal bovin serum, %1 L-glutamin ve %1 Penisilin-streptomisin eklenmiş çoğaltma ortamında 2 günde bir ortam değiştirilerek steril 37°C %10 CO₂ hücre kültürü inkübatöründe (Thermo, ABD) çoğaltılmıştır. Hücrelerin flask içerisindeki yoğunluğu yaklaşık %80'e ulaştığında hücreler Tripsin-EDTA solüsyonu yardımıyla flask yüzeyinden kaldırılarak 1:5 oranında yeni flasklara ekilerek pasajlanmıştır (177).

Kullanılmayan hücreler normal besi ortamına %10 DMSO eklenerek hazırlanan dondurma ortamıyla 1ml içerisinde 10 milyon hücre olacak şekilde 1 cryovial içerisine alınarak kademeli olarak -80°C'de dondurulmaya bırakılmışlar ve sonraki deneysel prosedürler için saklanmışlardır (176,177).

Hücre Sayımı:

Hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılıp, hücreler 1X PBS ile yıkandıktan sonra hücrelerin yüzeyini kaplayacak şekilde Tripsin-EDTA solüsyonu flaska eklenmiştir. Tripsin-EDTA eklenen flasklar 37°C ve %5 CO₂ ayarlanmış hücre kültürü inkubatoründe (Thermo Fisher Scientific, ABD) 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda flasklar mikroskop altında kontrol edilmiştir.

Hücrelerin tamamı flask yüzeyinden kaldırıldıktan sonra flaska konan Tripsin-EDTA solüsyonunun 2 katı kadar hücre kültürü ortam eklenerek Tripsin-EDTA solüsyonu inhibe edilmiştir. Hücre solüsyonu 15ml'lik falkon tüp içerisine alınarak soğutmalı santrifuj cihazında (Sigma, Almanya) 400g'de 5dk santrifuj edilmiştir. Pellet üzerindeki supernatan atılmıştır. Hücre pelleti tekrardan yaklaşık 5ml ortam ile pipetleme yapılarak hücre kültür ortamı içerisinde süspanse edilmiştir. Süspanse hücre solüsyonundan 10µl aliquot alınıp 1.5ml'lik test tübüne konulmuştur. Örnek alınan hücre solüsyonu üzerine 10 µl Tripan Mavisi solüsyonu eklenip homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Hazırlanan karışımdan 10 µl alınıp Thoma lamina konulmuştur. Mikroskop altında hücre sayımı yapılarak 1ml'deki hücre sayısı hesaplanmıştır (Sayılan hücre*2*10⁴ = 1ml'deki hücre sayısı). Buna göre deneylerde kullanılmak üzere hücre solüsyonundan ne kadar hacimde örnek alınacağı hesaplanmıştır (178).

Hücre Canlılık Deneyleri:

Hücreler yaklaşık 2 x 10⁶ düzeyine eriştiğinde Tripsin-EDTA solüsyonu ile flask yüzeyinden kaldırılarak 96 kuyucuklu plakalara 6 kuyucuk/grup ve kuyucuk başına 0.01x10⁶ hücre olacak şekilde ekilmiştir. Plakalar hücrelerin kuyucuklar içinde tutunması için 24 saat inkübe edildikten sonra hücrelerin kalkmamasına dikkat edilerek üst fazlar pipet yardımıyla uzaklaştırılmış ve artan konsantrasyonlarda sisplatin (12,5, 25, 50 ve 100 µM) ve polieter bileşik K41-A (25, 50 ve 100 µM) uygulanmış ve 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bittiğinde hücre canlılığı, bir tetrazolyum tuzu olan WST-1 [2-(4Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] reaktifi kullanılarak bir kolorimetrik deney ile belirlenmiştir (179). Doğrusal olmayan bir regresyon uygulanarak relatif LD50/IC50 değerleri belirlenmiştir.

WST-1 ile Hücre Canlılığının Ölçümü: Polieter bileşik K41-A, sisplatin ve K41-A+sisplatin uygulamalarına maruz bırakılmış hücrelerin bulunduğu 96 kuyucuklu plakaların boş bir kuyucuğuna sadece hücre kültür ortamı koyularak blank ölçüm olarak kullanıldı. WST-1 kiti (ScienCell Research Laboratories, ABD) içerisinde bulunan Elektro Birleştirme Reaktifi (ScienCell Research Laboratories, ABD) çözdürüldü ve her bir WST-1 (ScienCell Research Laboratories, ABD) vialı 2 ml Elektro Birleştirme Reaktifi ile sulandırılıp vortekslendi. 100 µl/kuyucuk hücre için

her kuyucuğa 10 µl/kuyucuk WST-1 hücre proliferasyon reaktif solüsyonu eklendi. Plaka hafifçe sallanarak reaktifin homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Plakalar 37°C %5 CO₂'lik hücre kültürü inkübatöründe 2 saat inkübe edildi. Plaka çalkalayıcıda 1 dk çalkalandıktan sonra ELISA plaka okuyucuda (Thermo Fisher Scientific, ABD) 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Referans dalga boyu olarak 630 nm kullanıldı ve her kuyucuk için 450 nm ölçümünden 630 nm arka plan absorbansını çıkarıldı. Kontrol grubunun absorbans ortalamaları %100 canlılık olarak kabul edildi ve grupların absorbansları ile karşılaştırılarak gruplara ait hücre canlılık yüzdeleri belirlendi (179).

Canlılık testi sonrası ajanların LD50/IC50 değerleri GraphPad Prism 9 (GraphPad, Chicago, ABD) yazılımı ile canlılık/konsantrasyon grafikleri aracılığıyla belirlendi. Bu aşamadan sonra ajanlara ait LD50/IC50 dozları kullanılacak şekilde gruplar aşağıdaki şekilde belirlenmiştir.

- 1) Kontrol grubu: Herhangi bir ajan uygulanmayan hücreler (hücreler FBS içermeyen hücre kültür ortamı ile muamele edilecektir)
- 2) Polieter iyonofor (K41-A) grubu: Yalnızca LD50/IC50 dozu belirlenen K41-A uygulanan hücreler
Sisplatin (CDDP) grubu: Yalnızca LD50/IC50 dozu belirlenen CDDP uygulanan hücreler
- 3) Sisplatin (CDDP) grubu: Yalnızca LD50/IC50 dozu belirlenen CDDP uygulanan hücreler
- 4) Polieter iyonofor (K41-A) + Sisplatin (CDDP) grubu: LD50/IC50 dozu belirlenen K41-A + LD50/IC50 dozu belirlenen CDDP uygulanan hücreler

Annexin V-FITC/Propidium İyodür (PI) ile Hücre Ölüm Tiplerinin Akım Sitometrik Analizi:

Bu analiz ile hücre hatlarında ajan uygulamasından sonra canlılık ve apoptotik, nekrotik hücre ölümünün oranını belirlemek amaçlanmıştır.

KELLY ve SH-SY5Y hücre hatları 0.3×10^6 konsantrasyonunda 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir ve plakaların yüzeyine %80 yoğunlukta tutunana kadar hücre

kültür inkübatöründe saklanmıştır. Deney günü hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılmıştır ve kontrol grubuna FBS içermeyen hücre kültür ortamı, K41-A grubuna FBS içermeyen hücre kültür ortamı içerisinde LD50/IC50 olarak belirlenen konsantrasyonda K41-A, CDDP grubuna FBS içermeyen hücre kültür ortamı içerisinde LD50/IC50 olarak belirlenen konsantrasyonda sisplatin ve K41-A+CDDP grubuna ise FBS içermeyen hücre kültür ortamı içerisinde her iki ajanın da LD50/IC50 konsantrasyonları uygulanmıştır. İlaç uygulamasından sonra hücreler 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler iki kez taze fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanmış, tripsinize edilmiş ve üreticinin protokolüne göre bir FITC-Annexin-V/PI apoptoz saptama kiti (ELABSCIENCE, ABD) ile boyanmıştır. Protokole göre, kaldırılan hücreler 300 ×g'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler PBS ile bir defa yıkandıktan sonra nazıkçe PBS ile süspanse edildi ve hücre sayımı yapıldı. Her örnek $1\sim5\times10^5$ hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu tüplere bölündü ve 300 ×g'de 5 dakika santrifüjlendi, süpernatant atıldı. Hücreleri yeniden süspanse etmek için 500 µL 1×Annexin V Bağlama Tamponu eklendi. Her tüpe 5 µL Annexin V-FITC ve 5 µL PI eklendi. Hücreleri hafifçe vortekslendi ve oda sıcaklığında karanlıkta 15~20 dakika inkübe edildi. Hücreleri uygun cihaz ayarlarıyla hemen analiz edildi. FITC-Annexin-V ve PI birleşmesi, bir Beckman Coulter Flow sitometri cihazı (Beckman Coulter Gallios, ABD) ile 10.000 hücre okutması yapılacak şekilde hücrelerde ölçülmüş ve cihaza ait yazılım (Kaluza Analysis, ABD) ile analiz edilmiştir (180).

Akım Sitometri ile Otofaji Tayini:

Bu analiz ile hücre hatlarında ajan uygulamasından sonra otofajik hücre ölümünün oranını belirlemek amaçlanmaktadır. Akım sitometrik otofaji analizi otofajik vakuollerini ölçer ve otofajik vakuollerini seçici olarak etiketleyen bir boya kullanarak canlı hücrelerdeki otofajik akıyı izlemeyi amaçlar. Otofaji test protokolünde kullanılan boya hem lizozomların minimal boyanması hem de pre-otofagozomlara, otofagozomlara ve otolizozomlara (otofagolizozomlar) dahil edildiğinde parlak floresan için boyalar taranarak optimize edilmiştir. Boya, fosfolipidozu indükleyen ilaçlara benzer bir şekilde hücrelere hızla ayrılan katyonik amfifilik bir izleyici (CAT) boyadır.

KELLY ve SH-SY5Y hücre hatları 0.3×10^6 konsantrasyonunda 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir ve plakaların yüzeyine %80 yoğunlukta tutunana kadar hücre kültür inkübatöründe saklanmıştır. Deney günü hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılmıştır ve kontrol grubuna FBS içermeyen hücre kültür ortamı, K41-A grubuna FBS içermeyen hücre kültür ortamı içerisinde LD50/IC50 olarak belirlenen konsantrasyonda K41-A, CDDP grubuna FBS içermeyen hücre kültür ortamı içerisinde LD50/IC50 olarak belirlenen konsantrasyonda sisplatin ve K41-A+CDDP grubuna ise FBS içermeyen hücre kültür ortamı içerisinde her iki ajanın da LD50/IC50 konsantrasyonları uygulanmıştır. Pozitif kontrol olarak hücreler kit içerisinde mevcut bulunan rapamisin ($0.5 \mu\text{M}$) ile muamele edilmiştir. İlaç uygulamasından sonra hücreler 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Tedavi süresi dolduktan sonra bir otofaji tayin kiti (Abcam, Cat No: ab139484) kullanılmıştır ve üreticinin talimatlarına göre örnekler hazırlanmıştır. Tedavinin sonunda, hücreler tripsin-EDTA solüsyonu ile flask yüzeyinden kaldırıldı. Kaldırılan hücreler $300 \times g$ 'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler peleti hücre kültürü ortamında nazikçe yeniden süspanse ederek süspanse edildi ve hücre sayımı yapıldı. Örnekler mL başına 1×10^5 ila 1×10^6 hücre içerecek şekilde ayrı tüplere alındı ve yeniden santrifüjlendi. Her bir canlı hücre örneği %5 FBS içeren $250 \mu\text{L}$ indikatörsüz hücre kültürü ortamında yeniden süspanse edildi. Her bir örneğe $250 \mu\text{L}$ seyreltilmiş Yeşil boya çözeltisi eklendi ve iyice karıştırıldı. 30 dakika boyunca 37°C 'de karanlıkta inkübe edildi. Bu adımda tekrar tekrar hafifçe yukarı ve aşağı pipetleyerek mono-dispers bir hücre süspansiyonu elde edilmesine önem gösterildi. İşlemden sonra hücreler santrifüjleyerek toplandı ve 1X Test Tamponu ile yıkandı. Hücre peletleri $500 \mu\text{L}$ taze 1X Test Tamponu içinde yeniden süspanse edildi. Örnekler bir Beckman Coulter akım sitometri cihazı (Beckman Coulter Gallios, ABD) ile yeşil (FL1) veya turuncu (FL2) kanalında 15.000 hücre okutması yapılacak şekilde analiz edildi ve cihaza ait yazılım (Kaluza Analysis, ABD) ile kantitatif analizler yapıldı. Pozitif kontrol grubu otofaji oranı %100 olarak kabul edilip diğer gruplardaki otofaji oranı pozitif kontrol grubuna göre hesaplanmıştır (181).

RNA ekstraksiyonu ve kantitatif PCR

Bu analiz ile hücre hatlarında ölüm seviyesindeki değişimlerin hangi gen ekspresyonları aracılığıyla olabileceği tespit edilmeye çalışılmıştır.

RNA izolasyonu için, KELLY ve SH-SY5Y hücre hatları 0.3×10^6 konsantrasyonunda 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir ve plakaların yüzeyine %80 yoğunlukta tutunana kadar hücre kültür inkübatöründe saklanmıştır. Deney günü hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılmıştır ve kontrol grubuna FBS içermeyen hücre kültür ortamı, K41-A grubuna FBS içermeyen hücre kültür ortamı içerisinde LD50/IC50 olarak belirlenen konsantrasyonda K41-A, CDDP grubuna FBS içermeyen hücre kültür ortamı içerisinde LD50/IC50 olarak belirlenen konsantrasyonda sisplatin ve K41-A+CDDP grubuna ise FBS içermeyen hücre kültür ortamı içerisinde her iki ajanın da LD50/IC50 konsantrasyonları uygulanmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda bir RNA izolasyon kiti (Norgen Biotek, Kanada) kullanılarak üreticinin talimatlarına göre hücrelerden RNA izolasyonu yapılmıştır. Hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırıldı. Hücreler, 1 X soğuk fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı ve 350 µL kit içerisinde bulunan RL tamponu ile 5 dk muamele edilmiştir. Bu süre boyunca aralıklarla kültür kabına hafifçe vurarak hücrelerin lizisi sağlanmıştır (Lizis aşaması). Hücre lizatı bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve lizata 200 µL %96-100 etanol eklenmiştir. Karışım vortekslendi ve kit içerisindeki spin kolona aktarıldı. 14.000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi (Bağlanma aşaması). Toplama tüpü atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. Kolona 400 µL Yıkama Solüsyonu A uygulandı ve 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpü atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. Yıkama adımı 3 defa tekrarlandı (Yıkama aşaması). Kolon kitle birlikte verilen yeni bir 1,5 mL Elüsyon tüpüne yerleştirildi. Kolona 50 µL Elüsyon Solüsyonu A eklendi. 200 x g'de 2 dakika ardından 14.000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi (Elüsyon aşaması). RNA konsantrasyonu, Nanodrop (Blue-Ray Biotech, Tayvan) kullanılarak ölçüldü. İzole edilen RNA'lar hemen cDNA'ya çevrilmiştir.

mRNA'lerden cDNA Sentezi:

İzole edilen RNA'lardan PCR analizleri yapılması için cDNA sentezi yapılmıştır. Bu işlem için bir cDNA sentez kiti (iScript cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad Laboratories, BAE) kullanılmıştır ve üreticinin talimatlarına göre reaksiyon kurulmuştur. Kitin içeriğinde reverse transkriptaz enzimi, reaksiyon tamponu ve distile

su bulunmaktadır. Steril 0.2 ml'lik PCR stripleri içersine tüm reaksiyon karışımını aşağıdaki protokol kullanılarak bir termal döngüleyicide (Nyxtechnik, ABD) inkübe edilmiştir:

5x iScript Reaksiyon Tamponu : 4 µL

iScript Reverse Transcriptaz Enzimi : 1 µL

Nükleaz içermeyen su : Örneğe göre değişen hacim

RNA (100 fg – 1 µg total RNA) : Örneğe göre değişen hacim

Toplam Hacim : 20 µL

Reaksiyon koşulu olarak aşağıdaki protokol uygulanmıştır;

Priming adımı : 25°C 5dk

Reverse transkripsiyon adımı : 46°C 20 dk

Reverse transkripsiyon inhibisyon : 95°C 1 dk
adımı

Bekletme : 4°C

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):

PCR reaksiyonları iTaq Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, BAE) kullanılarak gerçekleştirildi. Primer dizaynı Primer3 websitesi kullanılarak (182) yapılmış ve primerler Oligomer Biyoteknoloji (Türkiye) tarafından sentezlenmiştir. Primerler üzerlerinde yazılan miktarlarda nükleaz içermeyen su ile seyreltilerek 100 µM olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra bu stok karışımdan 500 nM olacak şekilde seyreltilip q-PCR reaksiyonuna eklenmek üzere buz üstüne alındı.

Tablo 4. Q-PCR Reaksiyonlarında Kullanılan Primerler

Gen Adı	Forward Primer	Reverse Primer
Kaspaz 3	5'GGAAGCGAATCAATGGACTCTGG3'	5' GCATCGACATCTGTACCAGACC 3'
Kaspaz 8	5' AGAAGAGGGTCATCCTGGGAGA 3'	5' TCAGGACTTCCTTCAAGGCTGC 3'
Kaspaz 9	5' GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT 3'	5' CAACGTACCAGGAGCCACTCTT 3'
PARP1	5' CCAAGCCAGTTCAGGACCTCAT 3'	5' GGATCTGCCTTTTGCTCAGCTTC 3'
LC3A	5' GCTACAAGGGTGAGAAGCAGCT 3'	5' CTGGTTCACCAGCAGGAAGAAG 3'
p62	5' TGTGTAGCGTCTGCGAGGGAAA 3'	5' AGTGTCCTGTGTTTCACCTTCCG 3'
Beclin-1	5' CTGGACACTCAGCTCAACGTCA 3'	5' CTCTAGTGCCAGCTCCTTTAGC 3'
GAPDH	5' GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG 3'	5' ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA 3'

PCR reaksiyonu için; iTaq Universal SYBR® Green Supermix ve diğer reaksiyon bileşenlerini oda sıcaklığına ulaştırılarak çözdürüldü. İyice karıştırıldı, homojen bir hal alması için 30 sn santrifüjlendi, ardından ışıktan koruyarak buz üzerinde saklandı ve tüm reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlandı. 96 kuyucuklu PCR plakası içine aşağıdaki hacimlerde DNA şablonu hariç tüm diğer bileşenler eklenerek qPCR reaksiyonları için yeterli karışım hazırlandı ve reaksiyon karışımını iyice karıştırıldı ve her bir qPCR plakasının kuyucuklarına eşit miktarda dağılması sağlandı. Son olarak reaksiyon karışımı içeren PCR kuyucuklarına DNA örnekleri eklendi, kuyucuklar plakalar ile uyumlu şeffaf filmle kapatıldı ve reaksiyon

bileşenlerinin homojenliğini sağlamak için 40 saniye vortekslendi. Hava kabarcıklarını gidermek için plaka döndürüldü ve reaksiyon karışımı kabın dibinde toplandı (183).

Reaksiyon karışımı:

iTaq Universal SYBR® Green supermix (2X)	: 5 µl
Forward ve Reverse Primerler	: 2 µl
Nükleaz içermeyen su	: 1 µl
cDNA	: 2 µl

PCR reaksiyonları Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, BAE) cihazında gerçekleştirilmiş ve sonuçlar cihaz tarafından hesaplanmış ve grafikler cihazın kendi yazılımı tarafından oluşturulmuştur (184).

Q-PCR protokolü:

Denatürasyon : 95°C 20 sn
Amplifikasyon: 95°C 15 sn
60°C 60sn
Melting: 65°C'den 95°C'ye (0,5°C/sn aralıklarla)
Bekletme: 95°C 30 sn
Soğutma

40 siklus

Gen ekspresyon değişimleri Livak metodu (185) kullanılarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri hesaplanarak bulunmuştur. Buna göre koşullardaki gen ekspresyon değişimleri negatif kontrol ile kıyaslanarak relatif gen ekspresyon değişimleri hesaplanmıştır. GAPDH kontrol geni olarak kullanılmıştır.

İn-vivo ksenograft nöroblastom tümör modeli gelişimi ve farelerin ajanlar ile tedavisi

İnsan kökenli KELLY nöroblastom hücre hattı kullanılarak nude farelerde ksenograft nöroblastom modeli oluşturulup, polieter iyonofor bir metabolit olan K41-A'nın anti-tümör etkisi olup olmadığının gösterilmesi amacıyla öncelikle KELLY hücreleri çoğaltılarak nude farelere subkutan uygulama yolu ile verilmiştir ve nöroblastom ksenograft model oluşumu sağlanmıştır.

KELLY hücrelerinin kültüre edilerek çoğaltılması

KELLY nöroblastom hücre hattı DEU Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD tarafından sağlanmıştır. KELLY hücreleri RPMI-1640 hücre kültür ortamı içine fetal bovin serum %10 ve %1 L-glutamin ve %1 Penisilin-streptomisin eklenmiş çoğaltma ortamları kullanılarak 2 günde bir ortam değiştirilerek steril 37°C %10 CO₂ inkübatör şartlarında çoğaltıldı. Hücreler konfluent olduğunda pasajlanarak yeni kültür plaklarına ekilerek çoğaltılması sağlandı.

İn-vivo ksenograft nöroblastom modeli oluşturulması ve takibi

Kültüre edilerek çoğaltılan KELLY hücreleri subkutan olarak farelere uygulandı ve ksenograft tümör gelişimi sağlandı.

Çalışmada Kullanılan Hayvanlar ve Özellikleri

Çalışmada etik kurul izni alınmış 5-7 haftalık ortalama ağırlıkları 25 gr olan, Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edilen erkek nude fareler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında (DEÜTFDHAL), Hepa-Filtreli kabinet içinde barındırıldı; yem, su ve kafes otoklavlandı. Hayvanların serbestçe yem ve suya ulaşmaları sağlandı. Fareler çalışma boyunca oda sıcaklığında (20 ± 2 °C) ve 12'şer saatlik aydınlık/karanlık ortamında tutuldu. Çalışmaya başlamadan önce fareler bir hafta süreyle bu ortamda izlenip ortama uyum göstermeleri sağlandı.

İn-vivo KELLY subkutan (s.c.) ksenograftları

KELLY hücreleri 5x10⁶ hücre/0,1 mL olacak şekilde subkutan olarak nude farenin sırt bölgesinde tek tarafına enjekte edilerek tümör gelişimi sağlanmıştır. Her bir grupta 8 hayvan olmak üzere 4 grup oluşturulmuştur. Nöroblastom hücre enjeksiyonundan sonra fareler her gün kontrol edilmiş ve tümör boyutları ölçülmüştür. Tümör çapı 7-10 gün içinde 0,6-0,8 cm'ye ulaşan fareler her grupta n=8 olacak şekilde randomize edildi (186).

1. Kontrol grubu (DMSO %0.01): Üç hafta boyunca, gün aşırı intraperitoneal %0.01 DMSO/SF ile tedavi edilen grup (n=8).

2. Polieter iyonofor (K41-A) grubu: Üç hafta boyunca, gün aşırı günde 10 mg/kg intraperitoneal K41-A (187) ile tedavi edilen grup (n=8).
3. Sisplatin (CDDP) grubu: Üç hafta boyunca haftada bir 5 mg/kg intraperitoneal sisplatin (188) ile tedavi edilen grup (n=8).
4. Polieter iyonofor (K41-A) + Sisplatin (CDDP) grubu: Üç hafta boyunca gün aşırı 10 mg/kg intraperitoneal K41-A ve haftada bir 5 mg/kg intraperitoneal sisplatin ile tedavi edilen grup (n=8).

Fareler tedavi bitiminden sonra 7 gün içinde sakrifiye edildi. Tümör boyutunun manuel olarak ölçülmesi, manuel kumpas kullanılarak yapılmıştır. Tümör uzunlukları (L) ve genişlikleri (w) gün aşırı ölçülmüş ve şu formül kullanılarak tümör hacmi ekstrapole edilmiştir: $(L \times w^2)/2$. Ayrıca, farelerin kiloları gün aşırı ölçülerek takip edilmiştir.

Tablo 5. In vivo deneylere ait zaman ve gruplar tablosu

1. 0-15.gün KELLY neuroblastoma hücrelerin verilip tümör gelişiminin gözlenmesi			2. 16-36. gün tedavinin uygulandığı süreç	
Gün	Grup 1 (n=8) Kontrol (DMSO %0.01)	Grup 2 (n=8) Polieter İyonofor (K41-A) (10 mg/kg)	Grup 3 (n=8) Sisplatin (5 mg/kg)	Grup 4 (n=8) Sisplatin (5 mg/kg) + Polieter İyonofor (K41-A) (10 mg/kg)
1.	KELLY nöroblastom hücrelerin enjeksiyonu	KELLY nöroblastom hücrelerin enjeksiyonu	KELLY nöroblastom hücrelerin enjeksiyonu	KELLY nöroblastom hücrelerin enjeksiyonu
2-6.	Kilo kontrol			
7.	Tümör oluşumunun başlaması	Tümör oluşumunun başlaması	Tümör oluşumunun başlaması	Tümör oluşumunun başlaması
13-14.	Kilo kontrol + Tümör boyutunun ölçülmesi			
15.	Tümör oluşumu (Tümör çapı 0,6-0,8 cm'ye ulaşan)	Tümör oluşumu (Tümör çapı 0,6-0,8 cm'ye ulaşan)	Tümör oluşumu (Tümör çapı 0,6-0,8 cm'ye ulaşan)	Tümör oluşumu (Tümör çapı 0,6-0,8 cm'ye ulaşan)
16.	DMSO	K41-A	Sisplatin	K41-A + Sisplatin
17.				
18.	DMSO	K41-A		K41-A
19.				
20.	DMSO	K41-A		K41-A
21.				
22.	DMSO	K41-A		K41-A
23.			Sisplatin	
24.	DMSO	K41-A		K41-A + Sisplatin
25.				
26.	DMSO	K41-A		K41-A

27.				
28.	DMSO	K41-A		K41-A
29.				
30.	DMSO	K41-A	Sisplatin	K41-A + Sisplatin
31.				
37.	SAKRİFİKASYON			

Farelerin sakrifikasyonu

Ksenograft model oluşumu ve sonrasında farelerin tedavileri tamamlanmadığında, K41-A, Sisplatin ve K41-A-Sisplatin kombine uygulamalarının tümör dokularında apoptotik ve otofajik hücre ölümüne olan etkisinin, ilişkili proteinlerin ekspresyonları üzerinden immünohistokimyasal olarak değerlendirilerek ortaya konması amaçlanmıştır. Bu amaçla, tedavisi tamamlanan fareler uygun şekilde sakrifiye edilerek tümör dokuları elde edilmiştir. Sakrifikasyon aşamasında tüm organlar metastatik oluşum açısından kontrol edilmiştir ve hayvanlardan tümör dokusunun yanı sıra karaciğer, böbrek, dalak, akciğer ve beyin organları da Hematoksilen-Eozin boyası ile değerlendirilmek üzere histolojik analizler için alınmıştır. Farelerin sakrifikasyonları, biyogüvenlik kabinet-2 (BSL-2) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Hayvanların tümörleri çıkarılarak ve %10 formaldehit solüsyonu ile fikse edilerek immünohistokimya için kullanılmak üzere saklanmıştır. Daha sonra hayvanlar anestezi altında antiseptik madde ile insizyon bölgesi temizlendikten sonra abdominal bölgeden kesi atılarak batın açılmış ve tüm vücut taraması yapılarak metastatik bir oluşum olup olmadığı kontrol edilmiştir ve organlar alınarak incelenmek üzere %10'luk formaldehit içeren saklama kaplarına konulmuştur.

İmmünohistokimyasal analizler

S.C. enjeksiyon ile oluşturulan tümörlerde uygulanan ajanların hücre ölüm yollarlarında kritik rol oynayan seçilmiş proteinlere olan etkisini değerlendirmek için, hayvanlara ajan uygulamaları sonrası sakrifikasyon ile elde edilen dokular parafine

gömölerek bloklanmış ve alınan tümör kesitlerinde immünohistokimyasal boyamaları yapılmıştır.

Apoptoz ilişkili Proteinler olarak: aktif-kaspaz 3 (189), aktif-kaspaz 8, aktif-kaspaz 9 (190), c-PARP (cleaved PARP) (191) ve Otofaji ilişkili Proteinler olarak: LC3, p62, Beclin-1 protein ekspresyonları tümör dokularında immünohistokimyasal olarak boyanarak incelenecektir (192)

Doku Takibi prosedürü:

Sakrifikasyon sonrası çıkarılan dokular fiksasyon için %10'luk formadehit çözeltisinde en az 48 saat bekletildi. Doku takibi cihazında (Intelsint TP300, İtalya) aşağıdaki koşullarda takibi yapılmıştır;

Fiksatif uzaklaştırmak için 1 gece çeşme suyunda bekletildi. Dehidrasyon için %70'ten artan serilerde alkolden geçirilerek su uzaklaştırıldı (20 şer dakika). Şeffaflandırmak için Xylol solüsyonunda yarım saatlik iki seriden geçirildi. Parafine hazırlama aşamasında yumuşak parafinde iki seri 1'er saat bekletildi. Tüm aşamalardan sonra, son olarak parafin bloklama cihazında (Leica RM2245, Almanya) yapılmıştır. Donarak sertleşen parafin bloklar kalıplarından çıkartıldıktan sonra mikrotoma (Leica RM2245, Almanya) yerleştirildi, 20 µm'lik kesitlerle doku içetmeyen parafin parçaları uzaklaştırılmıştır ve dokuya ulaştıktan sonra 5 µm'lik kesitler alınarak fırça yardımıyla su banyosuna aktarıldı. Parafin ve dokuda bulunan kıvrımların açılması için önemlidir. Ardından dokular su banyosundan bir lama alınarak çıkarıldı ve kurumaları sağlandı. Bu aşamadan sonra boyama işlemlerini gerçekleştirmeye hazır hale gelmiş oldu.

Hematoksilen – Eozin boyama prosedürü:

KELLY nöroblastom hücre hattı in-vivo olarak, başta kemik olmak üzere diğer organlarda metastaz yapma özelliği gösterdiğinden (193), sakrifikasyon aşamasına tüm organlar metastatik oluşum açısından kontrol edilmiş ve hayvanlardan tümör dokusunun yanı sıra karaciğer, böbrek, dalak, akciğer ve beyin organları da Hematoksilen-Eozin boyası ile değerlendirilmek üzere histolojik analizler için alınmıştır.

Önce kesitler alınır ve deparafinizasyon için gece boyunca 60°C'lik etüvde bekletilir. İnkübasyon süresinin sonunda 20'şer dakika ilki 60°C'de diğerleri 25°C olacak şekilde üç farklı ksilene tabi tutulur. Dehidratasyon basamağı için alkol serilerinden (%99, %96, %80, %70'lik) geçirilir. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra kontrol edilerek boyayı alana kadar hematoksilin ile muamele edilir. Boyamanın ardından, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için 5-6 dakika akan su altında tutulur, sonrasında 40-60 saniye eozin boyası ile boyanır. Boyamadan sonra artan alkol serisinden (sırasıyla %70, %80, %96 ve %99) geçirilen kesitler 30'ar dakika üç farklı ksilende tutularak şeffaflştırılır ve ksilenden çıkarılan lamalar entellan ile kapatılır (194).

İmmünohistokimyasal boyama prosedürü:

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için gece boyunca 60°C'lik etüvde bırakılır. İnkübasyon süresinin sonunda 20'şer dakika ilki 60°C'de diğerleri 25°C olacak şekilde üç farklı ksilene tabi tutulur. Daha sonra dehidratasyon işlemi için alkol serilerinden (%99, %96, %80, %70'lik) geçirilir. Kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra antijen çağırma işlemi için 5 dakika sitrat solüsyonunda kaynatılır ve sonrasında lamalar soğumaya bırakılır. Soğuyan lamalar distile suda çalkalanır. Sonrasında %3'lük hidrojen peroksit ile 10 dakika muamele edilir. Yine distile su ile yıkama yapılır ve inhibitör (serum) ile inhibisyon yapılır. Ardından primer antikorlar uygulanarak +4 C'de bir gece bekletilir. Ertesi gün sekonder antikor (HRP) uygulanır. Sekonder antikordan sonra DAB kromojen ile muamele edilir, mikroskop altında kontrol edilerek boyanma olana kadar bekletilir. Boyamanın ardından, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için 5-6 dakika akan su altında tutulur. Boyamadan sonra artan alkol serisinden (%70, %80, %96 ve %99) geçirilen kesitler 30'ar dakika üç farklı ksilende tutularak şeffaflştırılır ve ksilenden çıkarılan lamalar entellan ile kapatılır (195).

İmmünohistokimyasal analizler ışık mikroskobu ile (Olympus BX50) mikroskobik inceleme ile 20 farklı alanda taranarak değerlendirilmiştir.

3.5. Verilerin Değerlendirilmesi

Hücre canlılık deneylerinde her bir koşul en az 3 tekrar olarak çalışılmış. İlaç uygulaması yapılmayan hücreler negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

*Hücre canlılığı (%) = (ilaçla muamele edilen hücrelerin absorbanası /negatif kontrol hücrelerin absorbanası) *100 olarak hesaplanmıştır.*

Hücre popülasyonunun %50'sini öldüren ilaç konsantrasyonu LD50/IC50 dozu olarak kabul edilmiştir. Canlılık testi sonrası ajanların LD50/IC50 değerleri GraphPad Prism version 9.0 (GraphPad Software, Chicago, ABD) yazılımı ile canlılık/konsantrasyon grafikleri aracılığıyla belirlenmiştir.

Akım sitometri deneyinde analizler cihazın kendi programı (Kaluza Analysis, ABD) kullanılarak otomatik olarak gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde boyama yapılmayan negatif kontrol grubuna göre (Unstained) kapılama yapıp, ilaçla muamele edilen koşullar buna göre değerlendirilmiştir.

Q-PCR deneyinde; GraphPad Prism kullanılarak grafikler çizilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı değişimin olup olmadığının saptanması için t testi kullanılmıştır.

İstatistiksel analiz dörtlü grup karşılaştırmalarında verilerin normal dağılımı gözetilerek ANOVA ya da Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Kategorik verilerin değerlendirilmesinde Ki-Kare testi kullanılarak gruplar arası kategorik değişkenlerin dağılımı karşılaştırılmıştır. Tüm istatistiksel analizler SPSS Version 24.0 (IBM SPSS Statistics, ABD) programında yapılmıştır. $p < 0,05$ değeri istatistiksel anlamlı kabul edilmiştir.

3.6. Araştırmanın Sınırlılıkları

Bu tez çalışmasında protein ekspresyonlarının western-blot tekniği ile değerlendirilmesi planlanmaktaydı. Western-blot analizlerinin yapılması bu çalışma sonucu ortaya çıkan verilerin validasyonunun sağlanması açısından önem arz etmekteydi. Ancak bu teknik için gereken ekipman ve sarf malzemelerinin maliyetleri nedeniyle uygulanması mümkün olmadı. Bu nedenle yalnızca proteinlere ait mRNA seviyeleri aracılığı ile transkripsiyon seviyesinde bir değerlendirme yapılabildi. Aynı şekilde in vivo analizlerde de western-blot yerine immünohistokimyasal protein seviyesi üzerinden bir değerlendirme yapılmıştır.

3.7. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 29.09.2021 tarihli 52/2021 protokol numarası ve 03/15/2021 gündem numarası ile etik kurul onayı alınmıştır. Etik kurul onayı örneği EK’te sunulmuştur.

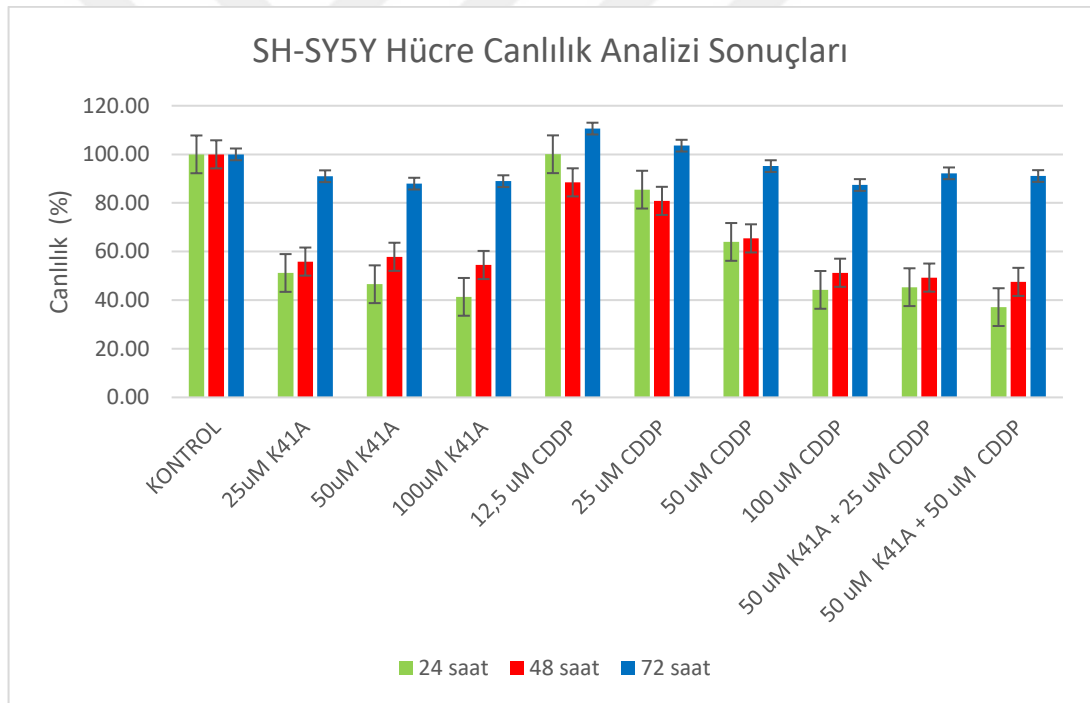


4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılık Analizleri

Bir poliyeter iyonofor molekül olan K41-A'nın KELLY ve SH-SY5Y hücreleri üzerindeki tek başına ve sisplatin ile birlikte etkisi WST-1 yöntemi ile incelenmiştir. Bu amaçla, SH-SY5Y hücreleri 0-100 μ M arası değişen dozlarda K41-A ve sisplatin (CDDP) ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmiştir ve bu sürelerin sonunda WST-1 ile hücre canlılığı değerlendirilmiştir.

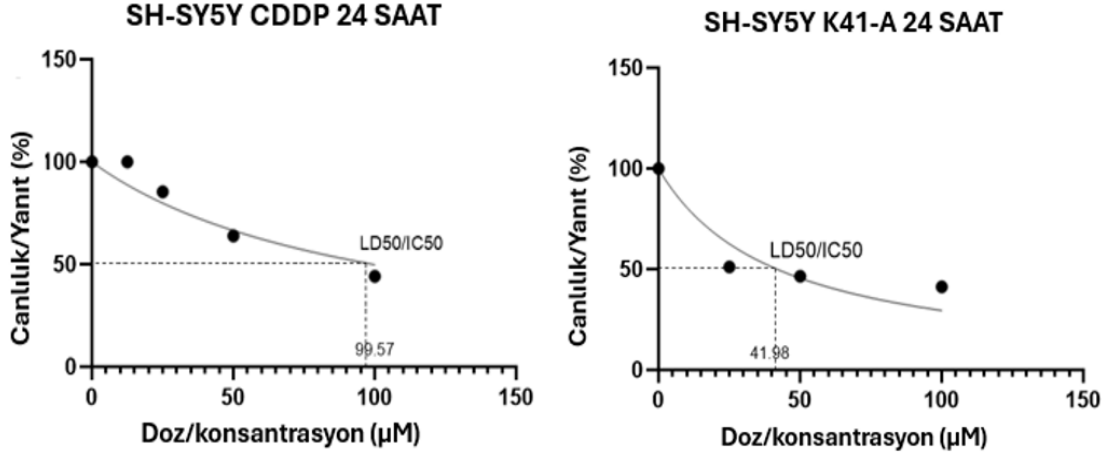
SH-SY5Y hücrelerinde K41-A ve CDDP hem tek başına hem de birlikte uygulanmış ve 24, 48 ve 72 saat sonunda WST-1 ile hücre canlılığı ölçülmüştür. Aşağıda SH-SY5Y hücrelerine ait hücre canlılık grafiği verilmektedir.



Şekil 8. K41-A ve sisplatinin 24, 48 ve 72 saat sürelerde SH-SY5Y hücrelerinde farklı dozlarda (0-100 μ M) hücre canlılığına etkisi

WST-1 testi sonucuna göre SH-SY5Y hücreleri üzerindeki en etkin ilaç yanıtlarının 24 saatlik maruziyetlerde ortaya çıktığı gözlenmiştir. Bundan dolayı 24 saatlik ajan uygulamasında ilaç dozuna bağlı olarak değişen hücre canlılık oranları ile

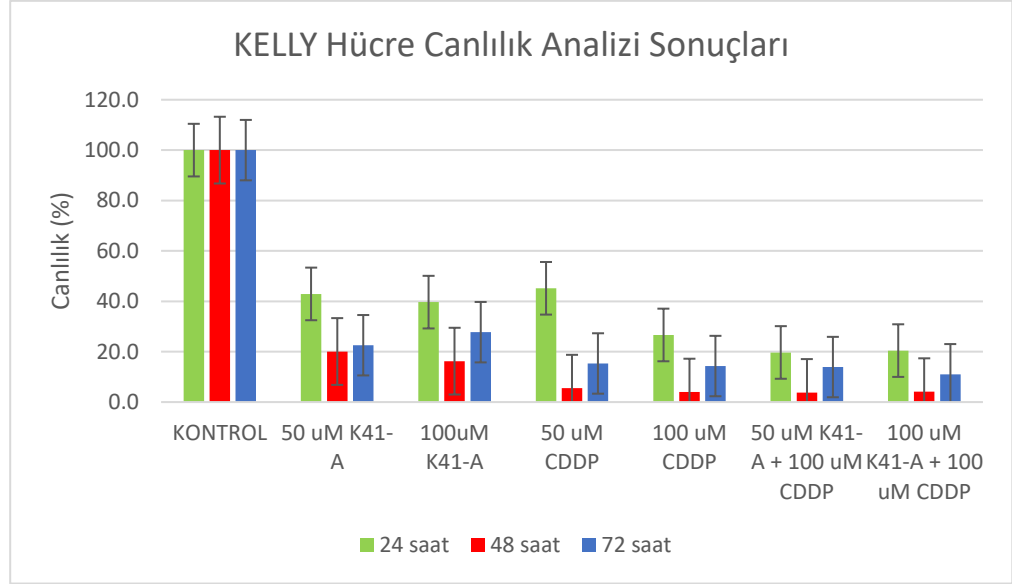
doz/konsantrasyon-canlılık eğrileri oluşturulmuş ve ajanlara ait LD50/IC50 dozları belirlenmiştir.



Şekil 9. SH-SY5Y hücrelerinde K41-A ve CDDP doz/konsantrasyon-canlılık grafikleri

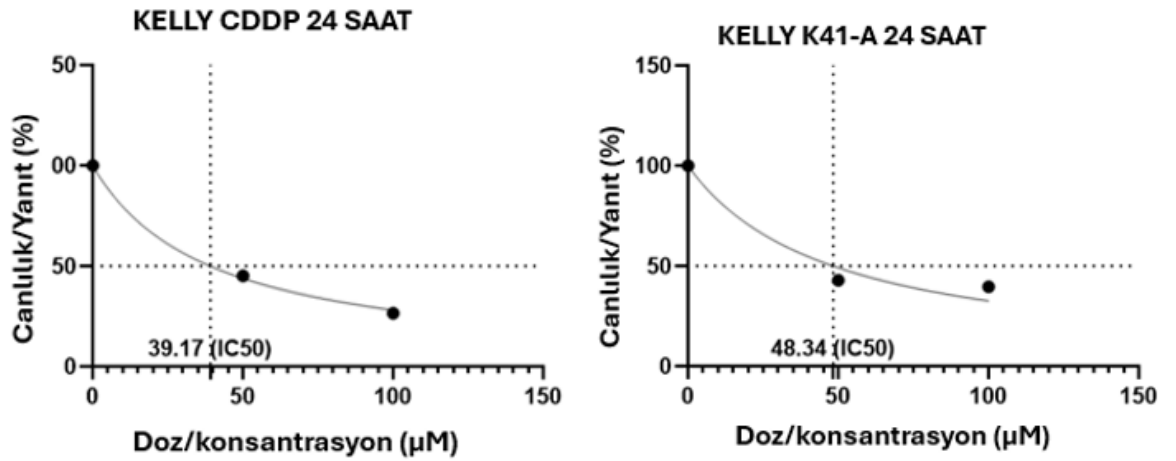
Bu analizler doğrultusunda 24 saat sonunda SH-SY5Y hücrelerinin %50'sini öldüren K41-A dozu (LD50/IC50) 41,98 µM ve SH-SY5Y hücrelerinin %50'sini öldüren CDDP dozu (LD50/IC50) 99,57 µM olarak belirlenmiştir.

KELLY hücrelerinde K41-A ve CDDP hem tek başına hem de birlikte uygulanmış ve 24, 48 ve 72 saat sonunda WST-1 ile hücre canlılığı ölçülmüştür. Aşağıda KELLY hücrelerine ait hücre canlılık grafiği verilmektedir.



Şekil 10. K41-A ve sispaltinin 24, 48 ve 72 saat sürelerde KELLY hücrelerinde farklı dozlarda (0-100µM) hücre canlılığına etkisi

WST-1 testi sonucuna göre KELLY hücreleri üzerindeki en etkin ilaç yanıtlarının 24 saatlik maruziyetlerde ortaya çıktığı gözlenmiştir. Bundan dolayı 24 saatlik ajan uygulamasında ilaç dozuna bağlı olarak değişen hücre canlılık oranları ile doz/konsantrasyon-canlılık eğrileri oluşturulmuş ve ajanlara ait LD50/IC50 dozları belirlenmiştir.



Şekil 11. KELLY hücrelerinde K41-A ve CDDP doz/konsantrasyon-canlılık grafikleri.

Bu analizler doğrultusunda 24 saat sonunda KELLY hücrelerinin %50'sini öldüren K41-A dozu (LD50/IC50) 39,17 μ M ve SH-SY5Y hücrelerinin %50'sini öldüren CDDP dozu (LD50/IC50) 48,34 μ M olarak belirlenmiştir.

İn-vitro deneylerin bundan sonraki aşamalarında bu analiz sonucu belirlenen LD50/IC50 dozları ve bu ajanların bu dozlarda kombinasyonları uygulanmıştır.

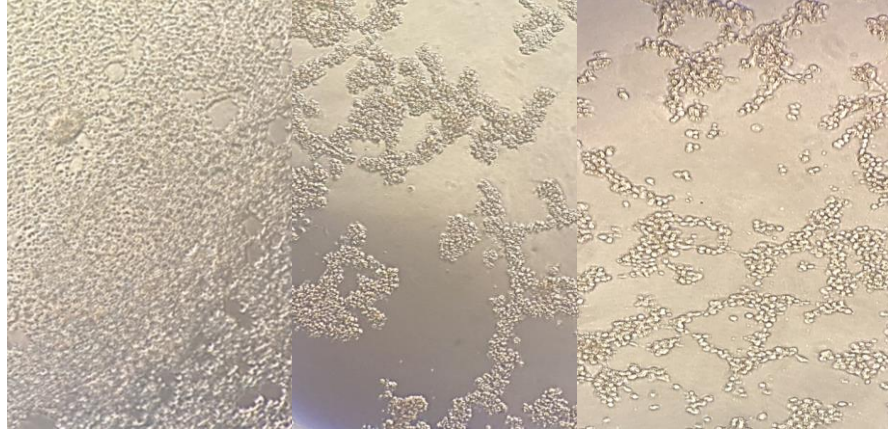
4.2. Mikroskopi Görüntüleri

41,98 μ M K41-A ve 99,57 μ M CDDP ile inkube edilen SH-SY5Y hücreleri 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde mikroskopi altında incelenmiştir.



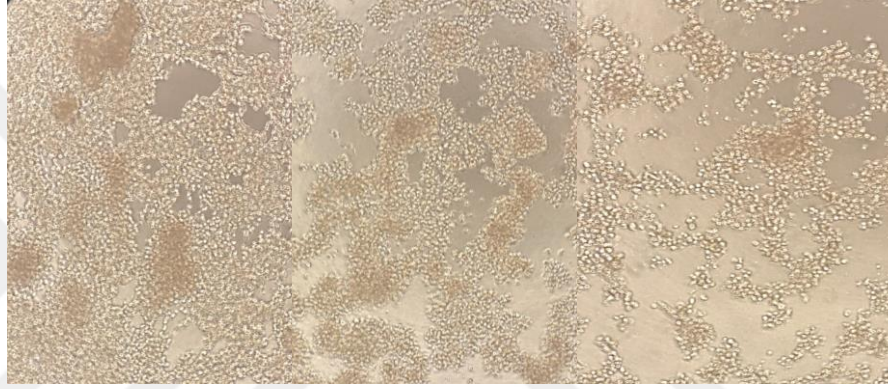
48 SAAT

10x



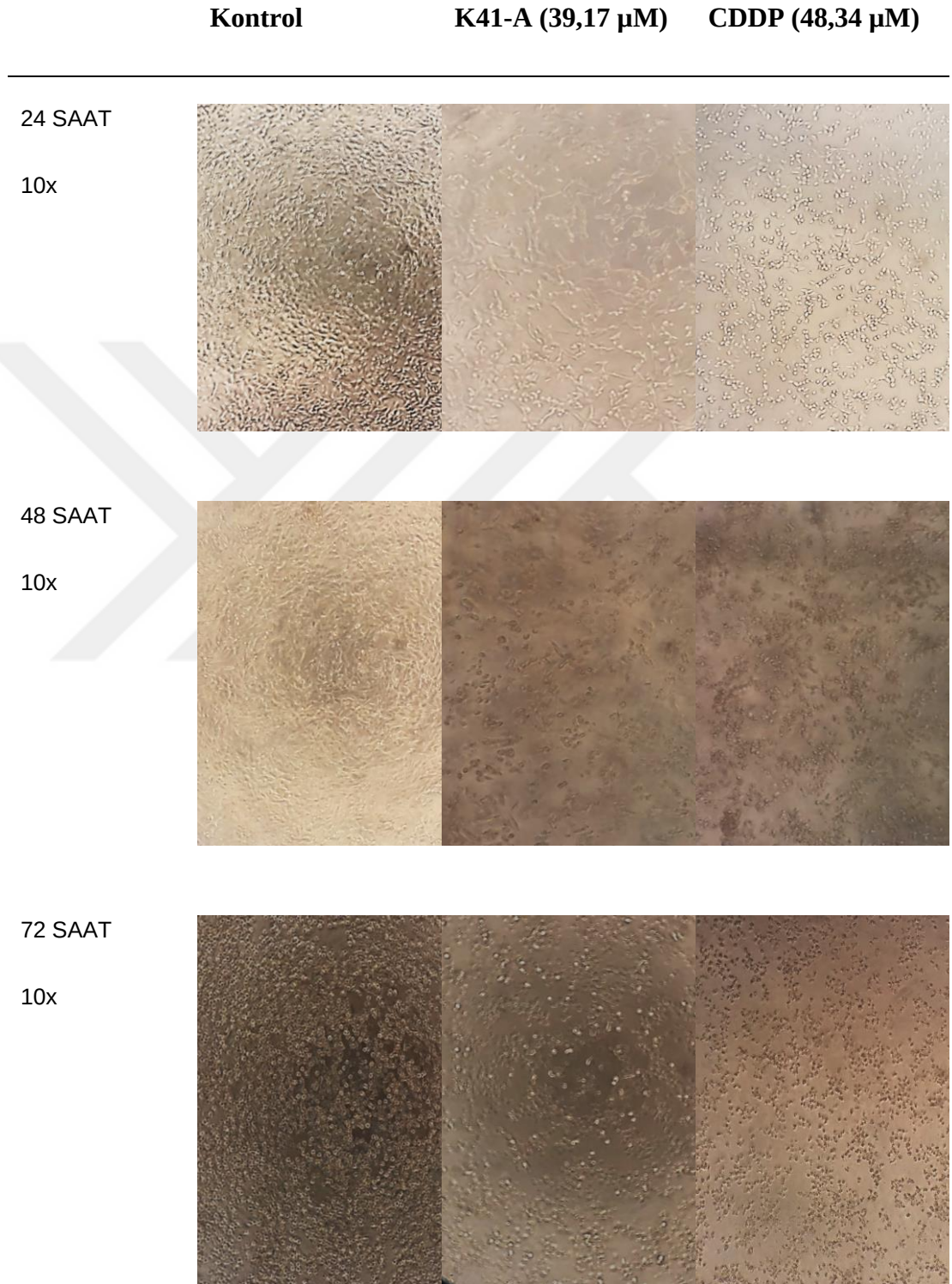
72 SAAT

10x



Şekil 12. 41,98 μ M K41-A ve 99,57 μ M CDDP ile inkube edilen SH-SY5Y hücrelerinin mikroskopi görüntüleri (24, 48 ve 72 saat)

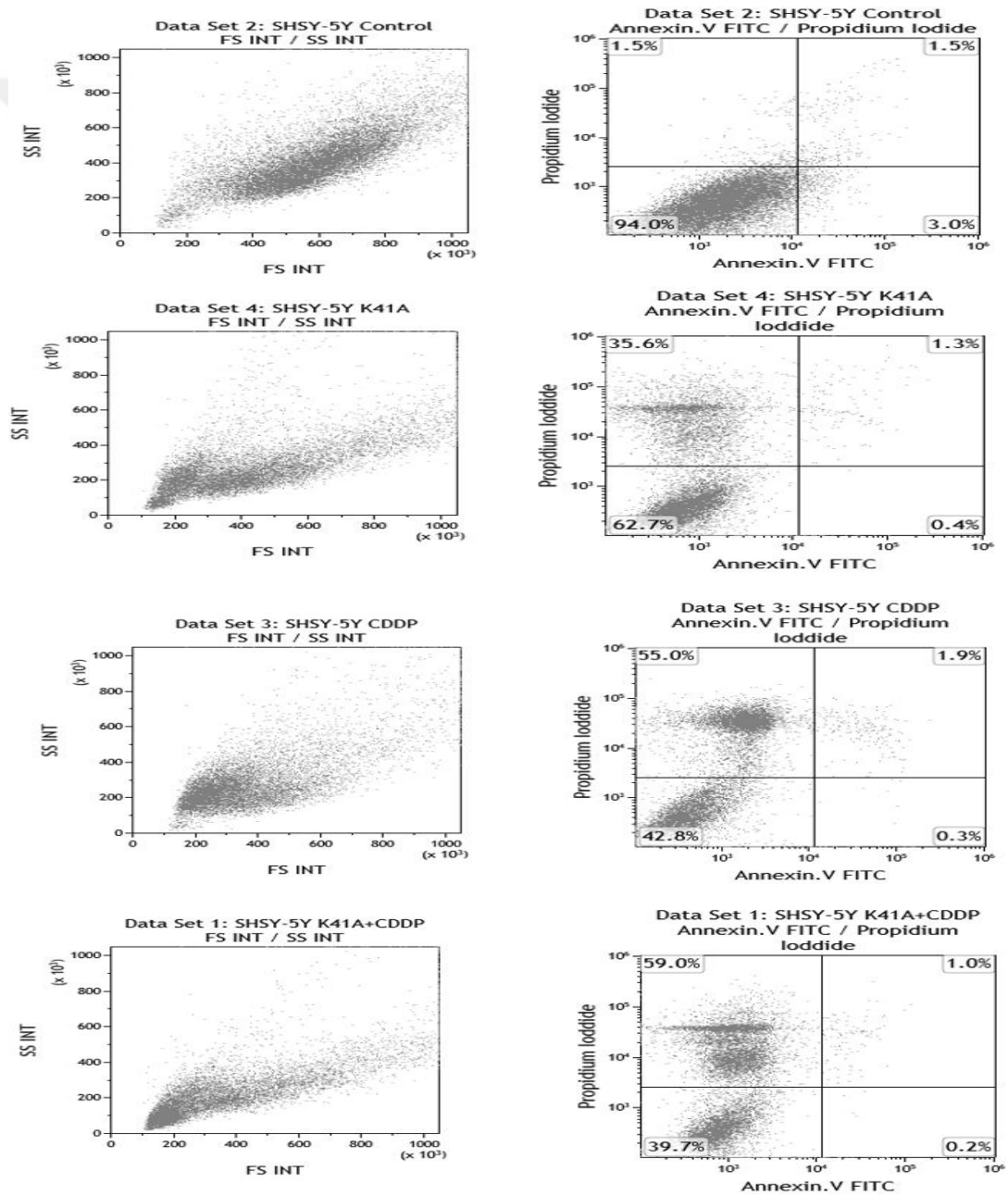
39,17 μ M K41-A ve 48,34 μ M CDDP ile inkube edilen KELLY hücreleri 24,48 ve 72 saatlik sürelerde mikroskopi altında incelenmiştir.



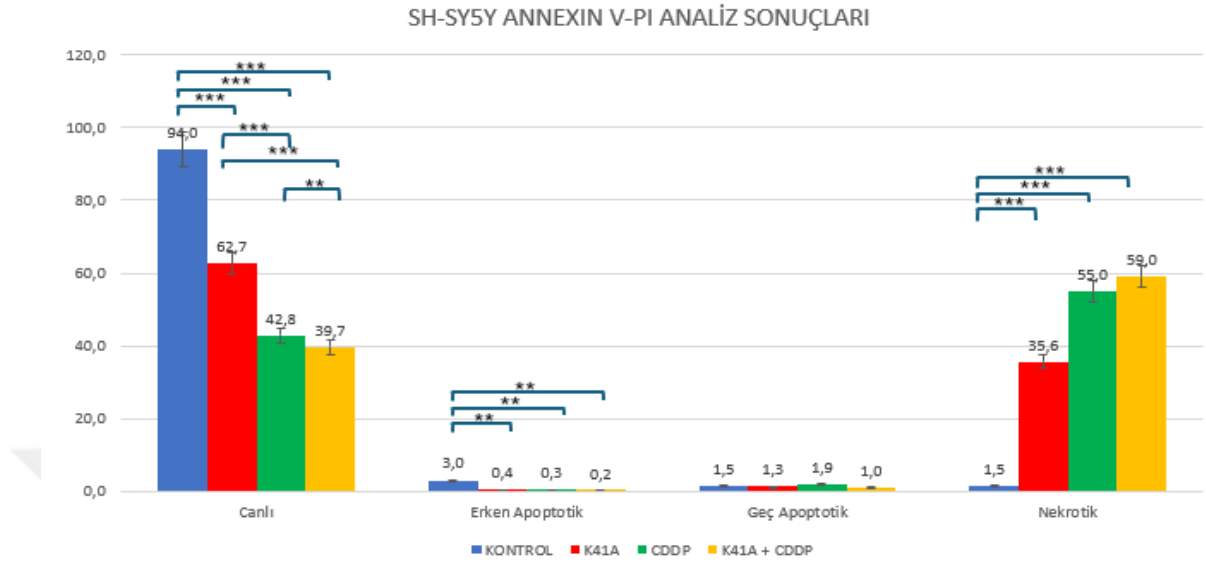
Şekil 18. 39,17 μ M K41-A ve 48,34 μ M CDDP ile inkube edilen hücrelerinin mikroskopi görüntüleri (24, 48 ve 72 saat)

4.3. Akım Sitometrik Apoptoz ve Nekroz Tayini

SH-SY5Y ve KELLY hücrelerinde K41-A ve CDDP uygulamasının hangi tip hücre ölümüne yol açtığını incelemek için Annexin V/ Propidium iyodür boyaması ile akım sitometrik hücre ölüm analizi yapılmıştır.

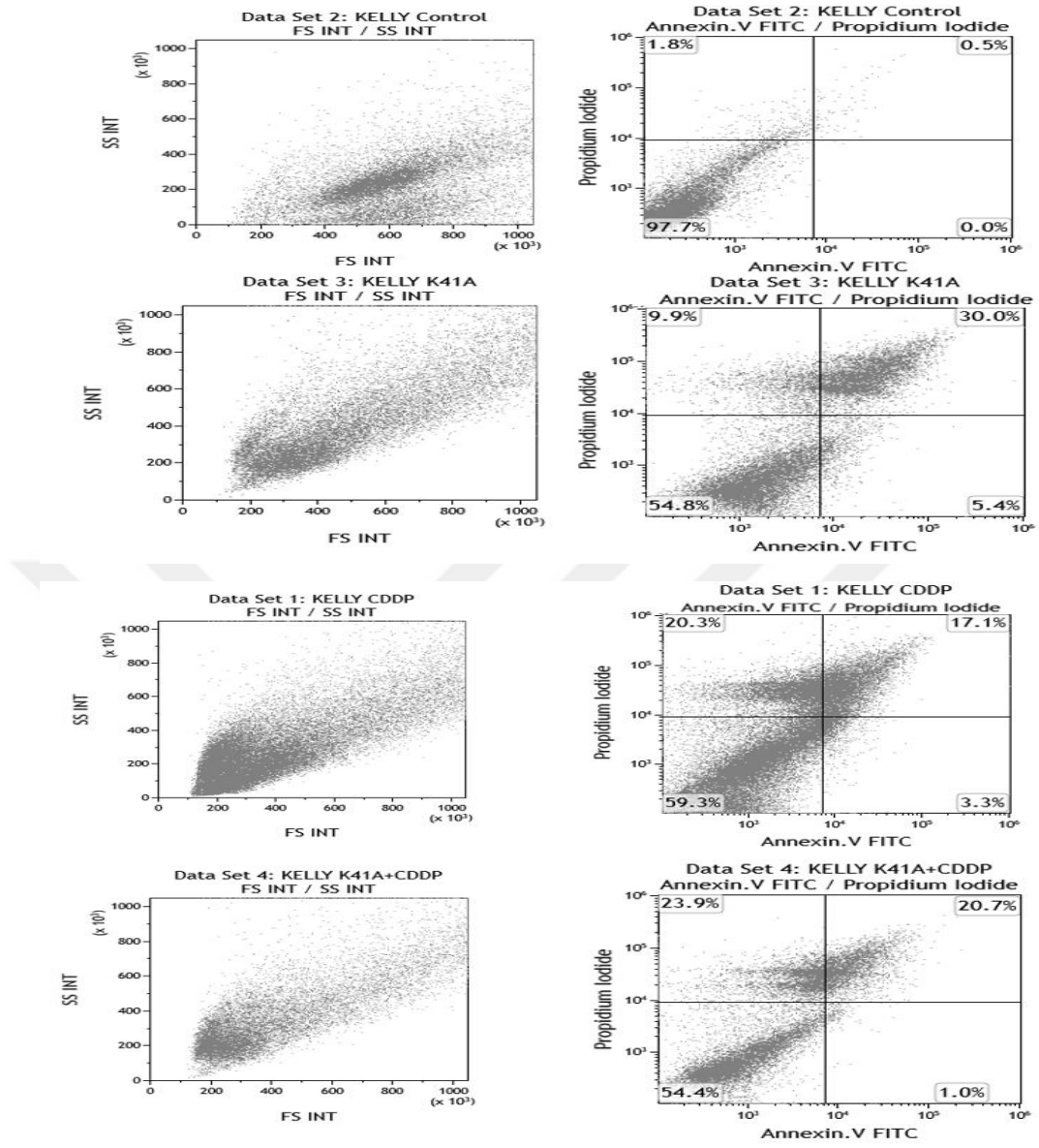


Şekil 19. SH-SY5Y hücrelerinde AnnexinV/PI analiz sonuçlarına ait akım sitometri histogramları

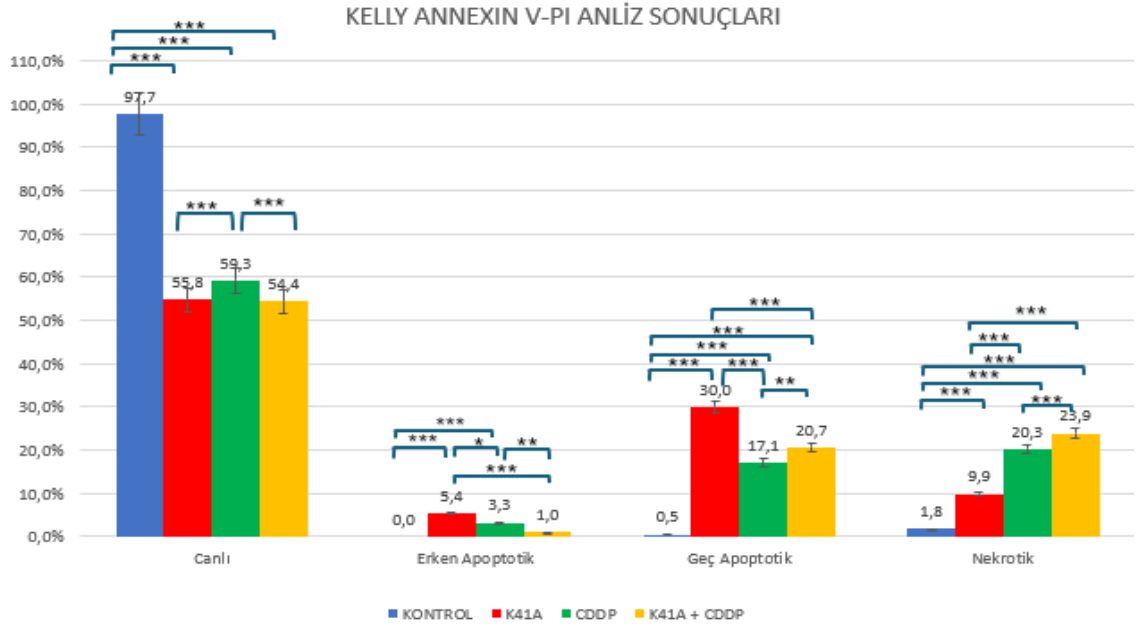


Şekil 20. SH-SY5Y hücrelerinde AnnexinV/PI analiz sonuçlarına ait yüzde oranlarını gösteren grafik (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

CDDP ve K41-A'nın LD50 dozları uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde 24 saatin sonunda kontrol grubunda %94,0 canlılık, %3,0 erken apoptoz, %1,5 geç apoptoz ve %1,5 nekroz görülürken; K41-A grubunda %62,7 canlılık, %0,4 erken apoptoz, %1,3 geç apoptoz ve %35,6 nekroz; CDDP grubunda %42,8 canlılık, %0,3 erken apoptoz, %1,9 geç apoptoz ve %55,0 nekroz; K41-A+CDDP grubunda %39,7 canlılık, %0,2 erken apoptoz, %1,0 geç apoptoz ve %59,0 nekroz görülmüştür.



Şekil 21. KELLY hücrelerinde AnnexinV/PI analiz sonuçlarına ait akım sitometri histogramları

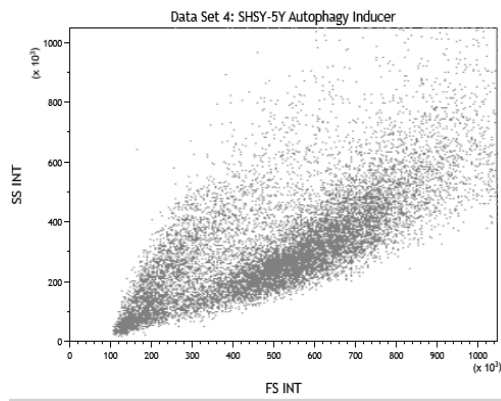


Şekil 22. KELLY hücrelerinde AnnexinV/PI analiz sonuçlarına ait yüzde oranlarını gösteren grafik (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

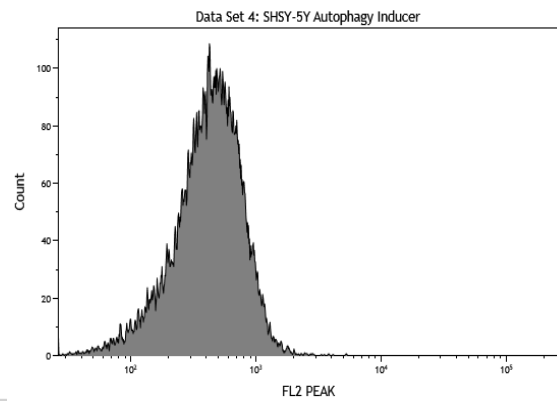
CDDP ve K41-A'nın LD50 dozları uygulanan KELLY hücrelerinde 24 saatin sonunda kontrol grubunda %97,7 canlılık, %0,0 erken apoptoz, %0,5 geç apoptoz ve %1,80 nekroz görülürken; K41-A grubunda %55,8 canlılık, %5,4 erken apoptoz, %30 geç apoptoz ve %9,9 nekroz; CDDP grubunda %59,3 canlılık, %3,3 erken apoptoz, %17,1 geç apoptoz ve %20,3 nekroz; K41-A+CDDP grubunda %54,4 canlılık, %1,0 erken apoptoz, %20,7 geç apoptoz ve %23,9 nekroz görülmüştür.

4.4. Akım Sitometrik Otofaji Tayini

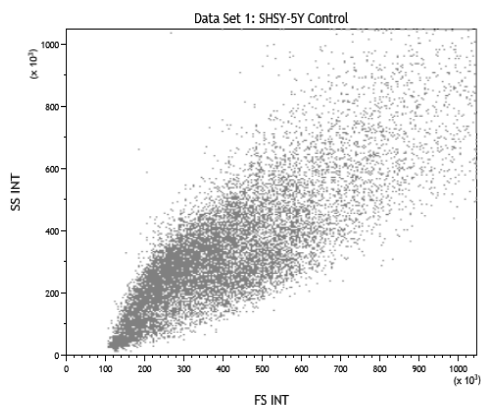
SH-SY5Y ve KELLY hücrelerinde K41-A ve CDDP uygulamasının otofaji üzerindeki etkilerini incelemek için akım sitometrisi ile otofaji tayini yapılmıştır.



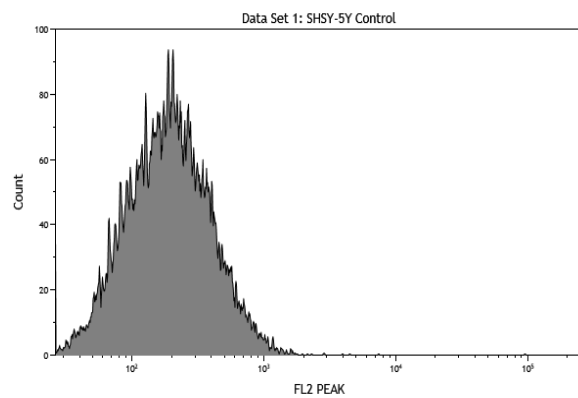
Gate Number	X-Med	X-Mean
All	15,000	537,165.6
		534,487.9



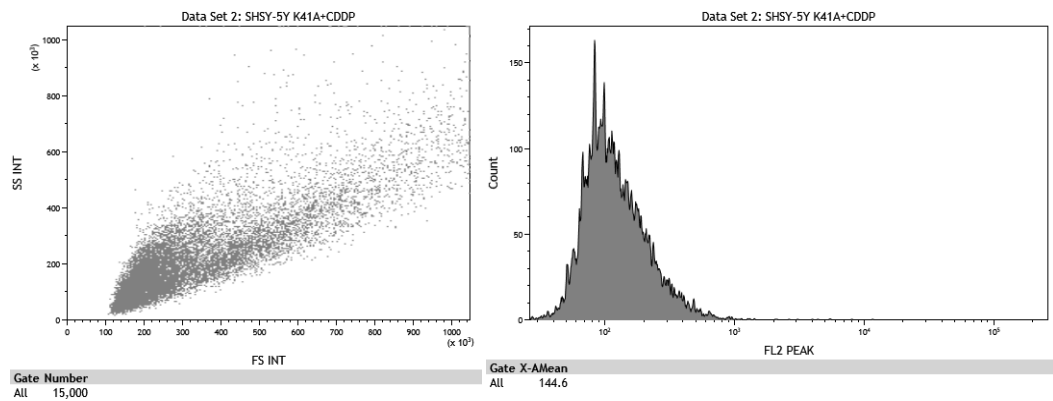
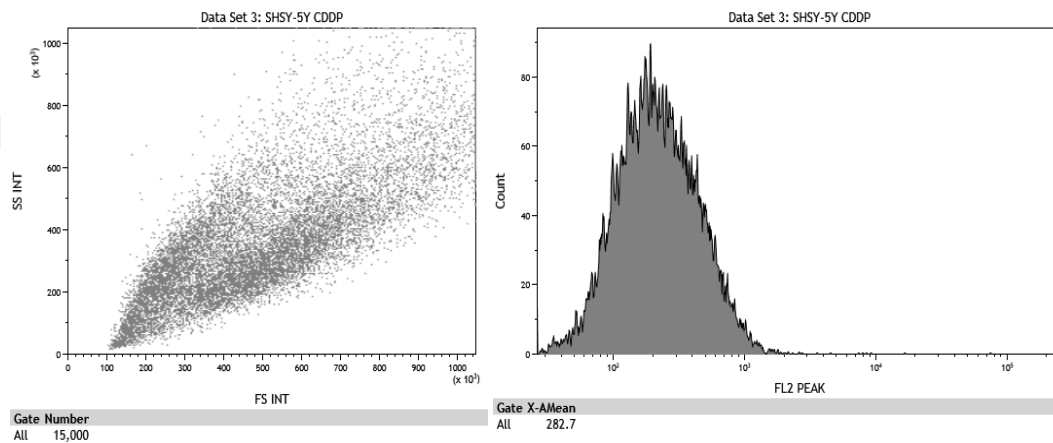
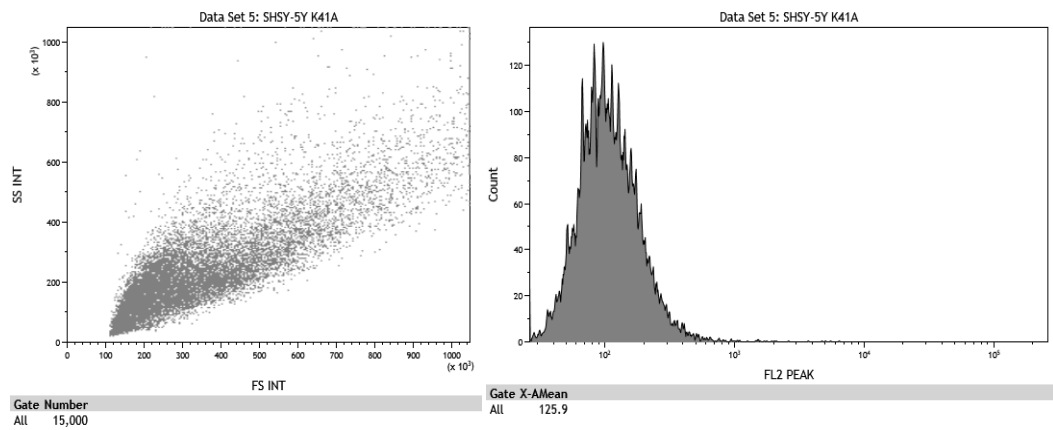
Gate	X-Mean
All	483.8

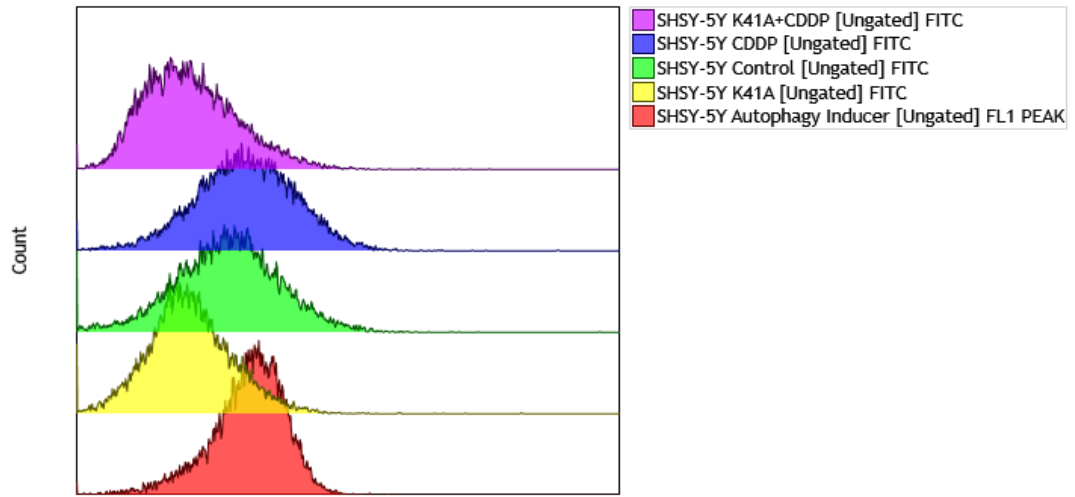


Gate Number	X-Med	X-Mean
All	15,000	

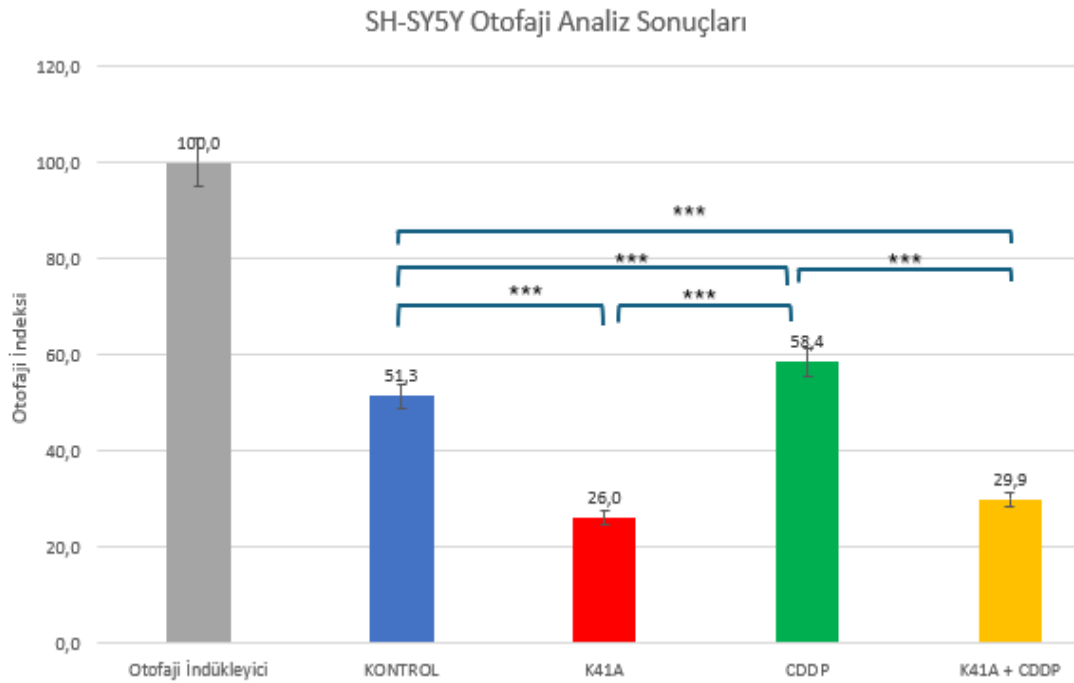


Gate	X-Mean
All	248.2



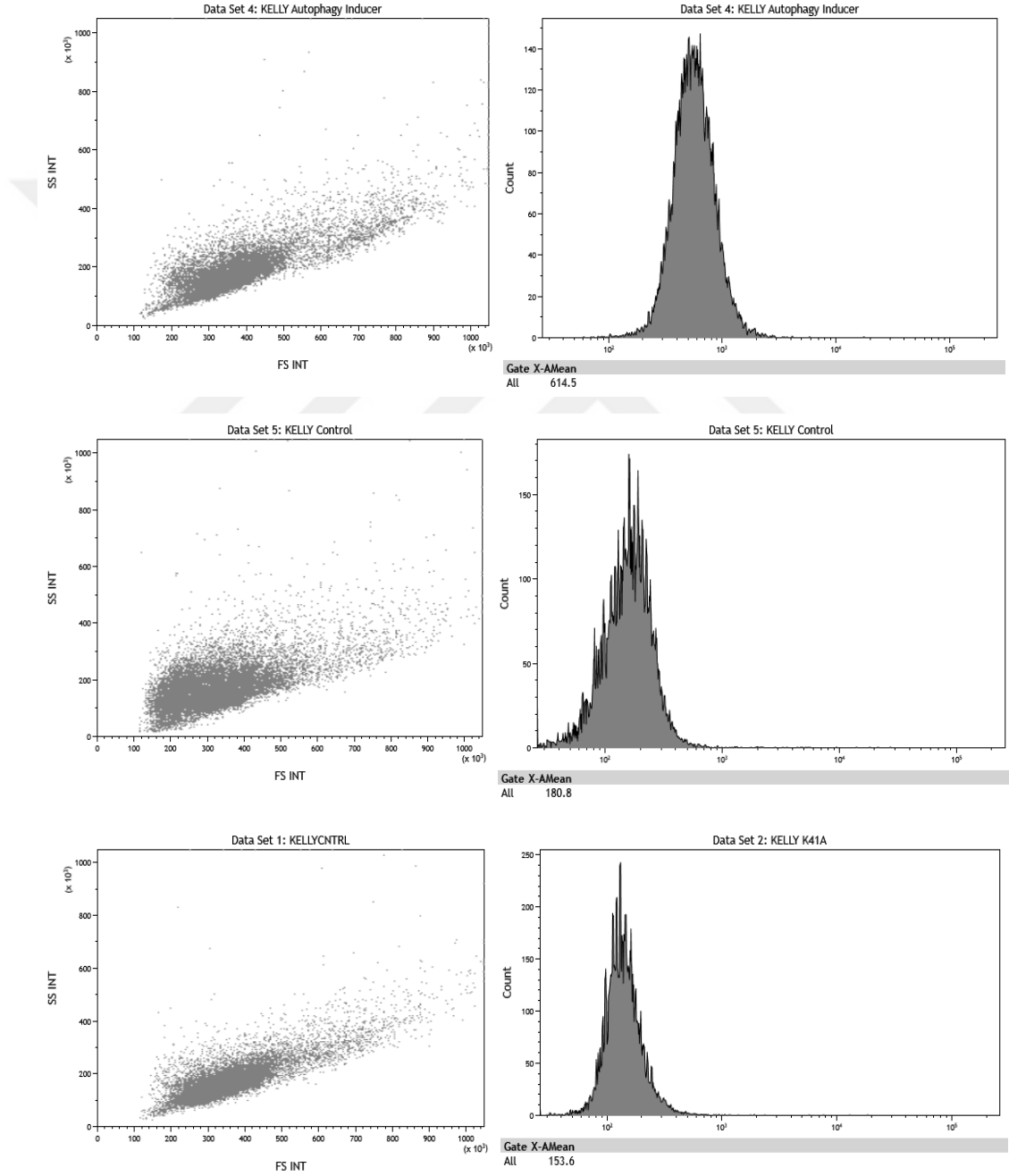


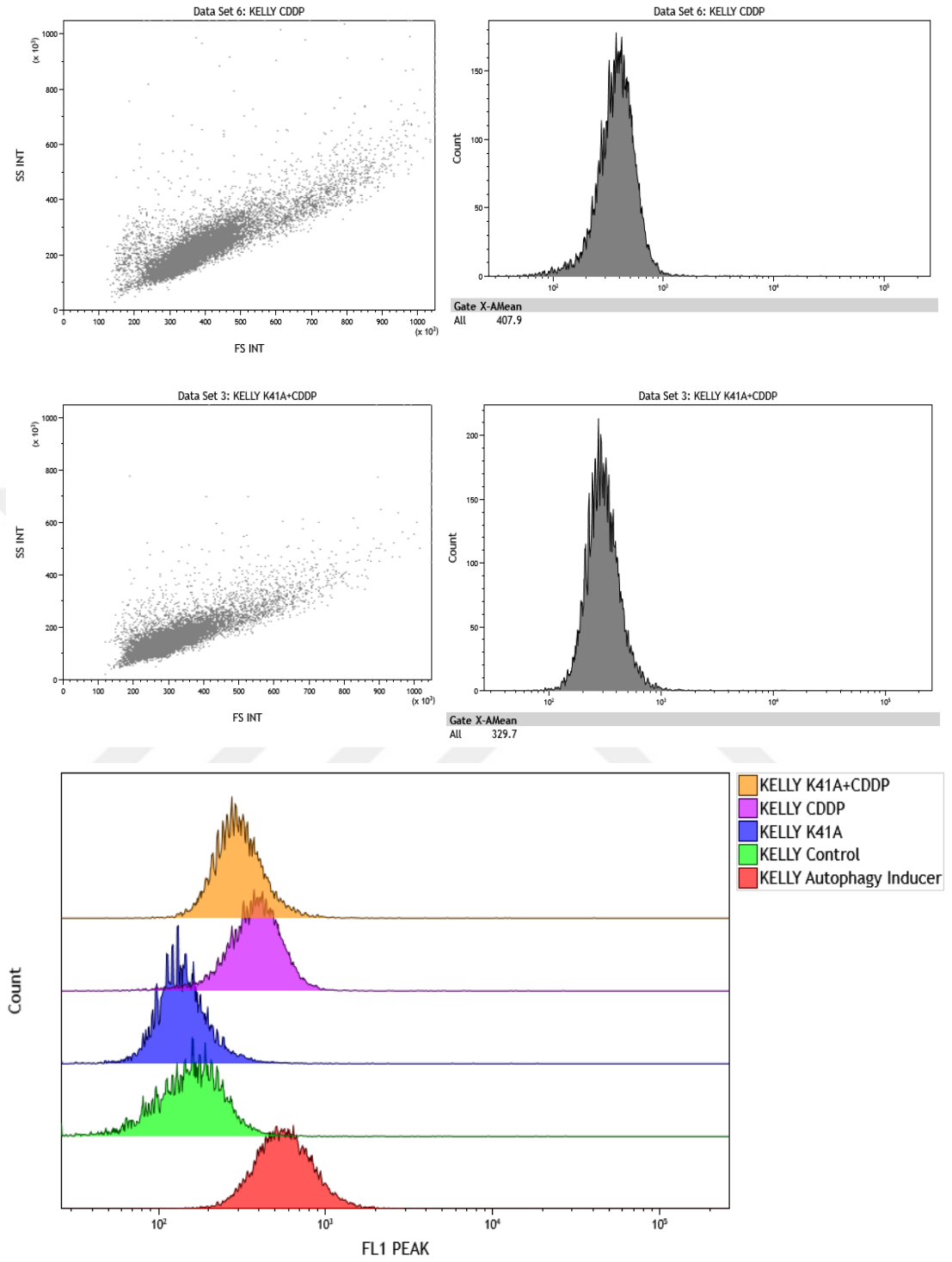
Şekil 23. SH-SY5Y hücrelerinde otofaji analiz sonuçlarına ait akım sitometri histogramları



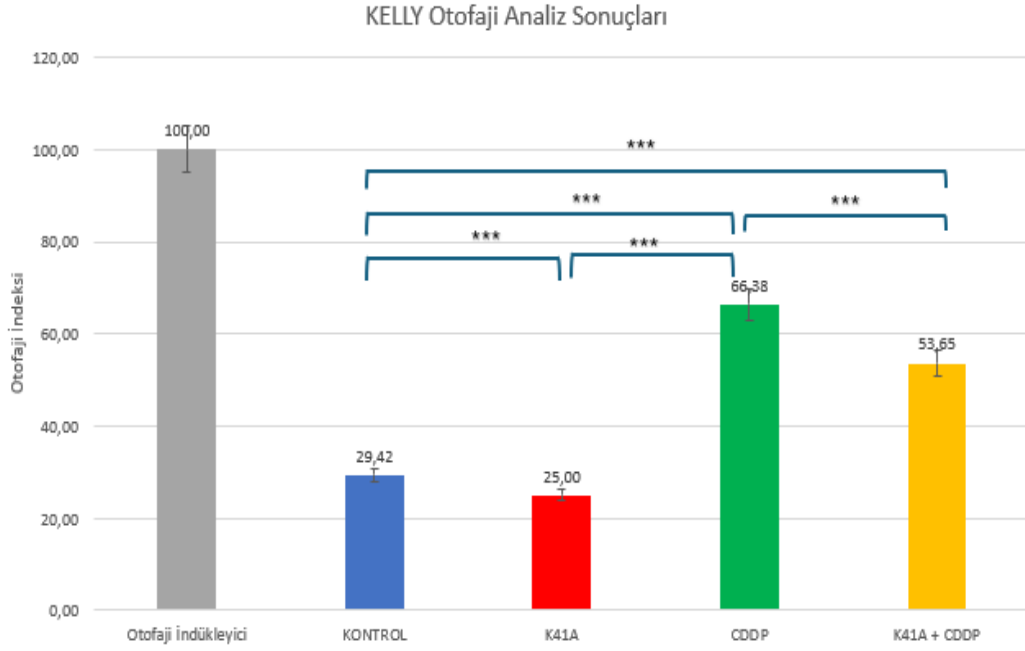
Şekil 24. K41-A ve CDDP uygulamasına bağlı olarak SH-SY5Y hücrelerinde otofaji oranlarını gösteren grafik (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

Bu sonuçlara göre SH-SY5Y hücrelerinde kontrol grubunda %51,3; K41-A grubunda %26,0; CDDP grubunda %58,4 ve K41-A+CDDP grubunda %29,9 otofaji görülmüştür. K41-A uygulanan grupta kontrol ve CDDP grubuna göre otofaji oranında azalma görülmektedir. Aynı zamanda K41-A+CDDP grubu da hem kontrol hem de tek başına CDDP ile karşılaştırıldığında daha az otofaji oranına sahiptir. K41-A, CDDP ile indüklenen otofajiyi inhibe etmiştir.





Şekil 25. KELLY hücrelerinde otofaji analiz sonuçlarına ait akım sitometri histogramları

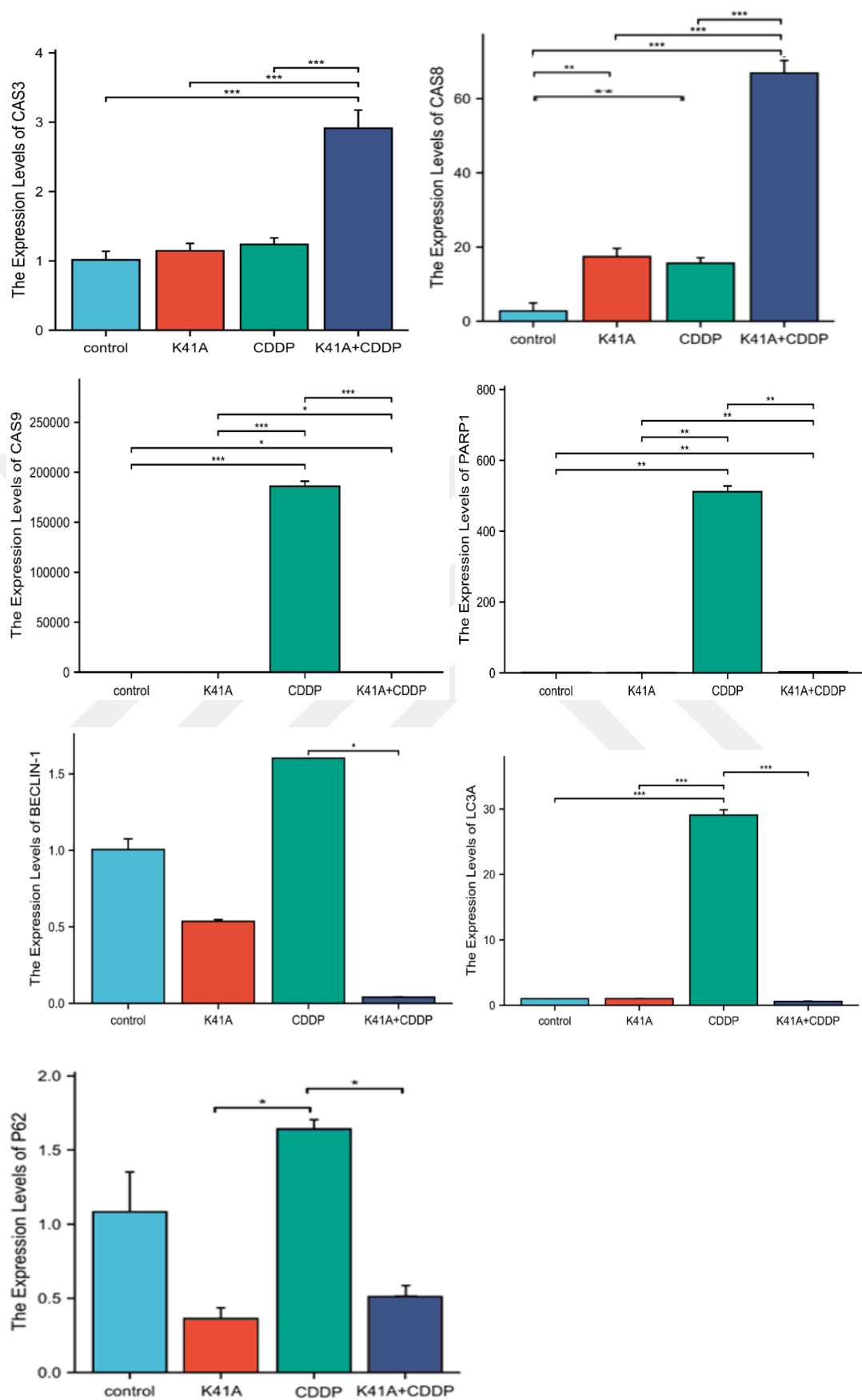


Şekil 26. K41-A ve CDDP uygulamasına bağlı olarak SH-SY5Y hücrelerinde otofaji oranlarını gösteren grafik (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)

Bu sonuçlara göre KELLY hücrelerinde kontrol grubunda %29,4; K41-A grubunda %25,0; CDDP grubunda %66,38 ve K41-A+CDDP grubunda %53,65 otofaji görülmüştür. K41-A uygulanan grupta kontrol ve CDDP grubuna göre otofaji oranında azalma görülmektedir. Aynı zamanda K41-A+CDDP grubu CDDP ile karşılaştırıldığında daha az otofaji oranına sahiptir. K41-A, CDDP ile indüklenen otofajiyi inhibe etmiştir.

4.5. Eş-zamanlı Kantitatif PCR (Q-PCR) Analizleri

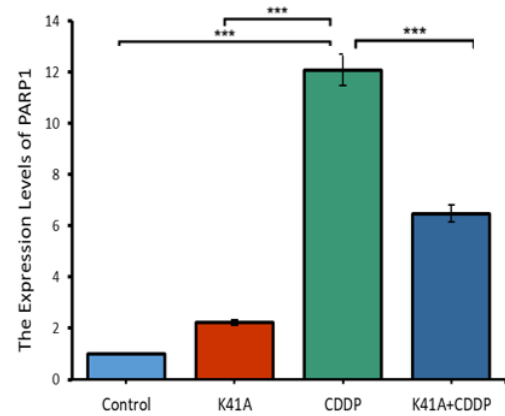
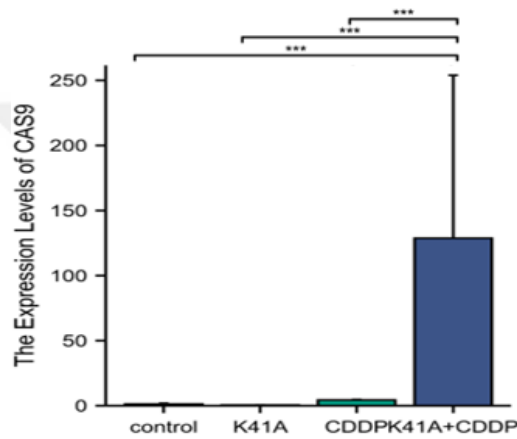
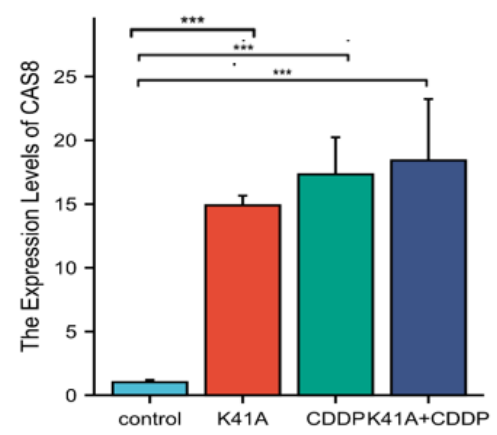
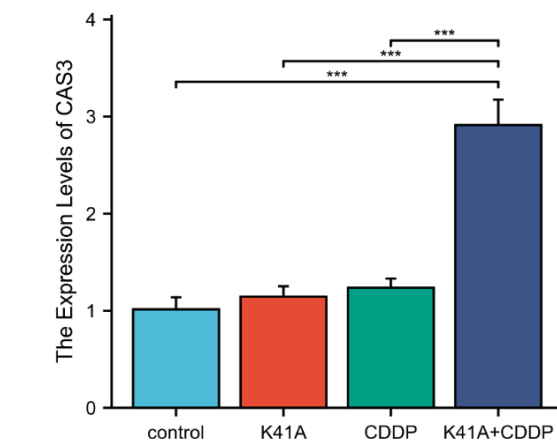
Hücrelerdeki apoptotik ve otofajik proteinlere ait mRNA seviyelerinin belirlenmesi için Q-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. SH-SY5Y hücrelerinde ajan uygulamasına bağlı olarak apoptotik ve otofajik belirteçlere ait RT-QPCR analiz sonuçları aşağıdaki gibidir. $p < 0,001$ *** olarak gösterilmektedir.

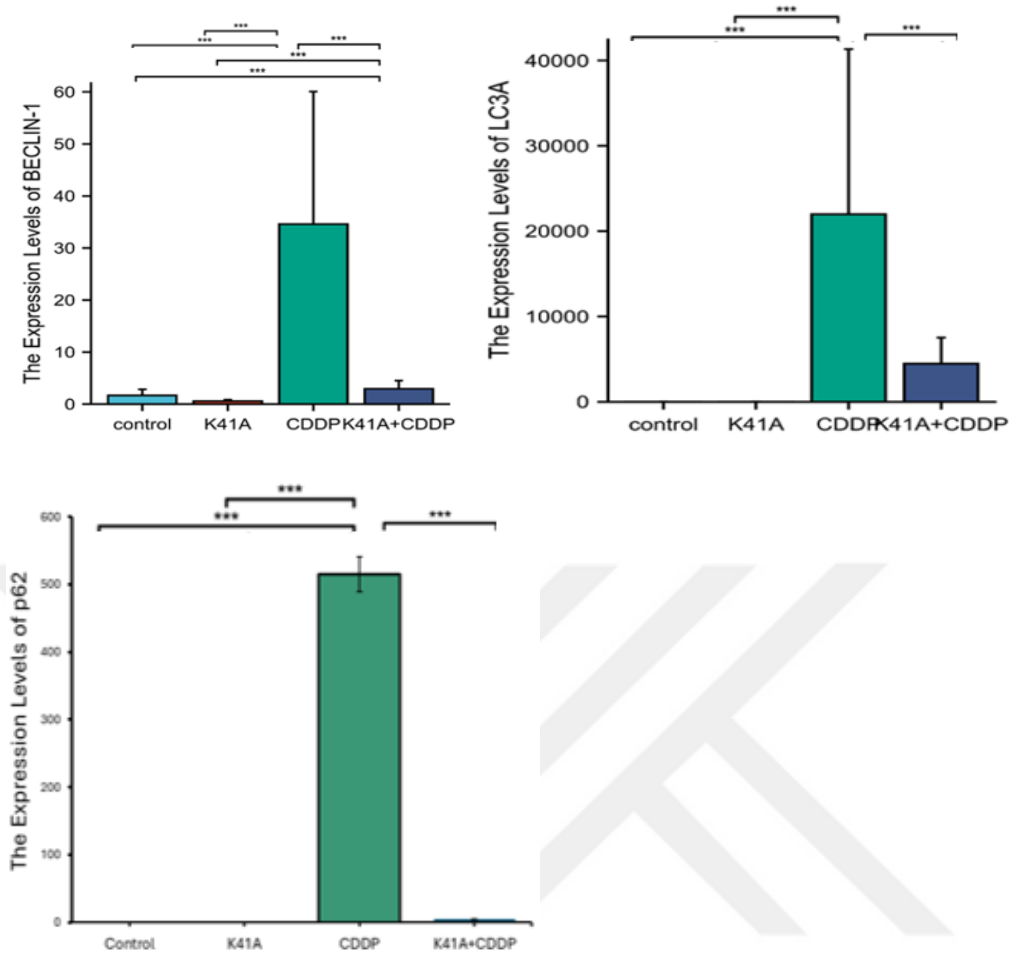


Şekil 27. K41-A ve CDDP uygulamasına bağlı olarak SH-SY5Y hücrelerinde Q-PCR ile gen ekspresyonlarının değişimlerinin incelenmesi (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

Bu sonuçlar göstermektedir ki SH-SY5Y hücrelerinde K41-A hem tek başına hem de CDDP ile birlikte kombine uygulamasında apoptotik Kaspaz 8 mRNA seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırmıştır ($p < 0.001$). K41-A+CDDP uygulaması ise Kaspaz 3 seviyelerinde anlamlı artışa neden olmuştur ($p < 0.001$). Kaspaz 9 mRNA seviyeleri ise CDDP ve K41-A+CDDP grubunda anlamlı artış gösterirken tek başına K41-A uygulanan grupta anlamlı fark görülmemiştir ($p > 0.05$). CDDP uygulaması PARP-1 seviyesini yüksek oranda arttırmıştır ve CDDP ile birlikte uygulanan K41-A bu aşırı yüksek ekspresyonu anlamlı derecede azaltmıştır ve hücrenin yüksek PARP-1 ekspresyonu ile geliştirdiği apoptoza direncini azaltmıştır ($p < 0.001$). Otofajik belirteçler olan p62, LC3A ve Beclin-1 ise CDDP uygulamasına bağlı olarak artarken K41-A uygulaması bu belirteçlerin ekspresyon seviyelerini hem tek başına hem de CDDP ile kombine uygulamada azaltarak otofajiyi inhibe etmektedir (sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.05$).

KELLY hücrelerinde ajan uygulamasına bağlı olarak apoptotik ve otofajik belirteçlere ait RT-QPCR analiz sonuçları aşağıdaki gibidir.





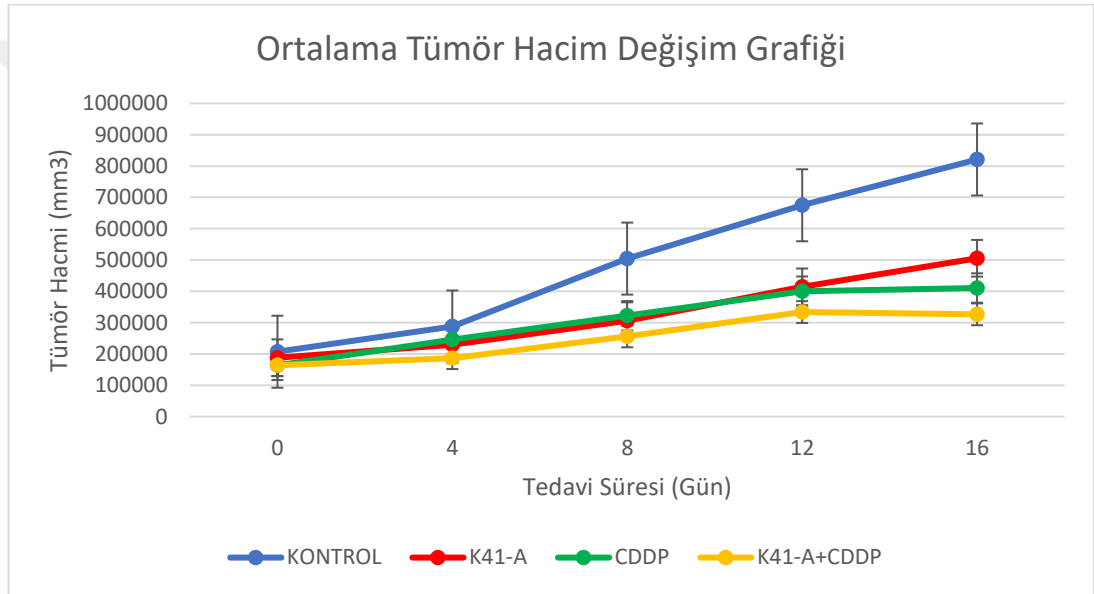
Şekil 28. K41-A ve CDDP uygulamasına bağlı olarak KELLY hücrelerinde Q-PCR ile gen ekspresyonlarının değişimlerinin incelenmesi (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

Bu sonuçlar göstermektedir ki KELLY hücrelerinde K41-A uygulaması hem tek başına hem de CDDP ile birlikte kombine uygulamasında apoptotik Kaspaz 8 mRNA seviyelerini arttırmıştır ($p < 0.001$). K41-A+CDDP uygulaması ise Kaspaz 3 seviyelerinde anlamlı artışa neden olmuştur ($p < 0.001$). Kaspaz 9 mRNA seviyeleri ise K41-A+CDDP grubunda anlamlı artış gösterirken tek başına K41-A ve CDDP uygulanan grupta anlamlı fark görülmemiştir ($p > 0.05$). CDDP uygulaması PARP-1 seviyesini yüksek oranda arttırmıştır ve CDDP ile birlikte uygulanan K41-A bu aşırı yüksek ekspresyonu anlamlı derecede azaltmıştır ve hücrenin apoptoza direncini azaltmıştır ($p < 0.001$). Otofajik belirteçler olan p62, LC3A ve Beclin-1 ise CDDP uygulamasına bağlı olarak artarken K41-A uygulaması bu belirteçlerin ekspresyon

seviyelerini hem tek başına hem de CDDP ile kombine uygulamada azaltarak otofajiyi inhibe etmektedir ($p<0,001$).

4.6. In Vivo Nöroblastom Ksenograft Modelinde Tümör Boyut Değişimlerinin İncelenmesi

Nude farelerde nöroblastom ksenograftları oluşturulduktan ve tümör boyutu 0,6-0,8 cm'ye ulaşanlar tedavi gruplarını randomize edilmiş ve tedavi başlangıcından sakrifikasyona kadarki tümör boyutları ölçülüp tümör hacmi hesaplanmıştır. Aşağıda gruplara ait tümör boyut değişim grafiği verilmektedir.

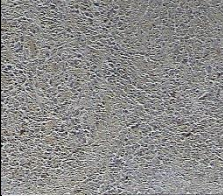
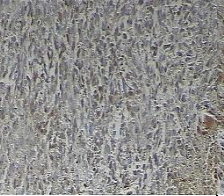
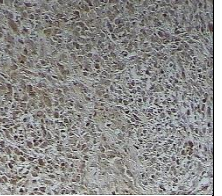
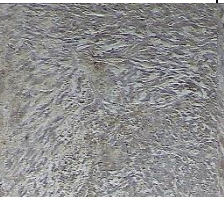
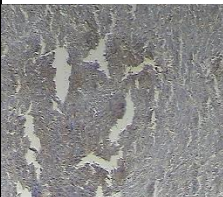
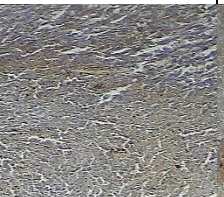


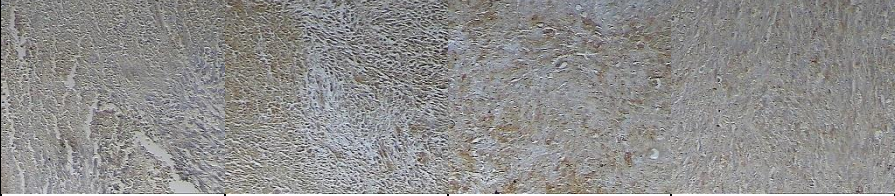
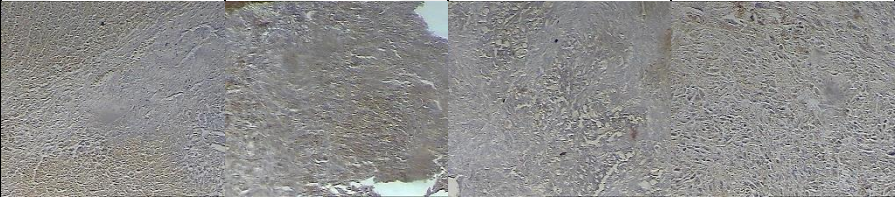
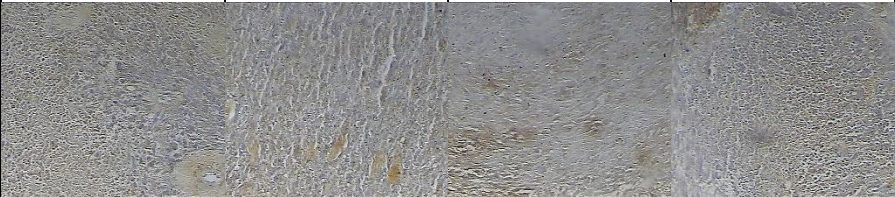
Şekil 29. Nöroblastom ksenograft modelinde tedavi süresince gruplardaki ortalama tümör hacim değişimleri. (Kontrol vs. CDDP $p=0,018$, Kontrol vs. K41-A+CDDP $p=0,00$)

Bu sonuçlar göstermektedir ki tümör boyutu en hızlı kontrol grubunda artarken CDDP grubunda tümör büyümesi anlamlı olarak azalmıştır. K41-A'nın CDDP ile birlikte uygulandığı grupta ise CDDP'nin tek başına uygulandığı gruba göre yine tümör büyümesi istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır.

4.7. In Vivo Nöroblastom Ksenograft Modelinde Apoptotik ve Otofajik Belirteçlerin İmmünohistokimyasal Analizi

Nude farelerde nöroblastom ksenograftları oluşturulup gruplara tedavi rejimleri uygulandıktan sonra fareler sakrifiye edilmiş ve tümör dokuları alınarak immünohistokimyasal analizle apoptotik cleaved-Kaspaz 3, cleaved-Kaspaz 8, cleaved-Kaspaz 9 ve cleaved-PARP-1 ve otofajik p62, LC3A, Beclin-1 protein ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. İmmünohistokimyasal boyamaları yapılan dokulara ait mikroskopik görüntüler aşağıda gösterilmektedir.

	Kontrol	K41-A	CDDP	K41-A + CDDP
Kaspaz 3				
	%40 ekspresyon	%50 ekspresyon	%50 ekspresyon	%60 ekspresyon
Kaspaz 8				
	%20 ekspresyon	%40 ekspresyon	%40 ekspresyon	%40 ekspresyon
Kaspaz 9				
	%10 ekspresyon / 10x	%25 ekspresyon / 10x	%15 ekspresyon / 10x	%20 ekspresyon / 10x

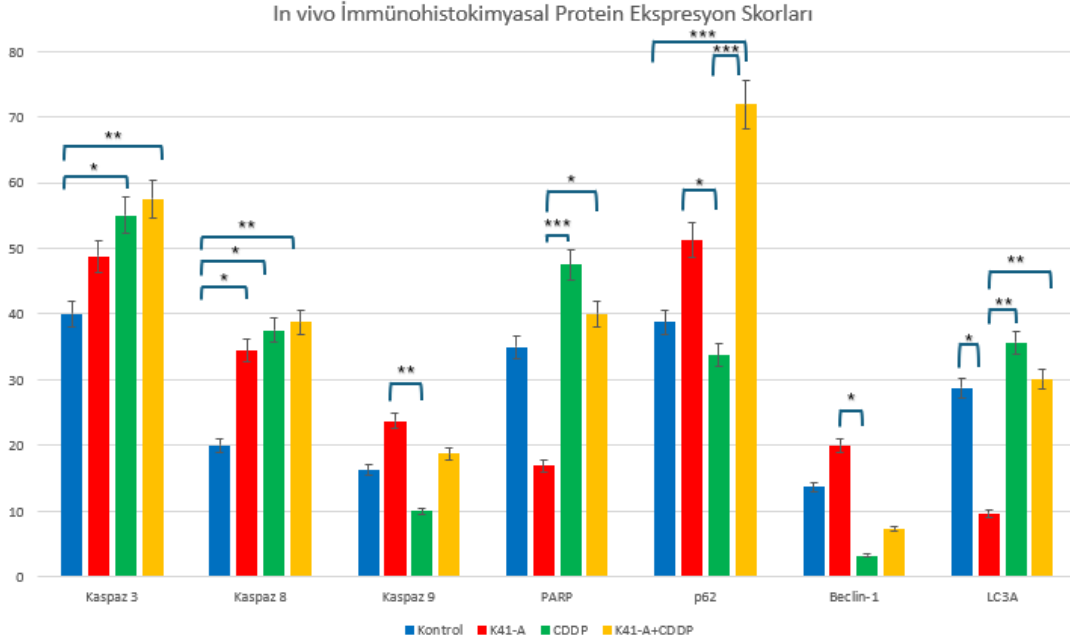
PARP				
	%30 ekspresyon / 10x			
p62				
	%40 ekspresyon / 10x			
Beclin-1				
	%10 ekspresyon / 10x			
LC3A				
	%30 ekspresyon / 10x			

Şekil 30. In vivo nöroblastom ksenograft modelinde tedavi gruplarına ait temsili immunohistokimyasal mikroskopi görüntüleri

Gruplar arası apoptotik ve otofajik hücre ölümü ile ilişkili protein seviyeleri karşılaştırılmış olup sonuç tablosu ve grafikleri aşağıda verilmektedir.

		Kaspaz 3		Kaspaz 8		Kaspaz 9		PARP		p62		Beclin-1		LC3A	
	N	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma	Ortalama	Std. Sapma
Kontrol	8	40	9,2582	20	5,34522	16,25	5,17549	35	5,34522	38,75	17,26888	13,75	7,44024	28,75	18,07722
K41-A	8	48,75	11,25992	34,375	15,45443	23,75	9,54314	16,875	14,37694	51,25	11,25992	20	22,67787	9,625	6,94751
CDDP	8	55	11,95229	37,5	8,86405	10	7,07107	47,5	8,86405	33,75	5,17549	3,25	1,98206	35,625	14,50062
K41-A+CD	8	57,5	7,07107	38,75	8,34523	18,75	7,90569	40	21,3809	71,875	11,31923	7,25	3,01188	30	7,55929

Şekil 31. In vivo nöroblastom ksenograft modelinde tedavi gruplarına ait ortalama apoptotik ve otofajik protein ekspresyon skorları tablosu



Şekil 32. In vivo nöroblastom ksenograft modelinde tedavi gruplarına ait ortalama apoptotik ve otofajik protein ekspresyon skorları grafiği (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

Bu sonuçlar göstermektedir ki apoptotik proteinler olan kaspaz 3 ve kaspaz 8 hem K41-A ve CDDP tek başlarına uygulandığında hem de birlikte uygulandığında kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış göstermiştir. Kaspaz 9 ekspresyonu ise K41-A grubunda CDDP grubuna göre anlamlı derecede daha fazla görülmüştür. PARP ekspresyonu K41-A uygulanan grupta azalmakta iken CDDP uygulanan grupta artmaktadır ve iki ajanın kombine uygulamasında CDDP tek başına uygulanan gruba göre azalmaktadır. P62'nin hücre içinde birikmesi hücrel otofajinin inhibisyonunun göstergesidir. Sonuçlara göre K41-A p62 oranını hem tek başına uygulandığında hem de CDDP ile birlikte uygulandığında arttırmıştır. Bu da K41-A'nın otofaji inhibisyonu yaptığını doğrular niteliktedir. K41-A yine hem tek uygulamada hem de kombine uygulamada LC3A otofajik protein seviyelerini düşürerek CDDP'nin neden olduğu otofajiyi azaltmaktadır.

5. TARTIŞMA

Doğal bileşikler olan poliyeter iyonoforlara son yıllarda artan bir ilgi olduğu gerçektir. Günümüzde moleküler yapısı aydınlatılmış olan 120'den fazla doğal iyonofor bileşik vardır (130). Başlıca amaçları koksidiyozu kontrol etmek olsa da (131) son yıllarda poliyeter iyonoforlar kanser araştırmalarında da öne çıkmaktadır (155).

K41-A, *Streptomyces* türlerinden izole edilen, Gram-pozitif bakterilere karşı antibakteriyel ve anti-koksidal aktivite bildirilen polisiklik bir poliyeter moleküldür (175). Khan ve arkadaşları ile Gezer ve arkadaşları, *Streptomyces cacaoi*'den K41-A molekülünü izole etmeyi başarmışlardır (16,17) Khan ve arkadaşları, K41-1A'nın insan servikal karsinom (HeLa), insan prostat kanseri (PC-3), insan akciğer adenokarsinomu (A549) ve insan kolorektal adenokarsinom (CaCo-2) hücreleri üzerinde antikanser özelliklere sahip olduğunu bildirmişlerdir (16). İzole edilen bu bileşiğin kanser hücre hatlarında otofaji üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Yazarlar, K41-A'nın otofajiyi inhibe edebileceğini öne sürmüşlerdir (16).

Bu çalışmada ise doğal bir poliyeter iyonofor olan K41-A'nın nöroblastom hücre hatları ve in vivo nöroblastom ksenograft modelinde olası anti-kanser etkileri ve etkili olabileceği öne sürülen hücre ölüm mekanizmaları moleküler tekniklerle incelenmiştir.

Bir poliyeter molekül olan lasalosid asitin antiproliferatif özellikleri, meme, kolon ve akciğer adenokarsinom hücre hatları da dahil olmak üzere bir dizi kanser hücre hattı üzerinde yapılan araştırmalarda kanıtlanmıştır (156). Daha ileri çalışmalar lasalosid asidin insan prostat kanserine karşı olumlu etkilerini doğrulamıştır (157). Diğer bir poliyeter iyonofor olan monensin ise prostat kanseri hücrelerine karşı yüksek verimli taraması yapılan 500'den fazla bileşiğin dahil edildiği bir çalışmada bu hücrelerin büyümesini inhibe etme özelliği gösteren dört ajandan birisi olarak öne çıkmıştır (158) Monensinin ayrıca lenfoma ve kemorezistan bir pankreas kanseri varyantı da dahil olmak üzere diğer birçok kanser hücresi türünün çoğalmasını engellediğini göstermiştir (159–161). Bu sonuçlara benzer şekilde, bu çalışmada K41-A'nın nöroblastom hücre hatlarında sitotoksik etki göstererek hücre büyümesini inhibe ettiği

göstermiştir. Ayrıca, polietar iyonoforlar diğerkemoterapötik ajanlarla birlikte uygulandıklarında sinerjik etki götorebilmektedirler. Örneğın monensin SWA11 risin A zincirinin sitotoksik aktivitesini birlikte uygulandığında elli kat arttırabilmeyi başarmıştır (162,163). Benzer şekilde doksorubisin ile birlikte uygulanan monensin bir HeLa hücre hattı türevinde doksorubisinin anti-proliferatif etkilerini arttırmaktadır (164). Yapılan bu çalışmada da sispatin ile uygulanan K41-A'nın tek başına sisplatin uygulamasına göre hücre canlılığını daha fazla azalttığı gösterilmiştir.

Apoptoz, kontrollü nekroz ve otofajik hücre ölümü sınıflandırılmış ana hücre ölüm tipleridir. Genellikle hücreler hücre ölüm mekanizmalarının karmaşık özelliklerine maruz kalırlar. Üç hücre ölüm tipi de birbirlerini dışlamadan etki ederler. Otofaji sitoplazmik içeriğın bozulmasıyla başlar ve bozunan hücresel içeriğın geri dönüştürülmesiyle hücresel stresin hafifletilmesine neden olur. Kanser hücreleri değışen mikroçevreleri ve yüksek metabolik ve biyosentez ihtiyaçları nedeniyle otofajiye sağılıklı hücrelere göre daha fazla yatkındırlar (196,197). Kanser hücreleri genellikle kusurlu otofajik kapasiteler gösterdiğinden, otofajinin indüksiyonu bir tümör baskılayıcı mekanizma olarak görölmektedir. Otofajik ölümün indüklenmesi, apoptoza dirençli kanser hücreleri için yararlı bir terapötik yaklaşım olabilir ve kanser hücresi ölümünü teşvik etmede apoptoz ile birlikte tamamlayıcı bir yaklaşım sağılayabilir. Öte yandan, otofajinin tedavi aracılı tümör hücresi ölümüne karşı direnç sağıladığı gösterilmiştir. Tümör hücreleri koruyucu otofajiyi indüklediğinde, otofajinin inhibisyonu apoptozu aktive ederek tümör hücrelerini tedaviye duyarlı hale getirmenin bir yolunu sağılayabilir (127–129). Polietar antibiyotikler arasında, monensin ve nigerisin otofaji üzerindeki etkileri açısından incelenen en yaygın antibiyotiklerdir. Monensinin hücre içinde otofajik vakuoller biriktirdiğı rapor edilmiştir (198). Daha ileri çalışmalar, monensinin otofaji yolunun terminal füzyon aşamasını, yani otofagozom ve lizozom füzyonunu inhibe ederek otofajik vakuollerin birikmesine yol açtığını ve HeLa hücre hattında apoptozu tetiklediğini doğrulamıştır (151). Benzer şekilde, başka bir çalışmada, polietar antibiyotikler monensin ve nigerisinin her ikisinin de MN9D nöronal hücrelerinde otofagozom ve lizozom füzyonu üzerindeki inhibitör etkilerini göstererek sitoplazmada otofajik vakuollerin birikmesine neden olduğı ortaya konmuştur. Buna paralel olarak, Western blot analizi, bu polietar antibiyotiklerin tedavisi üzerine kaspaz 3'ün parçalanması ile birlikte hem otofaji akış

belirteçleri LC3-II hem de p62'nin biriktiğini göstermiştir (152). Bununla birlikte, monensinin rapamisin (mTOR inhibitörü) veya erlotinib (epidermal büyüme faktörü reseptörü inhibitörü) gibi antikanser ilaçlarla eşzamanlı tedavisinin, akciğer kanseri hücre hattı NCI-H1299'da sinerjik antikanser aktivitesinin artmasıyla sonuçlandığı gösterilmiştir. Otofajinin hayatta kalma yanlısı rolü nedeniyle, kanser tedavisi sırasında, özellikle otofajik yolun negatif düzenleyicisi olan mTOR'u inhibe eden rapamisin tedavisi durumunda, hücrelerin otofaji yoluyla ölümden kaçmayı başardığı bilinmektedir. Bununla birlikte, monensin gibi otofaji inhibitörü ile eş zamanlı tedavi durumunda, bölünmüş kaspaz 3 gibi apoptoz yürütücülerinin yüksek konsantrasyonuna yol açmaktadır. Buna paralel olarak, LC3-II ve p62 otofaji belirteçlerinin her ikisi de kombinasyon tedavisinde artmıştır, bu da apoptotik aktivitenin otofajinin inhibisyonu ile tetiklendiğini düşündürmektedir (153). Bu çalışmada da literatür verileriyle uyumlu bir şekilde poliyeter molekül K41-A'nın nöroblastom hücrelerinde apoptozu artırırken otofajiyi inhibe ettiği akım sitometrik analizlerle gösterilmiştir. K41-A tek başına uygulandığında kontrol grubuna göre apoptotik hücre ölümünü anlamlı derecede arttırmıştır. Sisplatin ile uygulandığında ise her iki ajanın tek başlarına uygulandığı gruplara göre apoptotik hücre popülasyonu artmıştır. Aynı şekilde K41-A kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 gibi apoptoz belirteçlerinin RNA seviyelerini yukarı düzenlenmesine neden olmuştur. Sisplatin ve K41-A'nın birlikte uygulanması ise bu belirteçleri yine ajanların tek başlarına neden olduğundan daha fazla arttırarak apoptozun indüklenmesine sebebiyet vermiştir. Antineoplastik ajan sisplatin en çok intra ve interstrand DNA adductları oluşturma kapasitesi ile bilinir ve bu da hücre ölümünü ateşleyen bir DNA hasar yanıtının aktivasyonuna yol açar. Kanser hücrelerinin sisplatinin neden olduğu DNA hasarına bağlı olarak PARP hiperaktivitesine aracılı in vitro sisplatin direnci geliştirdiğini ve dolayısıyla PARP inhibitörlerinin sitotoksik etkilerine duyarlı hale geldiği gösterilmiştir (199–201). Bu çalışmada da nöroblastom hücrelerinde sisplatin uygulamasına bağlı olarak PARP RNA seviyelerinin yüksek oranda arttığı gösterilirken K41-A bunu anlamlı derecede azaltmış ve sisplatin ile birlikte uygulandığından sisplatinin neden olduğu PARP hiperaktivasyonunu anlamlı derecede azaltmayı başarmıştır. Bu da K41-A'nın PARP inhibitörlerine benzer mekanizma ile etki edebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, sisplatin uygulamasına

bağlı olarak hücrelerde otofajinin arttığı akım sitometrik analiz ile gösterilmiştir. Buna ek olarak p62, Beclin-1 ve LC3 RNA seviyelerini anlamlı derecede düşürmüş ve sisplatin uygulamasına bağlı olarak artan bu belirteçlerin seviyesine birlikte uygulandığında azaltıcı etki etmiştir. Bunun da yukarıda bahsedilen kanser hücrelerinin kemoterapötik uygulamasına yanıt olarak otofajinin indüksiyonu yoluyla apoptoza karşı direnç oluşturma çabalarından kaynaklandığı öne sürülebilir. Siplatinle birlikte uygulanan K41-A sisplatinin neden olduğu artmış otofajiyi anlamlı derecede inhibe edebilmektedir. Böylece hücrelerin otofaji aracılı apoptozdan kaçış mekanizmalarını bozarak kombinasyon tedavisinde daha anlamlı sitotoksik etki sağlaması mümkün olabilmektedir.

Salinomisin, monensin ve nigerisin iyonoforları in vitro çalışmaların yanında aynı zamanda in vivo preklinik kanser modellerinde tek ajan olarak ve diğer antikanser ilaçlarla kombinasyon halinde önemli antikanser aktiviteleri göstermiştir. Daha da önemlisi, kanser kök hücresi benzeri hücrelere karşı da antikanser aktivite göstermişlerdir. İn vivo çalışmalar, gemsitabin ile kombine edilen salinomisinin insan pankreas kanserinin engraftmanını tek başına ajandan daha etkili bir şekilde ortadan kaldıracabildiğini göstermiştir (172). Bir çalışmada, salinomisin, meme kanseri hastalarının mammosferindeki kanser kök hücrelerini ve nude farelerde MCF-7 mammosfer tümör ksenograftındaki tümör büyümesini hedgehog sinyali modüle ederek inhibe etmiştir (202). Salinomisinin başka bir in vivo çalışmada ise HepG2 nude fare ortotopik tümöründe hücre içi Ca^{2+} ve Wnt/ β -katenin yolağını modüle ederek apoptozu indüklediği gösterilmiştir (203). Wu ve arkadaşları tarafından yürütülen başka bir çalışma ise salinomisinin in vivo olarak nude farelerde (BALB/c-nu) CNE-2 tümör ksenograft büyümesini baskıladığı kanıtlanmıştır (204). Salinomisin ayrıca gastrik kanser modeli oluşturulan farelerde in vivo matrigel plug testinde neovaskülarizasyonu azalttığı ve STAT3 sinyali modüle ederek ve mide kanseri modelinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Salinomisin, in vivo BALB/cA nude farelerde SGC-7901 tümör ksenograft büyümesinde CD-31-pozitif endotelial hücreleri ve VEGF, p-VEGFR2 ve p-STAT3 ekspresyonunu azaltmıştır (205). Nude farelerde Wnt1-transfekte AGS mide kanseri hücrelerinde CD44+ Oct4+ gastrik CSC popülasyonunu inhibe etmiştir (206). Nigerisin ile yapılan bir çalışmada ise nazofarenks kanserinde, nigerisinin kanser kök hücrelerini hedef aldığı ve onları hem

in vivo hem de in vitro olarak sisplatine karşı hassaslaştırdığı da bildirilmiştir (207). Monensinin dahil edildiği bir çalışmada ise veriler, iyonofor monensin ile tedavinin, normal dokuları etkilemeden HCC hücrelerinde Na⁺ homeostazını bozmak için güvenli bir alternatif olduğunu göstermiştir. Monensinin apoptozu indüklediği ve çoklu ilaç direnci gösterenler de dahil olmak üzere çok sayıda kanser hücresi türünün in vitro proliferasyonunu inhibe ettiği ve ksenograft ekstra hepatik tümörlerin in vivo büyümesini belirgin şekilde azalttığı gösterilmiştir (208). Literatürdeki bu in vivo verilerle uyumlu şekilde poliyeter bileşil K41-A KELLY nöroblastom ksenograft modelinde kontrole oranla anlamlı derecede tümör büyümesini azaltmıştır. Ayrıca sisplatin ile birlikte uygulanan K41-A tümör büyümesinde her iki ajanın tek başlarına neden olduğundan daha yüksek oranda bir düşüşe neden olmuştur. Tedavi gruplarına ayrılan farelerden alınan tümör dokuları incelendiğinde bu çalışmaya ait in vitro verilerle uyumlu şekilde K41-A'nın apoptotik protein seviyelerinde artışa neden olurken otofaji belirteçlerinin seviyeleri K41-A'nın otofaji inhibisyonuna neden olduğunu doğrular niteliktedir. K41-A sisplatin uygulamasına bağlı olarak indüklenen koruyucu otofajiyi inhibe ederken hücrelerin apoptoza yönelmesini desteklemektedir.

Streptomyces türlerinden elde edilen diğer bir kemoterapötik ajan sınıfı olan antrasiklinler, çeşitli kanser türlerini tedavi etmek için kullanılan ilaçlardır. Başlıcaları daunorubisin, doksorubisin, epirubisin, idarubisin olan bu antibiyotik/kemoterapötik sınıfı ajanlar ciddi kardiyotoksik yan etkilere neden olabilmektedir (209, 210). Bu nedenle K41-A poliyeter anitibiyotiğinin anti-kanser etkilerinin yanında ciddi sağlıklı doku toksisitelerine neden olup olmadığı önemli bir soru olarak öne çıkmaktadır. Bu çalışma kapsamında K41-A uygulanan ksenograft modelinde sağlıklı organ toksisitesi araştırılmış olup, K41-A uygulanan farelerin sağlıklı organ dokularında herhangi bir toksik etki görülmediği mikroskopik inceleme ile ortaya konmuştur. Bu da K41-A'yı nöroblastom hücrelerine karşı seçici sitotoksik bir ajan olarak belirleme yolunda büyük önem arz etmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan tez çalışmasında SH-SY5Y ve KELLY nöroblastom hücre hatlarında K41-A'nın tek başına ve sisplatin ile birlikte anti-kanser etkinliği incelenmiştir. Her iki hücre hattında da K41-A tek başına ve sisplatin ile birlikte anti-proliferatif etki göstermiş olup sisplatinle birlikte uygulandığında her iki ajanın tek başlarına uygulandığı gruplara kıyasla anlamlı derecede hücre canlılığını azaltmayı başarmıştır. K41-A'nın anti-proliferatif etkisinden sorumlu mekanizmasını aydınlatmak amacıyla hücre ölüm yolları araştırılmıştır. K41-A'nın nöroblastom hücre hatlarında otofaji inhibisyonu ile birlikte aynı zamanda apoptoz indüksiyonuna neden olduğu gözlenmiştir. Sisplatin ve K41-A birlikte uygulandığında ise hücrelerde daha yüksek oranda apoptoz gerçekleştiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, K41-A sisplatin uygulamasına bağlı olarak artan otofajiyi nöroblastom hücrelerinde inhibe etmektedir. Böylece sisplatinin indüklediği koruyucu otofajiyi ortadan kaldırarak hücrelerin apoptoza yönelmesine yardımcı olur. Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen in vivo nöroblastom ksenograft modeli sayesinde ise K41-A'nın nöroblastom tümör büyümesini anlamlı derecede yavaşlattığı ve bu anti-karsinojenik etkinin sisplatin ile kombinasyon halinde bu etkinin daha da belirgin olduğu gösterilmiştir. In vitro sonuçlar ile uyumlu olarak in vivo sonuçlar da K41-A'nın apoptoz indüksiyonu yaparken hücrel otofajiyi inhibe ettiği görülmüştür.

Bu sonuçlar ve literatürdeki veriler doğrultusunda, doğal bir poliyeter iyonofor molekül olan K41-A nöroblastomda ümit vadeden bir anti-karsinojenik ajan olarak tanımlanabilir. K41-A da diğer poliyeter iyonofor bileşikler gibi hücrel otofajik proseslerin inhibisyonu açısından değerlendirilmiş ve benzer sonuçlar ortaya konmuştur. Bu da K41-A'yı bir otofaji inhibitörü olarak tanımlamak adına önem arz etmektedir.

K41-A'nın nöroblastom karsinogenezinde rol oynayan diğer yollar üzerindeki etkisinin de moleküler temellerinin tartışılacağı çalışmalar planlamak faydalı olabilecektir. Ayrıca, bu molekülün otofaji üzerindeki etkilerini daha detaylı incelemek adına otofaji adımlarının daha detaylı inceleneceği bir çalışma da ayrıca faydalı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Çeçen RE, İnce D, & Olgun HN. Nöroblastoma. Türkiye Klinikleri Çocuk Hematolojisi ve Onkolojisi, Özel Konular, Çocukluk Çağında Nadir Görülen Tümörler. 2021;22–31.
2. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3:203-16.
3. Johnsen JI, Kogner P, Albiñ A, Henriksson MA. Embryonal neural tumours and cell death. *Apoptosis*. 2009;14(4):424-438.
4. Finklestein JZ, Gilchrist GS. Recent advances in neuroblastoma. *Calif Med*. 1972;116(3):27-36.
5. Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010;24(1):65–86.
6. Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: Biology, Prognosis, and Treatment. *Pediatr Clin North Am*. 2008;55(1):97–120.
7. Nakagawara A, Li Y, Izumi H, Muramori K, Inada H, Nishi M. Neuroblastoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2018;48(3):214–41.
8. Tolbert VP, Matthay KK. Neuroblastoma: clinical and biological approach to risk stratification and treatment. *Cell Tissue Res*. 2018;372(2):195–209.
9. Aksoylar S, Varan A, Vergin C, Hazar V, Akici F, Dagdemir A, ve ark. Treatment of high-risk neuroblastoma: National protocol results of the Turkish Pediatric Oncology Group. *J Cancer Res Ther*. 2017;13(2):284.
10. Newman EA, Abdessalam S, Aldrink JH, Austin M, Heaton TE, Bruny J ve ark. Update on neuroblastoma. *J Pediatr Surg*. 2019;54(3):383–9.
11. Smith V, Foster J. High-Risk Neuroblastoma Treatment Review. *Children*. 2018;5(9):114.
12. Fuchs D, Heinold A, Opelz G, Daniel V, Naujokat C. Salinomycin induces apoptosis and overcomes apoptosis resistance in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390(3):743–9.
13. Grinde B. Effect of carboxylic ionophores on lysosomal protein degradation in rat hepatocytes. *Exp Cell Res*. 1983;149(1):27–35.

14. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet.* 2009;43:67–93.
15. Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(9):1533–41.
16. Khan N, Yılmaz S, Aksoy S, Uzel A, Tosun Ç, Kirmizibayrak PB, ve ark. Polyethers isolated from the marine actinobacterium *Streptomyces cacaoi* inhibit autophagy and induce apoptosis in cancer cells. *Chem Biol Interact.* 2019;307:167–78.
17. Gezer E, Üner G, Küçüksolak M, Kurt MÜ, Doğan G, Kirmizibayrak PB, ve ark. Undescribed polyether ionophores from *Streptomyces cacaoi* and their antibacterial and antiproliferative activities. *Phytochemistry.* 2022;195:113038.
18. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem.* 2019;88:102925.
19. De Luca A, Parker LJ, Ang WH, Rodolfo C, Gabbarini V, Hancock NC, ve ark. A structure-based mechanism of cisplatin resistance mediated by glutathione transferase P1-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2019;116(28):13943–51.
20. Eljack ND, Ma HYM, Drucker J, Shen C, Hambley TW, New EJ, ve ark. Mechanisms of cell uptake and toxicity of the anticancer drug cisplatin. *Metallomics.* 2014;6(11):2126–33.
21. Meczkes EL, Pearson ADJ, Austin CA, Tilby MJ. Schedule-dependent response of neuroblastoma cell lines to combinations of etoposide and cisplatin. *Br J Cancer.* 2002;86(3):485–9.
22. Pérez-Hernández M, Arias A, Martínez-García D, Pérez-Tomás R, Quesada R, Soto-Cerrato V. Targeting Autophagy for Cancer Treatment and Tumor Chemosensitization. *Cancers (Basel).* 2019;11(10).
23. Fetahu IS, Taschner-Mandl S. Neuroblastoma and the epigenome. *Cancer Metastasis Rev.* 2021;40(1):173-189.
24. Simões-Costa M, Bronner ME. Insights into neural crest development and evolution from genomic analysis. *Genome Res.* 2013;23(7):1069–80.
25. Bronner ME, Simões-Costa M. The Neural Crest Migrating into the Twenty-First Century. *Curr Top Dev Biol.* 2016;116:115–34.
26. Simões-Costa M, Bronner ME. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development.* 2015;142(2):242–57.

27. Zage PE, Whittle SB, Shohet JM. CD114: A New Member of the Neural Crest-Derived Cancer Stem Cell Marker Family. *J Cell Biochem.* 2017;118(2):221–31.
28. Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene.* 2008;27(55):6958–69.
29. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development.* 2005;132(14):3151–61.
30. Theveneau E, Mayor R. Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Dev Biol.* 2012;366(1):34–54.
31. Matthay KK, Maris JM, Schleiermacher G, Nakagawara A, Mackall CL, Diller L, et al. Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2(1):16078.
32. Schneider C, Wicht H, Enderich J, Wegner M, Rohrer H. Bone Morphogenetic Proteins Are Required In Vivo for the Generation of Sympathetic Neurons. *Neuron.* 1999;24(4):861–70.
33. Huber K, Franke A, Brühl B, Krispin S, Ernsberger U, Schober A, et al. Persistent expression of BMP-4 in embryonic chick adrenal cortical cells and its role in chromaffin cell development. *Neural Dev.* 2008;3(1):28.
34. Betters E, Liu Y, Kjaeldgaard A, Sundström E, García-Castro MI. Analysis of early human neural crest development. *Dev Biol.* 2010;344(2):578–92.
35. Huber K. The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification, and new perspectives. *Dev Biol.* 2006;298(2):335–43.
36. Stine ZE, Walton ZE, Altman BJ, Hsieh AL, Dang C V. MYC, metabolism, and cancer. *Cancer Discov.* 2015;5(10):1024–39.
37. Huang M, Weiss WA. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(10):a014415.
38. Hansford LM, Thomas WD, Keating JM, Burkhart CA, Peaston AE, Norris MD, et al. Mechanisms of embryonal tumor initiation: distinct roles for MycN expression and MYCN amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(34):12664–9.
39. Wartiovaara K, Barnabe-Heider F, Miller FD, Kaplan DR. N-myc promotes survival and induces S-phase entry of postmitotic sympathetic neurons. *J Neurosci.* 2002;22(3):815–24.

40. Zhang JT, Weng ZH, Tsang KS, Tsang LL, Chan HC, Jiang XH. MycN Is Critical for the Maintenance of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Crest Stem Cells. *PLoS One*. 2016;11(1):e0148062.
41. Finklestein JZ, Gilchrist GS. Recent advances in neuroblastoma. *Calif Med*. 1972;116(3):27–36.
42. Weiss WA, Aldape K, Mohapatra G, Feuerstein BG, Bishop JM. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO J*. 1997;16(11):2985–95.
43. Azarova AM, Gautam G, George RE. Emerging importance of ALK in neuroblastoma. *Semin Cancer Biol*. 2011;21(4):267–75.
44. Cheung NK V., Dyer MA. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(6):397–411.
45. Wang M, Zhou C, Sun Q, Cai R, Li Y, Wang D ve ark. ALK amplification and protein expression predict inferior prognosis in neuroblastomas. *Exp Mol Pathol*. 2013;95(2):124–30.
46. Duijkers FAM, Gaal J, Meijerink JPP, Admiraal P, Pieters R, de Krijger RR ve ark. High Anaplastic Lymphoma Kinase Immunohistochemical Staining in Neuroblastoma and Ganglioneuroblastoma Is an Independent Predictor of Poor Outcome. *Am J Pathol*. 2012;180(3):1223–31.
47. Pandian V, Ramraj S, Khan FH, Azim T, Aravindan N. Metastatic neuroblastoma cancer stem cells exhibit flexible plasticity and adaptive stemness signaling. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):400.
48. Kushner BH. Neuroblastoma: a disease requiring a multitude of imaging studies. *J Nucl Med*. 2004;45(7):1172–88.
49. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *The Lancet*. 2007;369(9579):2106–20.
50. Geerts D, Revet I, Jorritsma G, Schilderink N, Versteeg R. MEIS homeobox genes in neuroblastoma. *Cancer Letters*. 2005;228(1-2):43–50.
51. Ladenstein R, Pötschger U, Pearson ADJ, Brock P, Luksch R, Castel V ve ark. Busulfan and melphalan versus carboplatin, etoposide, and melphalan as high-dose chemotherapy for high-risk neuroblastoma (HR-NBL1/SIOPEN): an international, randomised, multi-arm, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(4):500–14.

52. Brodeur GM, Maris JM. Principles and Practice of Pediatric Oncology: Neuroblastoma. 6. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2011.
53. Alvarado CS, London WB, Look AT, Brodeur GM, Altmiller DH, Thorner PS ve ark. Natural history and biology of stage A neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group Study. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2000;22(3):197–205.
54. Perez CA, Matthay KK, Atkinson JB, Seeger RC, Shimada H, Haase GM ve ark. Biologic variables in the outcome of stages I and II neuroblastoma treated with surgery as primary therapy: a children’s cancer group study. *J Clin Oncol.* 2000;18(1):18–26.
55. Nuchtern JG, London WB, Barnewolt CE, Naranjo A, McGrady PW, Geiger JD ve ark. A Prospective Study of Expectant Observation as Primary Therapy for Neuroblastoma in Young Infants. *Ann Surg.* 2012;256(4):573–80.
56. Strother DR, London WB, Schmidt M Lou, Brodeur GM, Shimada H, Thorner P ve ark. Outcome After Surgery Alone or With Restricted Use of Chemotherapy for Patients With Low-Risk Neuroblastoma: Results of Children’s Oncology Group Study P9641. *Journal of Clinical Oncology.* 2012;30(15):1842–8.
57. Hero B, Simon T, Spitz R, Ernestus K, Gnekow AK, Scheel-Walter HG ve ark. Localized Infant Neuroblastomas Often Show Spontaneous Regression: Results of the Prospective Trials NB95-S and NB97. *Journal of Clinical Oncology.* 2008;26(9):1504–10.
58. Matthay KK, Perez C, Seeger RC, Brodeur GM, Shimada H, Atkinson JB ve ark. Successful treatment of stage III neuroblastoma based on prospective biologic staging: a Children’s Cancer Group study. *J Clin Oncol.* 1998;16(4):1256–64.
59. Baker DL, Schmidt ML, Cohn SL, Maris JM, London WB, Buxton A ve ark. Outcome after reduced chemotherapy for intermediate-risk neuroblastoma. *N Engl J Med.* 2010;363(14):1313–23.
60. Rubie H, De Bernardi B, Gerrard M, Canete A, Ladenstein R, Couturier J ve ark. Excellent Outcome With Reduced Treatment in Infants With Nonmetastatic and Unresectable Neuroblastoma Without *MYCN* Amplification: Results of the Prospective INES 99.1. *Journal of Clinical Oncology.* 2011;29(4):449–55.
61. Twist CJ, Schmidt M Lou, Naranjo A, London WB, Tenney SC, Marachelian A ve ark. Maintaining Outstanding Outcomes Using Response- and Biology-Based Therapy for Intermediate-Risk

Neuroblastoma: A Report From the Children's Oncology Group Study ANBL0531. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(34):3243–55.

62. Pinto NR, Applebaum MA, Volchenboun SL, Matthay KK, London WB, Ambros PF ve ark. Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(27):3008–17.
63. Meany HJ, London WB, Ambros PF, Matthay KK, Monclair T, Simon T ve ark. Significance of clinical and biologic features in Stage 3 neuroblastoma: A report from the International Neuroblastoma Risk Group project. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61(11):1932–9.
64. Wang H, Zhou X, Li C, Yan S, Feng C, He J ve ark. The emerging role of pyroptosis in pediatric cancers: from mechanism to therapy. *J Hematol Oncol*. 2022;15(1):140.
65. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239–57.
66. Krüger M, Richter P. To Die or Not to Die: Cell Death in Biology and Disease. *Int J Mol Sci*. 2022;23(12):6734.
67. Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(12).
68. Chen X, Kang R, Kroemer G, Tang D. Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18(5):280–96.
69. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P ve ark. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018;25(3):486–541.
70. Christgen S, Tweedell RE, Kanneganti TD. Programming inflammatory cell death for therapy. *Pharmacol Ther*. 2022;232.
71. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31–46.
72. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
73. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70.

74. Kreeger L, Duncan A, Cowap J. Psychostimulants used for opioid induced drowsiness. *J Pain Symptom Manage*. 1996;11(1):1–2.
75. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny M V ve ark. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 2012;19(1):107–20.
76. Zaman S, Wang R, Gandhi V. Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(9):1980–92.
77. Lopez J, Tait SWG. Mitochondrial apoptosis: Killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer*. 2015;112:957–62.
78. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1–23.
79. Xu W, Jing L, Wang Q, Lin CC, Chen X, Diao J ve ark. Bax-PGAM5L-Drp1 complex is required for intrinsic apoptosis execution. *Oncotarget*. 2015;6(30):30017–34.
80. Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene*. 2008;27(S1):S2–19.
81. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495–516.
82. Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17(7):395–417.
83. Pfeffer C, Singh A. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):448.
84. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015;16(6):2129–44.
85. Liu H, Su D, Zhang J, Ge S, Li Y, Wang F ve ark. Improvement of Pharmacokinetic Profile of TRAIL via Trimer-Tag Enhances its Antitumor Activity in vivo. *Sci Rep*. 2017;7(1):8953.
86. Yuan J, Kroemer G. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes Dev*. 2010;24(23):2592–602.

87. Halestrap AP, Pasdois P. The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2009;1787(11):1402–15.
88. Ricchelli F, Šileikytė J, Bernardi P. Shedding light on the mitochondrial permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2011;1807(5):482–90.
89. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2016 - Press release - NobelPrize.org [Internet]. 2016 [Erişim Tarihi 2 Haziran 2024]. Erişim Adresi: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2016/press-release/>
90. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(3):460–73.
91. Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;335(1):1–32.
92. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(2):124–31.
93. Towers CG, Thorburn A. Therapeutic Targeting of Autophagy. *EBioMedicine*. 2016;14:15–23.
94. Karakaş HE, Gözüaçık D. Autophagy and cancer. *Turkish Journal of Biology*. 2014;38(6):720–39.
95. Massey A, Kiffin R, Cuervo AM. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(12):2420–34.
96. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*. 2005;12(S2):1542–52.
97. Parzych KR, Klionsky DJ. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(3):460–73.
98. Wirawan E, Berghe T Vanden, Lippens S, Agostinis P, Vandenabeele P. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res*. 2012;22(1):43–61.
99. Lin L, Baehrecke EH. Autophagy, cell death, and cancer. *Mol Cell Oncol*. 2015;2(3):e985913.
100. Goldsmith J, Levine B, Debnath J. Autophagy and Cancer Metabolism. 2014:25–57.
101. Chude C, Amaravadi R. Targeting Autophagy in Cancer: Update on Clinical Trials and Novel Inhibitors. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6):1279.

102. Poillet-Perez L, Despouy G, Delage-Mourroux R, Boyer-Guittaut M. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biol.* 2015;4:184–92.
103. Huang T, Song X, Yang Y, Wan X, Alvarez AA, Sastry N ve ark. Autophagy and Hallmarks of Cancer. *Crit Rev Oncog.* 2018;23(5–6):247–67.
104. Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F ve ark. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.* 2015;34(7):856–80.
105. Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope F. Autophagy modulation for cancer therapy. *Cancer Biol Ther.* 2011;11(2):169–76.
106. Onorati A V., Dyczynski M, Ojha R, Amaravadi RK. Targeting autophagy in cancer. *Cancer.* 2018;124(16):3307–18.
107. Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(9):528–42.
108. Shan, Zheng, Li. The effects of Astragalus Membranaceus Active Extracts on Autophagy-related Diseases. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8):1904.
109. Antunes F, Erustes AG, Costa AJ, Nascimento AC, Bincoletto C, Ureshino RP ve ark. Autophagy and intermittent fasting: the connection for cancer therapy? *Clinics.* 2018;73:e814s.
110. Singh SS, Vats S, Chia AYQ, Tan TZ, Deng S, Ong MS ve ark. Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene.* 2018;37(9):1142–58.
111. Ahmadi-Dehlaghi F, Mohammadi P, Valipour E, Pournaghi P, Kiani S, Mansouri K. Autophagy: A challengeable paradox in cancer treatment. *Cancer Med.* 2023;12(10):11542–69.
112. Chen N, Debnath J. Autophagy and tumorigenesis. *FEBS Lett.* 2010;584(7):1427–35.
113. Liang C, Jung JU. Autophagy genes as tumor suppressors. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(2):226–33.
114. Kisen GØ, Tessitore L, Costelli P, Gordon PB, Schwarze PE, Baccino FM ve ark. Reduced autophagic activity in primary rat hepatocellular carcinoma and ascites hepatoma cells. *Carcinogenesis.* 1993;14(12):2501–5.
115. Gunn JM, Clark MG, Knowles SE, Hopgood MF, Ballard FJ. Reduced rates of proteolysis in transformed cells. *Nature.* 1977;266(5597):58–60.

116. Maiuri MC, Tasdemir E, Criollo A, Morselli E, Vicencio JM, Carnuccio R ve ark. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):87–93.
117. Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio JM, Criollo A, Maiuri MC ve ark. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 2009;1793(9):1524–32.
118. Lee JS, Li Q, Lee JY, Lee SH, Jeong JH, Lee HR ve ark. FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nat Cell Biol.* 2009;11(11):1355–62.
119. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature.* 2006;441(7092):424–30.
120. Das SK. MDA-9/syntenin: a positive gatekeeper of melanoma metastasis. *Frontiers in Bioscience.* 2012;17(1):1.
121. Jin S, White E. Role of Autophagy in Cancer: Management of Metabolic Stress. *Autophagy.* 2007;3(1):28–31.
122. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G ve ark. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2006;10(1):51–64.
123. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(12):961–7.
124. Wang S. The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and TRAIL receptor pathway. *Oncogene.* 2008;27(48):6207–15.
125. Han J, Hou W, Goldstein LA, Lu C, Stolz DB, Yin XM ve ark. Involvement of Protective Autophagy in TRAIL Resistance of Apoptosis-defective Tumor Cells. *Journal of Biological Chemistry.* 2008;283(28):19665–77.
126. Herrero-Martín G, Høyer-Hansen M, García-García C, Fumarola C, Farkas T, López-Rivas A ve ark. TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells. *EMBO J.* 2009;28(6):677–85.
127. White E, DiPaola RS. The Double-Edged Sword of Autophagy Modulation in Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2009;15(17):5308–16.

128. Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(9):726–34.
129. Chen N, Karantza V. Autophagy as a therapeutic target in cancer. *Cancer Biol Ther*. 2011;11(2):157–68.
130. Dutton CJ, Banks BJ, Cooper CB. Polyether ionophores. *Nat Prod Rep*. 1995;12(2):165.
131. Callaway TR, Edrington TS, Rychlik JL, Genovese KJ, Poole TL, Jung YS ve ark. Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. *Curr Issues Intest Microbiol*. 2003;4(2):43–51.
132. Dembitsky VM. Astonishing diversity of natural surfactants: 2. Polyether glycosidic ionophores and macrocyclic glycosides. *Lipids*. 2005;40(3):219–48.
133. Dembitsky VM. Chemistry and Biodiversity of the Biologically Active Natural Glycosides. *Chem Biodivers*. 2004;1(5):673–781.
134. Chekan JR, Fallon TR, Moore BS. Biosynthesis of marine toxins. *Curr Opin Chem Biol*. 2020;59:119–29.
135. Riddell FG. Structure, conformation, and mechanism in the membrane transport of alkali metal ions by ionophoric antibiotics. *Chirality*. 2002;14(2–3):121–5.
136. Vilotijevic I, Jamison T. Synthesis of Marine Polycyclic Polyethers via Endo-Selective Epoxide-Opening Cascades. *Mar Drugs*. 2010;8(3):763–809.
137. Nakanishi K. The chemistry of brevetoxins: A review. *Toxicon*. 1985;23(3):473–9.
138. Vilotijevic I, Jamison TF. Epoxide-Opening Cascades in the Synthesis of Polycyclic Polyether Natural Products. *Angewandte Chemie International Edition*. 2009;48(29):5250–81.
139. Van Dolah FM. Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *Environ Health Perspect*. 2000;108(suppl 1):133–41.
140. Whittle K, Gallacher S. Marine toxins. *Br Med Bull*. 2000;56(1):236–53.
141. Wan X, Yao G, Liu Y, Chen J, Jiang H. Research Progress in the Biosynthetic Mechanisms of Marine Polyether Toxins. *Mar Drugs*. 2019;17(10):594.

142. Satake M. Marine Polyether Compounds. Marine Natural Products. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag; p. 21–51.
143. Hilgenfeld R, Saenger W. Structural chemistry of natural and synthetic ionophores and their complexes with cations. 1982. p. 1–82.
144. Jacqueline I Kroschwitz dan Arza Seidel. Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 27 Volume Set, 5th Edition. Encyclopedia of Chemical Technology. 2004;22(1992):25–8.
145. Antoszczak M, Rutkowski J, Huczyński A. Structure and Biological Activity of Polyether Ionophores and Their Semisynthetic Derivatives. In: Bioactive Natural Products. Wiley; 2014. p. 107–70.
146. Hildebrandt J, Meingassner JG, Mieth H. [Mode of action of the anticoccidial agent septamycine]. Zentralbl Veterinarmed B. 1978;25(3):186–93.
147. Gokel GW. Molecular recognition: receptors for cationic guests. In: Comprehensive Supramolecular Chemistry. 1996.
148. Huczyński A. Polyether ionophores—promising bioactive molecules for cancer therapy. Bioorg Med Chem Lett. 2012;22(23):7002–10.
149. Tartakoff A, Vassali P, Detraz M. Plasma cell immunoglobulin secretion. Arrest is accompanied by alterations the golgi complex. J Exp Med. 1977;146(5):1332–45.
150. Ohkuma S, Poole B. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1978;75(7):3327–31.
151. Boya P, González-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N ve ark. Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis. Mol Cell Biol. 2005;25(3):1025–40.
152. Lim J, Lee Y, Kim HW, Rhyu IJ, Oh MS, Youdim MBH ve ark. Nigericin-induced Impairment of Autophagic Flux in Neuronal Cells Is Inhibited by Overexpression of Bak. Journal of Biological Chemistry. 2012;287(28):23271–82.
153. Choi HS, Jeong EH, Lee TG, Kim SY, Kim HR, Kim CH. Autophagy Inhibition with Monensin Enhances Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induced by mTOR or Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors in Lung Cancer Cells. Tuberc Respir Dis (Seoul). 2013;75(1):9.

154. Yoon MJ, Kang YJ, Kim IY, Kim EH, Lee JA, Lim JH ve ark. Monensin, a polyether ionophore antibiotic, overcomes TRAIL resistance in glioma cells via endoplasmic reticulum stress, DR5 upregulation and c-FLIP downregulation. *Carcinogenesis*. 2013;34(8):1918–28.
155. Sulik M, Maj E, Wietrzyk J, Huczyński A, Antoszczak M. Synthesis and Anticancer Activity of Dimeric Polyether Ionophores. *Biomolecules* 2020, Vol 10.
156. Huczyński A, Rutkowski J, Borowicz I, Wietrzyk J, Maj E, Brzezinski B. One-pot synthesis and cytotoxicity studies of new Mannich base derivatives of polyether antibiotic - Lasalocid acid. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(18):5053–6.
157. Kim KY, Kim SH, Yu SN, Park SG, Kim YW, Nam HW ve ark. Lasalocid induces cytotoxic apoptosis and cytoprotective autophagy through reactive oxygen species in human prostate cancer PC-3 cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2017;88:1016–24.
158. Ketola K, Vainio P, Fey V, Kallioniemi O, Iljin K. Monensin is a potent inducer of oxidative stress and inhibitor of androgen signaling leading to apoptosis in prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(12):3175–85.
159. Vanneste M, Huang Q, Li M, Moose D, Zhao L, Stamnes MA ve ark. High content screening identifies monensin as an EMT-selective cytotoxic compound. *Sci Rep*. 2019;9(1).
160. Park WH, Seol JG, Kim ES, Kang WK, Im YH, Jung CW ve ark. Monensin-mediated growth inhibition in human lymphoma cells through cell cycle arrest and apoptosis. *Br J Haematol*. 2002;119(2):400–7.
161. Wang X, Wu X, Zhang Z, Ma C, Wu T, Tang S ve ark. Monensin inhibits cell proliferation and tumor growth of chemo-resistant pancreatic cancer cells by targeting the EGFR signaling pathway. *Sci Rep*. 2018;8(1).
162. Derbyshire E, Henry R, Stahel R, Wawrzynczak E. Potent cytotoxic action of the immunotoxin SWA11-ricin A chain against human small cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer*. 1992;66(3):444–51.
163. Colombatti M, Dell’Arciprete L, Chignola R, Tridente G. Carrier protein-monensin conjugates: enhancement of immunotoxin cytotoxicity and potential in tumor treatment. *Cancer Res*. 1990;50(5):1385–91.
164. Wood DJT, Rumsby MG, Warr JR. Monensin and verapamil do not alter intracellular localisation of daunorubicin in multidrug resistant human KB cells. *Cancer Lett*. 1996;108(1):41–7.

165. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, ve ark. Identification of Selective Inhibitors of Cancer Stem Cells by High-Throughput Screening. *Cell*. 2009;138(4):645–59.
166. Naujokat. Salinomycin in cancer: A new mission for an old agent. *Mol Med Rep*. 2010;3(4).
167. Fuchs D, Daniel V, Sadeghi M, Opelz G, Naujokat C. Salinomycin overcomes ABC transporter-mediated multidrug and apoptosis resistance in human leukemia stem cell-like KG-1a cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;394(4):1098–104.
168. Wang Y. Effects of Salinomycin on Cancer Stem Cell in Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells. *Med Chem (Los Angeles)*. 2011;7(2):106–11.
169. Dong TT, Zhou HM, Wang LL, Feng B, Lv B, Zheng MH. Salinomycin Selectively Targets ‘CD133+’ Cell Subpopulations and Decreases Malignant Traits in Colorectal Cancer Lines. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(6):1797–804.
170. Kim KY, Yu SN, Lee SY, Chun SS, Choi YL, Park YM ve ark. Salinomycin-induced apoptosis of human prostate cancer cells due to accumulated reactive oxygen species and mitochondrial membrane depolarization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;413(1):80–6.
171. Kim J, Chae M, Kim WK, Kim Y, Kang HS, Kim HS ve ark. Salinomycin sensitizes cancer cells to the effects of doxorubicin and etoposide treatment by increasing DNA damage and reducing p21 protein. *Br J Pharmacol*. 2011;162(3):773–84.
172. Zhang GN, Liang Y, Zhou LJ, Chen SP, Chen G, Zhang TP ve ark. Combination of salinomycin and gemcitabine eliminates pancreatic cancer cells. *Cancer Lett*. 2011;313(2):137–44.
173. Naujokat C, Steinhart R. Salinomycin as a drug for targeting human cancer stem cells. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012.
174. Antoszczak M. A medicinal chemistry perspective on salinomycin as a potent anticancer and anti-CSCs agent. *Eur J Med Chem*. 2019;164:366–77.
175. Hoshi M, W. Shimotohno K, Endo T, Furihata K, Seto H. Microbial and Chemical Conversion of Antibiotic K-41. I. Isolation and Identification of Conversion Product. *J Antibiot (Tokyo)*. 1997;50(7):631–4.
176. SH-SY5Y - CRL-2266 | ATCC [Internet]. [Erişim Tarihi 2024 Haziran 23]. Erişim Adresi: <https://www.atcc.org/products/crl-2266>

177. Leibniz Institute DSMZ: Details [Internet]. [Erişim Tarihi 23 Haziran 2024]. Erişim Adresi: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-355>
178. Absher M. Hemocytometer Counting. *Tissue Culture Methods and Applications* 1973;395-397.
179. Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Front.* 2020;1(3):332–49.
180. Zhang D, Li X, He X, Xing Y, Jiang B, Xiu Z ve ark. Protective Effect of Flavonoids against Methylglyoxal-Induced Oxidative Stress in PC-12 Neuroblastoma Cells and Its Structure–Activity Relationships. *Molecules.* 2022;27(22):7804.
181. Shen GY, Shin JH, Song YS, Joo HW, Park IH, Seong JH ve ark. Role of Autophagy in Granulocyte-Colony Stimulating Factor Induced Anti-Apoptotic Effects in Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes Metab J.* 2021;45(4):594.
182. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 2000;132:365–86.
183. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(12):e103.
184. Udvardi MK, Czechowski T, Scheible WR. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell.* 2008;20(7):1736–7.
185. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods.* 2001;25(4):402–8.
186. Klenke S, Akdeli N, Stelmach P, Heukamp L, Schulte JH, Bachmann HS. The small molecule Bcl-2/Mcl-1 inhibitor TW-37 shows single-agent cytotoxicity in neuroblastoma cell lines. *BMC Cancer.* 2019;19(1).
187. Wan W, Zhang X, Huang C, Chen L, Yang X, Bao K ve ark. Monensin inhibits glioblastoma angiogenesis via targeting multiple growth factor receptor signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;530(2):479–84.
188. Brizzolara A, Garbati P, Vella S, Calderoni M, Quattrone A, Tonini GP, ve ark. Co-Administration of Fendiline Hydrochloride Enhances Chemotherapeutic Efficacy of Cisplatin in Neuroblastoma Treatment. *Molecules.* 2020;25(22).

189. Gown AM, Willingham MC. Improved Detection of Apoptotic Cells in Archival Paraffin Sections: Immunohistochemistry Using Antibodies to Cleaved Caspase 3. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2002;50(4):449–54.
190. Bodey B, Bodey V, Siegel SE, Nasir A, Coppola D, Hakam A ve ark. Immunocytochemical detection of members of the caspase cascade of apoptosis in high-grade astrocytomas. *In Vivo*. 2004;18(5):593–602.
191. Bressenot A, Marchal S, Bezdetnaya L, Garrier J, Guillemain F, Plénat F. Assessment of apoptosis by immunohistochemistry to active caspase-3, active caspase-7, or cleaved PARP in monolayer cells and spheroid and subcutaneous xenografts of human carcinoma. *J Histochem Cytochem*. 2009;57(4):289–300.
192. Martinet W, Roth L, De Meyer G. Standard Immunohistochemical Assays to Assess Autophagy in Mammalian Tissue. *Cells*. 2017;6(3):17.
193. Nolan JC, Frawley T, Tighe J, Soh H, Curtin C, Piskareva O. Preclinical models for neuroblastoma: Advances and challenges. *Cancer Lett*. 2020;474:53–62.
194. R. D. Lillie. *Histopathologic technic and practical histochemistry*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill.; 1965.
195. Kim SW, Roh J, Park CS. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *J Pathol Transl Med*. 2016;50(6):411–8.
196. White E. The role for autophagy in cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 2015;125(1):42–6.
197. Rabinowitz JD, White E. Autophagy and Metabolism. *Science* (1979). 2010;330(6009):1344–8.
198. Grinde B. Effect of carboxylic ionophores on lysosomal protein degradation in rat hepatocytes. *Exp Cell Res*. 1983;149(1):27–35.
199. Bhattacharjee S, Sullivan MJ, Wynn RR, Demagall A, Hendrix AS, Sindhvani P ve ark. PARP inhibitors chemopotentiate and synergize with cisplatin to inhibit bladder cancer cell survival and tumor growth. *BMC Cancer*. 2022;22(1):312.
200. Michels J, Vitale I, Senovilla L, Enot DP, Garcia P, Lissa D, ve ark. Synergistic interaction between cisplatin and PARP inhibitors in non-small cell lung cancer. *Cell Cycle*. 2013;12(6):877–83.

201. Michels J, Vitale I, Galluzzi L, Adam J, Olaussen KA, Kepp O ve ark. Cisplatin Resistance Associated with PARP Hyperactivation. *Cancer Res.* 2013;73(7):2271–80.
202. He M, Fu Y, Yan Y, Xiao Q, Wu H, Yao W ve ark. The Hedgehog signalling pathway mediates drug response of MCF-7 mammosphere cells in breast cancer patients. *Clin Sci.* 2015;129(9):809–22.
203. Wang F, He L, Dai WQ, Xu YP, Wu D, Lin CL ve ark. Salinomycin Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma Cells In Vitro and In Vivo. *PLoS One.* 2012;7(12):e50638.
204. Wu D, Zhang Y, Huang J, Fan Z, Shi F, Wang S. Salinomycin inhibits proliferation and induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cell in vitro and suppresses tumor growth in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;443(2):712–7.
205. Li T, Liu X, Shen Q, Yang W, Huo Z, Liu Q ve ark. Salinomycin exerts anti-angiogenic and anti-tumorigenic activities by inhibiting vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis. *Oncotarget.* 2016;7(18):26580–92.
206. Mao J, Fan S, Ma W, Fan P, Wang B, Zhang J ve ark. Roles of Wnt/ β -catenin signaling in the gastric cancer stem cells proliferation and salinomycin treatment. *Cell Death Dis.* 2014;5(1):e1039–e1039.
207. Deng CC, Liang Y, Wu MS, Feng FT, Hu WR, Chen LZ ve ark. Nigericin selectively targets cancer stem cells in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(9):1997–2006.
208. Clemente N, Baroni S, Fiorilla S, Tasso F, Reano S, Borsotti C ve ark. Boosting intracellular sodium selectively kills hepatocarcinoma cells and induces hepatocellular carcinoma tumor shrinkage in mice. *Commun Biol.* 2023;6(1):574.
209. Megías-Vericat JE, Martínez-Cuadrón D, Sanz MÁ, Poveda JL, Montesinos P. Daunorubicin and cytarabine for certain types of poor-prognosis acute myeloid leukemia: a systematic literature review. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2019;12(3):197–218.
210. Antolín S, Acea B, Albaina L, Concha Á, Santiago P, García-Caballero T. ve ark. Primary systemic therapy in HER2-positive operable breast cancer using trastuzumab and chemotherapy: efficacy data, cardiotoxicity and long-term follow-up in 142 patients diagnosed from 2005 to 2016 at a single institution. *Breast Cancer (Dove Med Press).* 2019;11:29–42.

8. EKLER

8.1. Ek 1. Etik Kurul Raporu

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

35340 İnciraltı İzmir-232 4122234

Gündem No/Toplantı No/Yıl : 03/15/2021
Toplantı Tarihi : 29 Eylül 2021

Sayın, Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN
DEÜ Tıp Fakültesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı

52/2021 Protokol No'lu; Yürütücüsü olduğunuz "Polieter İyonoforların Nöroblastomda Potansiyel Anti-kanser Etkilerinin İncelenmesi " isimli, Gamze SANLAV, Güner YAMAN, Zekiye ALTUN, Safiye AKTAŞ, Osman YILMAZ, Erdal BEDİR'in araştırmacı olduğu, 40 adet 5-7 haftalık erkek nude fare talep edilen projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı (Araştırmacı)	Prof.Dr.Nezan İMERAL HARZADIN
Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN Üye	Prof.Dr.Hatice Nur OLGUN Üye (Araşt
Prof.Dr.Nergiz GURMİNE ÇETPİDELER	Prof.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Prof.Dr.Gamze ÇAPA KAYA Üye	Prof.Dr.Çetin PERÇETİN Üye
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK Üye	Prof.Dr.Pınar AKAN Ü
Dr.Öğr. Sevinç KANDİŞ Üye	Doç.Dr. Kadri KULUALP İ
Öğr.Gör. Aslı ÇELİK	Vet.Hekim Anıta SERBEN
Behra KINAM Üye	

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

8.2. Ek.2 Özgeçmiş



GAMZE SANLAV

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

26 Şubat 2019 - Şu Anda (5 yıl 6 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TEMEL ONKOLOJİ (DR)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.89 / 4.0

24 Ağustos 2010 - 25 Mayıs 2015 (4 yıl 10 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
ECZACILIK FAKÜLTESİ, ECZACILIK PR. (İNGİLİZCE) (TAM BURLU)
Diploma Numarası: 15.22
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.36 / 4.0

Yabancı Dil Bilgileri

İSPANYOLCA (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Dahili Tıp Bilimleri -- İç Hastalıkları -- Onkoloji

Sağlık Bilimleri -- Eczacılık -- Eczacılık Teknolojisi -- Farmasötik Biyoteknoloji

Sağlık Bilimleri -- Eczacılık -- Temel Eczacılık Bilimleri -- Eczacılık Temel Bilimleri

Ar-Ge Yetkinlik

Kitaplar

G. SANLAV, Programlı Hücre Ölümü ve Tipleri - Anoikis, H. S. VATANSEVER & A. S. KOÇTÜRK [Editörler], HÖAD - Hastalıkta ve Sağıkta Hücre Ölümü , TÜRKİYE: Manisa Celal Bayar Üniversitesi Basımevi, 21 Eylül 2022, Kitapta Bölüm.

Makaleler

S. H. ÖZŞENGİZER, Z. S. ALTUN, G. SANLAV, B. BARAN, D. KIZMAZOĞLU, S. AKTAŞ, P. KESKİNOĞLU & N. ÖLGÜN, Investigation of YAP-1, OTX-2, and nestin protein expressions in neuroblastoma: a preliminary study, *ANNALS OF CLINICAL AND TRANSLATIONAL NEUROLOGY*, 2024, 2328-9503, null, 13.

G. SANLAV, B. BARAN, S. H. ÖZŞENGİZER, D. KIZMAZOĞLU, Z. ALTUN, S. AKTAŞ & N. ÖLGÜN, S-100 and MATH-1 Protein Expressions Can Be Useful for the Prediction of Clinical Outcome in Neuroblastoma Patients, *JOURNAL OF PEDIATRIC HEMATOLOGY ONCOLOGY*, 2024, 1077-4114, 46, 1, 8.

B. BARAN, G. SANLAV, D. KIZMAZOĞLU, S. H. ÖZŞENGİZER, S. AKTAŞ, Z. ALTUN & N. ÖLGÜN, Comparing Tribbles Homolog 3 (TRIB3) Protein Expression Levels with Clinicopathological Characteristics and Survival Among Neuroblastoma Patients, *CLINICAL MEDICINE INSIGHTS-ONCOLOGY*, 2023, 1179-5549, 17, 8.

S. KUM ÖZŞENGİZER, G. SANLAV, B. BARAN, S. AKTAŞ, Z. ALTUN, D. KIZMAZOĞLU, H. N. ÖLGÜN & T. Ç. AKTAŞ, INVESTIGATION OF THE POTENTIAL EFFECTS OF YAP-1 AND NESTIN ON RISK CLASSES AND PROGNOSIS IN NEUROBLASTOMA, *Journal of Advanced Research in Health Sciences*, 2022, 2651-4060, 5, 1, 60-60.

B. BARAN, G. SANLAV, S. KUM ÖZŞENGİZER, D. KIZMAZOĞLU, S. AKTAŞ, Z. ALTUN & H. N. ÖLGÜN, ANALYSIS OF TRIBBLES HOMOLOG 3 (TRIB3) EXPRESSION LEVELS IN NEUROBLASTOMA: PRELIMINARY STUDY, *Journal of Advanced Research in Health Sciences*, 2022, 2651-4060, 5, 1, 56-56.

G. SANLAV, B. BARAN, S. KUM ÖZŞENGİZER, D. KIZMAZOĞLU, Z. ALTUN, S. AKTAŞ & H. N. ÖLGÜN, S-100 PROTEIN EXPRESSION LEVELS AS A POTENTIAL PROGNOSTIC MARKER IN NEUROBLASTOMA, *Journal of Advanced Research in Health Sciences*, 2022, 2651-4060, 5, 1, 55-55.

M. E. ARAYICI, G. SANLAV, S. YILMAZ, H. H. ÖZDEMİR, Y. BAŞBİNAR & H. ELİDOĞUZ, NUTRITION AND MICRONUTRIENTS IN CANCER PATIENTS POSITIVE FOR COVID-19, *Journal of Basic and Clinical Health Sciences*, 2021, 2458-8038, 5, 3, 233- 239.

G. SANLAV, A Review on The Development, Production Strategies, and Utilization of Monoclonal Antibodies, *J Basic Clin Health Sci*, 2020, 2564-7288, 4, 3, 197-204.

S. KUM ÖZŞENGİZER, G. SANLAV, Z. ALTUN & N. ÖLGÜN, NÖROBLASTOMDA HIPPO SINYAL YOLAĞI BİLEŞENİ YAPININ İNHİBSİYONU, *Sözlü Sunum*, XXXI. ULUSAL PEDIATRİK KANSER KONGRESİ, 17 Nisan 2024, 21 Nisan 2024.

G. SANLAV, S. KUM ÖZŞENGİZER, Z. ALTUN, E. BEDİR, N. ÖLGÜN & S. AKTAŞ, POLİETER İYONOFOR MOLEKÜL KİTİA NÖROBLASTOMDA POTANSİYEL ANTI-TÜMÖRAL ETKİNLİĞİNİ HÜCRE ÖLÜM YOLAKLARINI MODÜLE EDEREK ORTAYA ÇIKARIR, *Sözlü Sunum*, XXXI. ULUSAL PEDIATRİK KANSER KONGRESİ, 17 Nisan 2024, 21 Nisan 2024.

G. SANLAV, MATH-1 protein expression levels in neuroblastoma may be a predictive factor for risk stratification, *Poster Sunumu*, 55th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, 11 Ekim 2023, 14 Ekim 2023.

G. SANLAV, B. BARAN, S. KUM ÖZŞENGİZER, Z. ALTUN, N. ÖLGÜN, S. AKTAŞ & D. KIZMAZOĞLU, ANALYSIS OF TRIBBLES HOMOLOG 3 (TRIB3) EXPRESSION LEVELS IN NEUROBLASTOMA: PRELIMINARY STUDY, *Poster Sunumu*, 1st International Basic Oncology Congress, 02 Haziran 2022, 04 Haziran 2022.

Bildiriler

S. KUM ÖZŞENGEZER, G. SANLAV, N. OLGUN, D. KIZMAZOĞLU, Z. ALTUN & S. AKTAŞ, INVESTIGATION OF THE POTENTIAL EFFECTS OF YAP-1 and NESTIN ON RISK CLASSES AND PROGNOSIS IN NEUROBLASTOMA, Poster Sunumu, 1st International Basic Oncology Congress, 02 Haziran 2022, 04 Haziran 2022.

G. SANLAV, Z. ALTUN, B. BARAN, S. KUM ÖZŞENGEZER, N. OLGUN, D. KIZMAZOĞLU & S. AKTAŞ, 5-100 Protein Expression Levels as a Potential Prognostic Marker in Neuroblastoma, Poster Sunumu, 1st International Basic Oncology Congress, 02 Haziran 2022, 04 Haziran 2022.

G. SANLAV, Nöroblastomda Ferroptotik Hücre Ölümü ve Tedavi Hedeflerinin Değerlendirilmesi, 5286 Sunum, 9. ONKOLOJİDE ARAŞTIRMALAR SEMPOZYUMU, 12 Kasım 2021, 13 Kasım 2021.

G. SANLAV, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, S. ÖKMEK & S. AKTAŞ, EPİTELİYAL OVER KANSER HÜCRELERİNDE SİLMAİRİNİN DNA HASARI VE HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI, Poster Sunumu, 22. EGE ONKOLOJİ GÜNLERİ SEMPOZYUMU, 26 Şubat 2020, 28 Şubat 2020.

Projeler

TEMEL ARAŞTIRMA, PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ, Polietilen İyoneforların Nöroblastomda Potansiyel Anti-kanser Etkilerinin İncelenmesi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK (Sistemde hayati olmayan kuruluş) (Yurt İçi) (Devam ediyor).

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

BİDEB Destekleri

GAMZE SANLAV, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı, Destekleniyor, 2021 - 2, 01.10.2021 - 30.02.2025.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Görev	ARDİEB	BİDEB	BİLİM TOPLUM	UİDB	TEYDEB	Toplam
Hakemlik/Panelistlik/Öğ. Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Moderatörlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Raportörlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
Katılmadığı Panelistlik/Öğ. Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0

8.3. Ek.3. Tezle İlişkili Araştırma Makaleleri

- 1) İlk isim yayın (SCI-expanded): Sanlav G, Baran B, Kum Özşengezer S, Kızmazoğlu, D, Altun Z, Aktaş S, Olgun N. S-100 and MATH-1 Protein Expressions Can Be Useful for the Prediction of Clinical Outcome in Neuroblastoma Patients. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 46(1):21-28.

ORIGINAL ARTICLES

S-100 and MATH-1 Protein Expressions Can Be Useful for the Prediction of Clinical Outcome in Neuroblastoma Patients

Sanlav, Gamze PhD^{*}; Baran, Burçin MSc, PhD^{*}; Kum Özşengezer, Selen MSc, PhD^{*}; Kızmazoğlu, Deniz MD, PhD^{*}; Altun, Zekiye MD, PhD^{*}; Aktaş, Safiye MD, PhD^{*}; Olgun, Nur MD^{*}

Author Information 

Journal of Pediatric Hematology/Oncology 46(1):p 21-28, January 2024. | DOI: 10.1097/MPH.0000000000002783

BUY

SDC

 Metrics

Abstract

Neuroblastoma (NB) is the most frequent extracranial solid tumor of childhood, remarkable for its broad spectrum of clinical behavior. This diversity in behavior correlates closely with defined clinical and biological features and combinations of prognostic variables are used for risk-group assignment. S-100 proteins have roles in differentiation and were shown to be frequently dysregulated in NB. MATH-1 protein plays role in neuronal cell differentiation through development. However, up to date, there are no studies evaluating the relationship between MATH-1 and NB. Grb2-associated binding (Gab) proteins have roles in the regulation of cell growth and differentiation. Gab1 was reported to be related to poor survival of high-risk NB patients. The aim of this study was to investigate the relationship between differentiation-related S-100, MATH-1, and Gab1 proteins and risk group and/or stages of NB. A significant relation was found between S-100 and early stages of NB. This study also revealed a significant association between MATH-1 and low-risk groups. S-100 and MATH-1 were also shown to provide survival advantages among stages and risk groups. The findings of this study support the assumption that S-100 and MATH-1 can be potential prognostic biomarkers for staging and risk-group assignment of NB patients. These proteins can be useful tools for clinicians to guide through treatment options, especially for the evaluation of tumor differentiation.

JOURNAL OF PEDIATRIC HEMATOLOGY ONCOLOGY

[Share This Journal](#)

ISSN / eISSN **1077-4114 / 1536-3678**

Publisher **LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, TWO COMMERCE SQ, 2001 MARKET ST, PHILADELPHIA, USA, PA, 19103**

General Information

Journal Website	Visit Site	Publisher Website	Visit Site
1st Year Published	1995	Frequency	Bi-monthly
Issues Per Year	8	Country / Region	UNITED STATES OF AMERICA
Primary Language	English		

Web of Science Coverage

Collection	Index	Category	Similar Journals ¹
Core Collection	Science Citation Index Expanded (SCIE)	Hematology Pediatrics Oncology	Find Similar Journals
Current Contents	Clinical Medicine	Pediatrics	Find Similar Journals
Other	Essential Science Indicators	Clinical Medicine	Find Similar Journals

- 2) Baran B, Sanlav G, Kızmazoğlu D, Kum Özşengezer S, Aktaş S, Altun Z, Olgun N. Comparing Tribbles Homolog 3 (TRIB3) Protein Expression Levels with Clinicopathological Characteristics and Survival Among Neuroblastoma Patients. *Clinical Medicine Insights: Oncology*.



Comparing Tribbles Homolog 3 (TRIB3) Protein Expression Levels with Clinicopathological Characteristics and Survival Among Neuroblastoma Patients

Burçin Baran¹, Gamze Sanlav¹, Deniz Kızmazoğlu², Selen Kum Özşengezer¹, Safiye Aktaş¹, Zekiye Altun¹ and Nur Olgun²

¹Department of Basic Oncology, Institute of Oncology, Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey.

²Department of Pediatric Oncology, Institute of Oncology, Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey.

Clinical Medicine Insights: Oncology
Volume 17: 1–8
© The Author(s) 2023
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/11796549231199926



ABSTRACT

BACKGROUND: Tribbles Homolog 3 (TRIB3) is a member of the pseudokinase family of tribbles and acts as an adaptor protein to regulate different cellular processes. Upregulation of TRIB3 expression was shown either as a favorable or an adverse prognostic factor in various adult malignancies. However, TRIB3 expression has not been examined in pediatric cancers. Neuroblastoma is the most common malignant solid tumor of childhood, which affects mostly children under 5 years old. Risk stratification of patients defined by International Neuroblastoma Risk Group was used to determine prognosis and treatment of the disease. This study aimed to examine the relationship between TRIB3 protein expression levels and clinicopathological features and survival of patients.

METHODS: TRIB3 protein expression was analyzed using immunohistochemical staining on formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples of neuroblastoma patients (n=56). Survival analyses were performed with Kaplan-Meier method and log-rank tests. Association between TRIB3 expression and clinicopathological characteristics were analyzed with Spearman's correlation.

RESULTS: Of the patients, 32.1% were in the low-risk group, 21.4% in the medium-risk group, and 46.4% in the high-risk group. Survival analysis was performed in the entire neuroblastoma patient group and sub-risk groups of neuroblastoma patients. In the entire patient group, there was no significant difference in overall survival ($P=.202$) and event-free survival ($P=.172$) between TRIB3-positive and -negative patients. However, when survival analyses were performed in each risk group, TRIB3 expression was significantly associated with higher overall survival ($P=.034$) and event-free survival ($P=.032$) in low-risk group neuroblastoma patients. Nevertheless, no association was found between TRIB3 expression and overall survival ($P=.799$) and event-free survival ($P=.448$) in high-risk neuroblastoma patients. Furthermore, a significant correlation was identified between 1p36 loss-of-heterozygosity and TRIB3 expression ($P=.030$). However, TRIB3 expression did not correlate with other clinicopathological features.

CONCLUSION: TRIB3 expression is a potential predictive biomarker for low-risk neuroblastoma patients.

KEYWORDS: Neuroblastoma, TRIB3, prognosis, biomarker, survival

RECEIVED: April 28, 2023. ACCEPTED: August 10, 2023.

TYPE: Original Research Article

FUNDING: The author(s) disclosed the receipt of the following financial support for the research and the researchers participating in this study: Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) 2214-A program (Term:2018/2, Grant No:1050B141801571) and Dokuz Eylül University (İzmir, Turkey) (Grant No:2021.KB.SAG.044).

DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS: The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Journal indexing and metrics



Impact metrics

The following citation metrics are produced by abstracting and indexing databases using their respective datasets. These metrics represent a variety of methods for measuring the citation impact of published research on a journal level.

Journal Citation Reports



Scopus



Google Scholar



Sources: Journal Citation Reports from Clarivate, 2023, Scopus®, 2022 release and Google Scholar.



Readership

Full Text Usage

97,923

Full text usage is the sum of PDF and HTML downloads from the journal platform during the prior calendar year.



Abstracting and indexing

This journal is included in the following abstracting and indexing databases.

- Clarivate Analytics: Current Contents - Life Sciences
- Clarivate Analytics: Science Citation Index Expanded (SCIE)
- Directory of Open Access Journals (DOAJ)
- EBSCO
- PubMed Central (PMC)
- Scopus

- 3) Kum Özşengezer S, Altun Z, Sanlav G, Baran B, Kızmazoğlu D, Aktaş S, Keskinöğlu P, Olgun N. Investigation of YAP-1, OTX-2, and nestin protein expressions in neuroblastoma: a preliminary study (2024). *Annals of Clinical and Translational Neurology*.

Check for updates

ANNALS
of Clinical and Translational Neurology

Open Access

 AMERICAN
NEUROLOGICAL
ASSOCIATION
PUBLISHED FOR YOU

RESEARCH ARTICLE

Investigation of YAP-1, OTX-2, and nestin protein expressions in neuroblastoma: a preliminary study

Selen Kum Özşengezer¹ , Zekiye Sultan Altun¹ , Gamze Sanlav¹ , Burçin Baran¹ , Deniz Kızmazoğlu^{2,3} , Safiye Aktaş¹ , Pembe Keskinöğlu⁴  & Nur Olgun^{2,3} 

¹Department of Basic Oncology, Oncology Institute, Dokuz Eylül University, Izmir, Turkey
²Department of Clinical Oncology, Institute of Oncology, Dokuz Eylül University, Izmir, Turkey
³Department of Pediatric Oncology, Institute of Oncology, Dokuz Eylül University, Izmir, Turkey
⁴Department of Basic Medical Sciences, Department of Biostatistics and Medical Informatics, Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University, Izmir, Turkey

Correspondence
Selen Kum Özşengezer, Department of Basic Oncology, Oncology Institute, Dokuz Eylül University, Izmir, Turkey

Received: 9 February 2024; Revised: 29 May 2024; Accepted: 9 June 2024

Annals of Clinical and Translational Neurology 2024; 11(8): 2153–2165

doi: 10.1002/acn3.52136

Abstract

Objectives: Neuroblastoma is the most common extracranial solid tumor in childhood. YAP (Yes-associated protein) is a highly expressed protein in NB. Nestin is an important marker of neuronal differentiation in NB. Orthodenticle homeobox (OTX) is a transcription factor and is overexpressed in blastoma-derived tumors. The aim of this study was to examine the potential roles of YAP-1, Nestin, and OTX-2 proteins in prognosis and risk stratification in neuroblastoma. **Methods:** Tumor sections of 56 patients with different NB risk groups were analyzed. YAP-1, Nestin, and OTX-2 protein expression levels were evaluated by immunohistochemical staining in NB patient tissue samples. **Results:** YAP-1, Nestin, and OTX-2 protein expression levels were evaluated together with the clinical findings of NB patients. YAP-1 was expressed in 18% of all tissues, while Nestin was expressed in 20.4%. OTX-2 protein expression was found in 41.1% of the NB patients. YAP-1 was expressed in 26.9% of high-risk and 11.5% of low-risk patients. Nestin was expressed in 24.4% high-risk and 33.3% low-risk patients. OTX-2 was expressed in 68.2% high-risk and 60% low-risk patients. YAP-1 was shown to provide survival advantages among risk groups. **Interpretation:** The findings of this study support that YAP-1 may be a potential prognostic biomarker for staging and risk-group assignment of NB patients. YAP-1 expression in neuroblastoma is associated with significantly poorer survival probabilities and should be considered as a potential therapeutic target. OTX-2 is a promising predictive biomarker candidate, but its mechanisms need further investigation in neuroblastoma, as nestin expression is not significantly linked to patient survival.

Introduction

Neuroblastoma (NB) is the most common and deadliest extracranial solid tumor, accounting for 15% of all cancer-related deaths in childhood.¹ The median age of appearance of neuroblastoma is approximately 19 months. Most of the patients are diagnosed within the first 5 years.² Clinically, it can occur as a primary tumor anywhere in the sympathetic nervous system that occurs in the adrenal medulla.³ While primary adrenal tumors may occur as a mass in the abdomen, tumors originating from sympathetic nerve roots may present with symptoms that vary according to the region of origin.⁴ Approaches to risk and treatment stratification for NB lead to mild therapy for low- and intermediate-risk patients and improved outcomes for all patients. Different clinical manifestations such as spontaneous regression, metastatic and resistant disease may occur in NB. The International Neuroblastoma Staging System (INSS) has been developed to provide a common system for staging patients with NB for clinical and biological studies worldwide.^{5,6} Since the aggressive surgical approach can significantly alter the INSS disease stage, an alternative approach based on clinical evaluation and imaging and independent of

© 2024 The Author(s). *Annals of Clinical and Translational Neurology* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of American Neurological Association. This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2153

ISSN / eISSN **2328-9503**
 Publisher **WILEY, 111 RIVER ST, HOBOKEN, USA, NJ, 07030-5774**

General Information

Society or Institution	ANA American Neurological Association	Journal Website	Visit Site
Publisher Website	Visit Site	1st Year Published	2013
Frequency	Monthly	Issues Per Year	12
Country / Region	UNITED STATES OF AMERICA	Primary Language ⓘ	English
Avg. Number of Weeks from Submission to Publication ⓘ	8	Article DOIs ⓘ	Yes

Web of Science Coverage

Collection	Index	Category	Similar Journals ⓘ
Core Collection	Science Citation Index Expanded (SCIE)	Clinical Neurology Neurosciences	Find Similar Journals
Other	Essential Science Indicators	Clinical Medicine Neuroscience & Behavior	Find Similar Journals

8.4. Ek 4. Tezle İlişkili Bildiriler

SÖZEL BİLDİRİLER

45

[S-09]

POLİETER İYONOFOR MOLEKÜL K41A NÖROBLASTOMDA POTANSİYEL ANTI-TÜMÖRAL ETKİNLİĞİNİ HÜCRE ÖLÜM YOLAKLARINI MODÜLE EDEREK ORTAYA ÇIKARIR

GAMZE SANLAY¹, ZEKİYE ALTUN¹, SELEN KUM ÖZŞENGEZER¹, SAFİYE AKTAŞ¹, ERDAL BEDİR², NUR OLGUN³

1 DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ TEMEL ONKOLOJİ AD, İNCİRALTI, İZMİR
2 İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ, MÜHENDİSLİK FAKÜLTESİ, BİYOMÜHENDİSLİK BÖLÜMÜ, URLA, İZMİR
3 DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ PEDIATRİK ONKOLOJİ AD, İNCİRALTI, İZMİR

Amaç: Nöroblastom çocuklarda görülen en sık görülen ekstraskeletal solid tümördür. Yüksek risk grubu hastalarda uygulanan yoğun kemoterapiye rağmen tedavi yanıtı ve sağkalım oranları oldukça düşüktür. Polietar bileşikler, doğal poliketidlerin geniş bir sınıfına ait olan güçlü antimikrobiyal ve antikanser ajanlardır. Bu çalışmanın amacı Streptomyces cacaoiden izole edilen polietar iyonofor metabolit olan K41-A'nın nöroblastomda potansiyel anti-kanser etkilerini hem in-vitro hem de in-vivo düzeyde inceleyerek bu süreçte etkili olan hücre ölüm mekanizmalarını aydınlatmaktır.

Gereç-Yöntem: N-MYC ekspresyon etmeyen ve eden SH-SY5Y ve KELLY insan kökenli nöroblastom hücre hatları kültüre edilerek bu hücrelere K41A, sisplatin ve kombinasyonu uygulanmıştır. WST-1 hücre canlılık testi ile ajanlara ait IC50 dozları belirlenerek, hücrelerdeki apoptotik, nekroptotik ve otofajik hücre ölümü üzerine etkileri akış sitometrik ve RT-PCR aracılığı değerlendirilmiştir. KELLY hücreleri ile nude farelerde nöroblastom ksenograft tümör modeli oluşturularak, anti-tümör etkinlikler tümör büyüklüğü ve büyüme hızı üzerinden analiz edilmiştir.

Bulgular: Ajanların nöroblastom hücrelerinde hücre canlılık analizleri sonucunda IC50 dozları belirlenmiştir. SHSY-5Y hücrelerinde K41A hem tek başına hem de sisplatin ile birlikte uygulandığında nekroptotik hücre ölümünü kontrol grubuna göre artırmıştır. KELLY hücrelerinde ise K41A tek başına apoptotik hücre oranını artırırken, sisplatin ile birlikte uygulandığında ise nekroptotik hücre oranı daha fazla düzeyde ortaya çıkmıştır. Ayrıca, her iki hücre hattında da K41A kontrol grubuna göre otofaji oranını azaltmış ve sisplatin ile indüklenen otofajiyi de inhibe etmiştir. K41A uygulamasına bağlı olarak apoptotik (Caspase-3,-8,-9) gen ekspresyonları artarken otofajik gen (Bcl-1, LC3A, p62) ekspresyonları azalmıştır. K41A, in-vivo olarak tümör büyüme hızını kontrol grubuna göre azaltmıştır. K41A'nın sisplatin ile kombinasyonu ise, hem kontrol grubu ile hem de ajanların tek başına uygulandığı gruplar ile karşılaştırıldığında, tümör büyüme hızını anlamlı derecede azaltmıştır.

Sonuç: Bu çalışma sonuçları göstermektedir ki bir polietar iyonofor molekül olan K41A, nöroblastomda özellikle standart kemoterapötik ajan sisplatin ile kombine edildiğinde hücre ölüm yollarını modüle ederek potansiyel bir anti-tümör ajan olarak öne çıkmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Nöroblastom, Polietar İyonofor, Hücre Ölümü

XXIII. ULUSAL PEDIATRİK KANSER KONGRESİ

17-21 Nisan 2024 • Pine Bay Kongre Merkezi, Kuşadası, Aydın

[S-10]

NÖROBLASTOMDA HIPPO SİNYAL YOLAĞI BİLEŞENİ YAP'IN İNHİBİSYONU**SELEN KUM ÖZSENGEZER¹, ZEKİYE ALTUN¹, GAMZE SANLAV², NUR OLGUN²**¹ DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ TEMEL ONKOLOJİ AD
² DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ PEDIYATRİK ONKOLOJİ AD

Amaç: Nöroblastom (NB) sıklıkla erken çocukluk döneminde görülen ve sempatik sinir sisteminden kaynaklanan malign bir tümördür. Sisplatin (CDDP), NB tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajandır. Hippo sinyal yolağı, organ büyümesi, farklılaşması ile ilgili olup, kök hücreler, kanser kök hücreleri ve tümör oluşumunda önemli bir rol oynar. Bu yolağın transkripsiyon ko-aktivatörü olan YAP da bu mekanizmanın önemli bir parçasıdır. Verteporfin (VP), ıyğa duyarlı bir berzoporfin türevidir ve güçlü ve seçici bir YAP inhibitörüdür. YAP-TEAD etkileşimlerini bozmaktadır. Verteporfin ve türevlerinin çeşitli kanserlerde proliferasyonu azaltıcı etkileri bildirilmektedir. Retinolik asit (RA), A vitamininden sentezlenen doğal olarak oluşan bir retinoiddir. RA'nın 18 ayıktan küçük bebeklerde NB tedavisi için çok etkili olduğu ve neredeyse tüm hastalarda tam remisyon sağladığı bildirilmektedir. Bu çalışmanın amacı nöroblastomda VP, CDDP, RA ve bu ajanların kombinasyonlarının in-vitro ve in-vivo koşullarda hippo yolağı bileşenleri üzerinden potansiyel anti-tümoral etkinliğin ortaya konmasıdır.

Gereç-Yöntem: Çalışmada N-MYC(-) SH-SY5Y ve N-MYC(+) KELLY nöroblastom hücrelerinde VP, CDDP, RA ve ajanların kombinasyonlarının apoptoz üzerine etkisi Annexin-V/PI testi ile akış sitometrik olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca KELLY hücreleri kullanılarak nude farelerde NB kaenografik model oluşturularak ajanların in-vivo anti-tümoral etkinlikleri tümör boyutları üzerinden incelenmiştir. Ajanların hippo yolağı ve kök hücre diferensiyasyon belirteçleri üzerindeki etkisi OCT, SOX, Nestin, YAP ve LATS-1 gen ve protein ekspresyonlarının RT-PCR ve immünohistokimyasal boyama analizi yardımı ile in-vivo ve in-vitro koşullardan elde edilen örneklerde değerlendirilmiştir.

Bulgular: Verteporfin ve sisplatinin hücre canlılığına azaltıcı ve özellikle in-vivo da tümör volümünü azaltıcı etkisi saptanmıştır. Hippo sinyal yolağının çekirdek proteinlerinden özellikle YAP-1 ve LAT-2 nin, VP ve CDDP gruplarında kontrole göre ekspresyonlarında azalma olduğu gösterilmiştir. Bu da YAP'ı özellikle potansiyel bir terapötik hedef olarak ortaya koymaktadır.

Sonuç: Bu çalışma sonuçları hippo sinyal yolağının, nöroblastom tedavisi için alternatif bir terapötik hedef olarak değerlendirilmesinde fayda sağlayabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nöroblastom, Hippo Sinyal Yolağı, Verteporfin



PP8 - ANALYSIS OF TRIBBLES HOMOLOG 3 (TRIB3) EXPRESSION LEVELS IN NEUROBLASTOMA: PRELIMINARY STUDY

BARAN Burcin¹, SANLAV Gamze¹, KIZMAZOGLU Deniz², OZSENGEZER KUM Selen¹, AKTAS Safiye¹, ALTUN Zekiye¹, OLGUN Nur²

¹Dokuz Eylul University, Institute of Oncology, Basic Oncology; ²Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Pediatric Oncology, Izmir, Turkey

Objective: Tribbles protein (TRIB) family was first identified in *Drosophila*, plays role in coordinating cell division and morphogenesis. TRIB3 is one of the members of this family, its protein expression levels and patient prognosis has been examined in various studies. While TRIB3 expression was correlated with poor prognosis in hepatocellular cancer patients, its expression levels were associated with increased disease-free survival and a better response to therapy in luminal breast cancer patients.

Neuroblastoma (NB) is the most common solid tumor in children and accounts for ~15% of childhood cancer-related mortality. In the present study, we aimed to investigate the TRIB3 expression levels among NB patients and to determine if TRIB3 expression levels could be a prognostic biomarker for NB.

Material-Methods: 40 children with different stages of NB were studied. The patients were staged according to criteria defined by Turkish Pediatric Oncology Group and International Neuroblastoma Staging System. Protein expression levels of TRIB3 were determined with immunohistochemical staining on paraffin sections of NB patient tissue samples. All sections were independently and blindly studied for protein expression under microscopic examination. P values <0.05 were accepted statistically significant.

Results: TRIB3 expression was found to be upregulated in low grade samples and ganglioneuroblastoma samples and downregulated in neuroblastoma cells in the tissue sections of high-grade NB samples.

Conclusion: While study is still ongoing, preliminary results showed that TRIB3 could be a candidate prognostic marker for NB patients.

Keywords: Neuroblastoma, Cell signaling, Biomarker, Prognostic marker



PP7 - S-100 PROTEIN EXPRESSION LEVELS AS A POTENTIAL PROGNOSTIC MARKER IN NEUROBLASTOMA

SANLAV Gamze¹, BARAN Burcin¹, KIZMAZOGLU Deniz², OZSENGEZER KUM Selen¹, AKTAS Safiye¹, ALTUN Zekiye¹, OLGUN Nur²

¹Dokuz Eylül University, Institute of Oncology, Basic Oncology; ²Dokuz Eylül University, Institute of Oncology, Pediatric Oncology, Izmir, Turkey

Objective: S-100 is an acidic-calcium-binding protein and was first described in cells of neuroendocrine origin. It plays an important role in various cellular processes such as cell differentiation and proliferation. S-100 is described to be a negative prognostic marker for the advanced stages of melanoma and was evaluated to be prognostic biomarker for different cancers. Neuroblastoma(NB) is remarkable for its broad spectrum of clinical behavior, varying from spontaneous regression to progressive disease and accounts for ~15% of childhood cancer-related mortality. This diversity in behavior correlates closely with defined clinical and biologic features and combinations of prognostic variables are used for risk-group assignment. The aim of this study is to investigate the S-100 expression levels among neuroblastoma patients and to determine if S-100 expression levels could be prognostic biomarker for neuroblastoma.

Material-Methods: Histological tumor sections of 40 cases of varying stages and risk groups of neuroblastoma were studied. The patients were staged according to criteria defined by Turkish Pediatric Oncology Group and International Neuroblastoma Staging System(INSS). Risk groups were determined according to the International Neuroblastoma Risk Group(INRG) classification system. S-100 protein expression levels were evaluated by immunohistochemical staining on paraffin sections of neuroblastoma patient tissue samples. All sections were independently and blindly studied for protein expression under microscopic examination. P values<0.05 was accepted statistically significant.

Results: Schwann cells in the ganglioneuromas and ganglioneuroblastomas always strongly stained. Neuroblastoma cases with early stage and low-to-intermediate risk showed upregulated expression.

Conclusion: While study is still ongoing, preliminary results showed that S-100 could be a candidate prognostic marker for neuroblastoma patients.

Keywords: neuroblastoma, prognosis, s-100, biomarker



PP12 - INVESTIGATION OF THE POTENTIAL EFFECTS OF YAP-1 AND NESTIN ON RISK CLASSES AND PROGNOSIS IN NEUROBLASTOMA

OZSENGEZER KUM Selen¹, BARAN Burcin¹, KIZMAZOGLU Deniz², SANLAV Gamze¹, AKTAS Safiye¹, AKTAS Tekincan¹, ALTUN Zekiye¹, OLGUN Nur¹

¹Dokuz Eylul University, Institute of Oncology, Basic Oncology; ²Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Pediatric Oncology, Izmir, Turkey

Introduction: Neuroblastoma (NB) is the most common solid tumors in childhood. MYCN is the main prognostic factor for risk classification and staging in NB patients. YAP (Yes Associated Protein) plays a critical role in many types of cancer. In NB, YAP expression levels may be correlate with advanced tumor staging. Nestin is an important neuronal differentiation and cancer stem cell marker in NB. The aim of this study is to examine the potential roles of YAP-1 and Nestin expressions in terms of prognosis and risk classifications for neuroblastoma.

Material-Method: Histological tumor sections of 55 cases were examined. YAP-1 and Nestin protein expression levels were evaluated by immunohistochemical staining on paraffin sections of different neuroblastoma risk groups. YAP-1 and Nestin expression levels were evaluated with clinical findings of NB patients. P value was <0.05 accepted as a statistically significant.

Results: 55 patient tissues were included in this study, of which 24 were male and 21 were female. The ages of the patients are between 1 month to 11 years. YAP-1 protein was expressed in 36.4% in MYCN(+) and 14.6% in MYCN(-) patients. Nestin protein was expressed 36.4% in MYCN(+), and 20.6% in MYCN(-) patients. YAP-1 was expressed 18% in all tissues. Nestin expressions were determined 20.4% in all tissues. YAP-1 was expressed in 26.9% in high-risk and 11.5% in low-risk groups. Nestin was expressed 24.4% in high-risk and 33.3% in low-risk groups.

Conclusion: YAP-1 and Nestin might be a clinically risk markers for neuroblastoma patients.

Keywords: neuroblastoma, YAP-1, Nestin

MATH-1 protein expression levels in neuroblastoma may be a predictive factor for risk stratification

Gamze SANLAV¹, Selen Kum ÖZŞENGEZER¹, Burçin BARAN¹, Deniz KIZMAZOĞLU², Safiye AKTAŞ¹, Zekiye ALTUN¹, Nur OLGUN²

¹Dokuz Eylül University, Institute of Oncology, Department of Basic Oncology, İzmir, Turkey,
²Dokuz Eylül University, Institute of Oncology, Department of Clinical Oncology, İzmir, Turkey,



Background :

Neuroblastoma is remarkable for its broad spectrum of clinical behavior, varying from spontaneous regression to progressive disease. This diversity in behavior correlates closely with defined clinical and biological features and combinations of prognostic variables are used for risk-group assignment. MATH-1 (Atoh1) is a basic helix-loop-helix transcription factor that is highly expressed in proliferating progenitors of specialized neuroepithelium in the developing dorsal hindbrain. MATH-1 plays a role in the differentiation of subsets of neural cells by activating E box-dependent transcription. In this study, we aimed to investigate the MATH-1 expression levels among neuroblastoma patients and to determine if MATH-1 expression in tumor tissue could be a prognostic biomarker for neuroblastoma.

Material-Methods:

Histological tumor sections of 56 cases of varying stages and risk groups of neuroblastoma were studied. MATH-1 protein expression levels were evaluated by immunohistochemical staining on paraffin sections of neuroblastoma patient tissue samples. All sections were independently and blindly studied for protein expression under microscopic examination. Tissue samples were categorized due to protein expression levels as positive ($\geq 5\%$) and negative ($< 5\%$). The chi-Square test was applied to detect the significance of protein expressions between risk groups and disease stages.

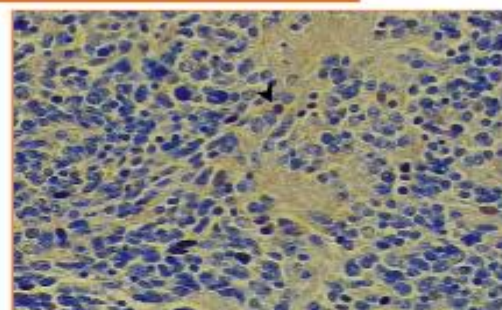


Figure A: MATH-1 positive tumor tissue

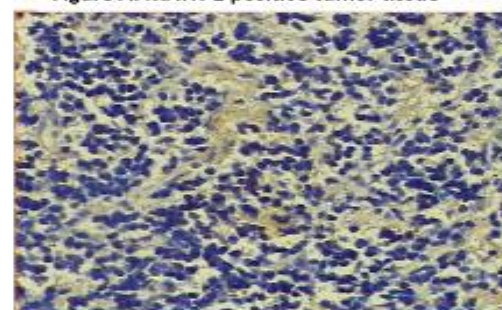


Figure B: MATH-1 negative tumor tissue

Results:

60% of the patients were categorized as low-risk and 40% were intermediate to high-risk. 33% of the tumor tissues of low-risk patients were positively stained for MATH-1 whereas only 10 % of the tumors from intermediate-to-high-risk patients showed significant staining. This difference between the ratios of MATH-1 positive cases in the low and intermediate-to-high-risk patient groups was statistically significant ($p < 0.05$).

Conclusion:

Results of this study can propose that MATH-1 expression in neuroblastoma can be a useful biomarker for risk stratification. However, further studies are required to clearly identify other factors effective in the relation between MATH-1 expression and neuroblastoma risk stratification.

MATH-1 expression levels in NB risk groups



8.5. Ek.5 Katkı

“Yapılan tez çalışması Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından **TDK-2022-2650** no’lu projeyle ve Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TUSEB) tarafından A GRUBU ACİL AR-GE PROJE DESTEK programı 2022-**ACİL-08 12100** proje numarası ile desteklenmiştir. Her iki kuruma da destekleri için teşekkür ederiz.”

