



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**U118 VE U87 GLİOBLASTOMA HÜCRE SERİLERİNİN
SİTOGENETİK OLARAK İNCELENMESİ VE TASPİNE’NİN BU
HÜCRE SERİLERİ ÜZERİNDEKİ ANTİPROLİFERATİF,
ANTIANGİYOGENİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Shahrashoub SHARİFİ

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç Dr. Oya Sena AYDOS**

2014- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**U118 VE U87 GLİOBLASTOMA HÜCRE SERİLERİNİN
SİTOGENETİK OLARAK İNCELENMESİ VE TASPİNE'NİN BU
HÜCRE SERİLERİ ÜZERİNDEKİ ANTİPROLİFERATİF,
ANTİANJİYOGENİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Shahrashoub SHARİFİ

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç Dr. Oya Sena AYDOS**

2014- ANKARA

KABUL VE ONAY

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖNSÖZ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER	ix
ÇİZELGELER	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Sinir Sistemi Hücreleri	1
1.1.1. Sinir Sistemi Hücrelerinin Sınıflandırması	1
1.1.2. Glia Hücreleri ve Hastalıklar	2
1.2. Beyin Tümörleri	3
1.2.1. Glioblastom Multiforme (GBM)	5
1.2.1.1. Etiyoloji	7
1.2.1.2. GBM'nin Klinik Özellikleri	8
1.2.1.3. GBM'nin Moleküler ve Sitogenetik Özellikleri	8
1.2.1.4. GBM'de Bulunan En Önemli Biyolojik Belirteçler	10
1.2.1.4.1. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)	12
1.2.1.4.2. VEGF (Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü)	12
1.2.1.4.3. Ras ve PI3K/Akt	13
1.2.1.4.4. P53	13
1.2.1.4.5. Kromozom 10 Kaybı	14
1.2.1.4.6. 1p ve 19q Kaybı	15
1.2.1.4.7. Kitinaz 3-like 1 (CHI3L1)	15
1.2.1.4.8. İzositrat Dehidrogenaz (IDH)1/2 Mutasyonu	15
1.2.1.4.9. MGMT (Metil Guanin Metil Transferaz)	16
1.2.1.4.10. Beklin-1	16
1.2.1.5. Prognoz	17
1.2.1.6. Metastaz ve Yayılım	18

1.2.1.7. GBM Tedavisi	18
1.2.1.7.1. GBM Tedavisinde Cerrahi	19
1.2.1.7.2. GBM Tedavisinde Radyoterapi	19
1.2.1.7.3. GBM Tedavisinde Kemoterapi	19
1.2.1.8. Kanser Tedavisinde Bitkisel İlaçların Kullanımı	21
2. GEREÇ ve YÖNTEM	24
2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar	24
2.1.1. Hücre Kültürü	25
2.1.2. [3-(4,5- Dimethyldiazol-2-yl)-2,5 Diphenyl Tetrazolium Bromid]	
MTT Sitotoksosite Testi	26
2.1.3. RNA İzolasyonu	27
2.1.4. RNA Kantitasyonu	27
2.1.5. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	27
2.1.6. Gerçek Zamanlı PZR (RT_PZR)	28
2.1.7. Agaroz Jel Elektroforezi	28
2.1.8. Tek Hücre Jel Elektroforezi (KOMET)	28
2.1.9. Sitogenetik Analizi	29
2.2. Yöntemler	30
2.2.1. Hücre Kültürü	30
2.2.2. MTT ile Sitotoksosite Testi	31
2.2.3. RNA İzolasyonu	32
2.2.4. cDNA Sentezi	33
2.2.5. RT-PZR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	35
2.2.6. Tek hücre jel elektroforezi (Komet)	37
2.2.7. Hücre Hatlarının Sitogenetik Analizi	38
2.3. Sonuçların Değerlendirmesi	39
3. BULGULAR	40
3.1. U118 ve U87 Hücrelerin Mikroskopik Görüntüleri	40
3.2. MTT Canlılık Testi (Sitotoksosite Analizi)	40
3.3. RNA Bütünlük, Kalite ve Miktar Tayini	46

3.4. Eş Zamanlı PCR (Real Time PCR, <i>qRT-PCR</i>) Bulguları	48
3.5. Apoptoz, Anjiyogenez ve Otofajiden Sorumlu olan Genlerin Taspine Uygulanması Sonrası İfadelerindeki Değişim	50
3.6. Tek hücre jel elektroforezi (Komet) Analizi	54
3.7. Sitogenetik analiz	58
4. TARTIŞMA	60
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	69
ÖZET	71
SUMMARY	73
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	85

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, az sayıda farklı kanser tiplerinde anti-kanserojenik etkileri saptanmış, bitkisel bir alkaloid olan Taspine'in, malignitesi yüksek bir tümör olduğu ve tam bir küratif tedavisi olmadığı bilinen Glioblastoma Multiforme (GBM) üzerindeki etkilerini incelemek üzere, GBM hücre serilerinde (U87 ve U118) anti-proliferatif, apoptotik ve anti-anjiyogenik yolaklardaki etkileri araştırılmıştır. Taspine'in, ilk defa GBM hücre serilerine uygulandığı bu çalışmada, farklı özelliklere sahip olan iki ayrı GBM hücre serisindeki etkileri incelenmiştir.

Hayatımın her aşamasında sevgisini ve yardımını eksik etmeden beni destekleyen ve her zaman yanımda olan ve tezimi kendisine ithaf ettiğim insan, Dr.Ali NAZEMİ'ye

Tezimin oluşturulması ve yürütülmesi sırasında engin bilgi ve yardımlarıyla beni bilimsel anlamda yönlendiren, hiçbir zaman manevi desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Oya Sena AYDOS'a

Tezimin bütün aşamalarında değerli bilgilerini ve yardımlarını benden esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU' na

Tez çalışmam sırasında bilimsel metodları öğrenmemde ve uygulamamda büyük emeği geçen, deneylerin her aşamasında büyük fedakarlıkla katkıda bulunan ve kalpten dostluğuna her daim inandığım Uz. Dr. Tülin ÖZKAN'a,

En yakın arkadaşlarım Ali Reza HASANLOU, Somayyeh HEİDARGHOLİZADEH, Merve BUNSUZ ve Hajar HEYDARİ'ye,

Değerli arkadaşlarım Dr. Buket ALTINOK ZAIM, Dr. Aynur KARADAĞ, Dr. Süreyya BOZKURT, Ayten İNANÇ, Dr. Can ATEŞ, Fuat KAPLAN ve Yalda HEKMATSHOAR'a

Sayın hocalarıma, sevgili arkadaşlarıma ve Tüm Tıbbi Biyoloji ailesine,

Eğitimimin her aşamasında sonsuz sevgi, anlayış ve sabırla bana destek olan, en değerli varlığım aileme sonsuz teşekkür ve sevgilerimle...

SİMGELER VE KISALTMALAR

AKT	: Serin/Threonin Protein Kinaz
Bcl-2	: B-cell Lenfoma 2
BÇ	: Baz Çifti
Bid	: BH3 Interacting Domain Death Agonist (BH3 İlişkili Bölge Ölüm Agonisti)
Bim	: Bcl-2 Interacting Mediator Of Cell Death (Bcl2 İlişkili Hücre Ölüm Aracısı)
CDKN2A	: Siklin Bağımlı Kinaz Inhibitörü 2
cDNA	: Complementary DNA (Komplementer DNA)
CHI3L1	: Kitinaz 3-Like 1
CT	: Eşik Siklus
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü)
EtOH	: Etil Alkol
FBS	: Fetal Bovin Serum (Fetal Dana Serümü)
FDU	: Fluorodeoksi Uridin
G	: Gram
GBM	: Glioblastoma Multiforme
GTG	: Giemsa/Tripsin
HDM2	: İnsan Double Minute 2
IDH-1	: İzositrat Dehidrogenaz 1
Kb	: Kilobaz
KCl	: Potasyum Klorür
KT	: Kemoterapi
LOH	: Heterozigozite Kaybı
MAPK	: Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz

MDM2	: Mürin Double Minute2
MGMT	: Metilguanin Metiltransferaz
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
NADP+	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
P53	: Tümör Baskılayıcı Protein 53
PDGFRA	: Platelet Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü A
PI3K	: Fosfatidilinositol 3 Kinaz
Prb	: Retinoblastom Yatkinlık Lokusu Protein 1
PSS	: Periferik Sinir Sistemi
PTEN	: Fosfat ve Tensin Homolog
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RASSF1A	: Ras Association Domain Family Protein 1
RNA	: Ribonükleik Asit
RT	: Radyoterapi
RT-PCR	: Ters Transkripsiyon -PCR
Sn	: Saniye
Taq Pol.	: Tak Polimeraz
Tas	: Taspine
TBE	: Tris/Borate/EDTA
TKI	: Tirozin Kinaz Inhibitör
TP53	: Tümör Baskılayıcı Gen 53
VEGF(R)	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (Reseptörü)
ml	: Mikro Litre
μ M	: Mikro Molar

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Sinir Sistemi Hücreleri	1
Şekil 1.2.	Sinir sistemi hücrelerinin sınıflandırması	2
Şekil 1.3.	Nörogial soy ağacı	6
Şekil 1.4.	Primer ve sekonder GBM gelişmesinde meydana gelen genetik değişiklikler	10
Şekil 1.5.	Taspine'in kimyasal yapısı	22
Şekil 3.1.	a) U87ve b)U118 Hücrelerinin Mikroskopik Görüntüleri (10x20)	40
Şekil 3.2.	U118 ve U87 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'ların %1'lik Agaroz Jel Görüntüsü	47
Şekil 3.3.	Bcl2 Amplifikasyon Eğrisi Grafiği	48
Şekil 3.4.	Bcl-2 Erime Eğrisi	49
Şekil 3.5.	U118 Hücrelerinde Taspine Uygulanmasından önce DNA hasarlarının KOMET ile gösterimi	55
Şekil 3.6.	U118 Hücrelerinde Taspine Uygulanmasından sonra DNA hasarlarının KOMET ile gösterimi	56
Şekil 3.7.	U87 Hücrelerinde Taspine Uygulanmasından önce DNA hasarlarının KOMET ile gösterimi	57
Şekil 3.8.	U87 Hücrelerinde Taspine Uygulanmasından sonra DNA hasarlarının KOMET ile gösterimi	58
Şekil 3.9.	U87 Hücre Serisinde Yapılan Karyotip Analizi (karyotip: 43,XX,der(1),-2,-6,-11,-14,-22,mar1,mar2)	59
Şekil 3.10.	U118 Hücre Serisinde Yapılan Karyotip.	59

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	DSÖ 2007- MSS'nin Nöroepitelyal Doku Tümörleri	4
Çizelge 1.2.	GBM için Tanımlanan Belirteçiler ve Biyolojik Roller	11
Çizelge 2.1.	Çalışmada kullanılan hücre dizilerinin özellikleri	25
Çizelge 2.2.	c-DNA sentez protokolü	34
Çizelge 2.3.	VEGF, EGFR, p53, BİM, BAX, BCL2, BECLİN1 ve HPRT için RT-PZR şartları	36
Çizelge 3.1.	U118 Hücre Serisinde Taspine'in Yüzde Canlılık Etkisi	41
Çizelge 3.2.	U118 Hücrelerinde 24. Saat MTT Sonucu	41
Çizelge 3.3.	U118 Hücrelerinde 48. Saat MTT Sonucu	41
Çizelge 3.4.	U118 Hücrelerinde 72. Saat MTT Sonucu	42
Çizelge 3.5.	U118 Hücrelerinde 24,48 ve 72. Saatlerde Yapılan MTT Sonucu	42
Çizelge 3.6.	U118 Hücre Serisinde Taspine Uygulaması Sonrası Hücre Canlılık Testi Sonuçları	43
Çizelge 3.7.	U87 Hücre Serisinde Taspine'in Yüzde Canlılık Etkisi	43
Çizelge 3.8.	U87 Hücrelerinde 24. Saat MTT Sonucu	44
Çizelge 3.9.	U87 Hücrelerinde 48. Saat MTT Sonucu	44
Çizelge 3.10.	U87 Hücrelerinde 72.Saat MTT Sonucu	45
Çizelge 3.11.	U87 Hücrelerinde 24,48 ve 72. Saatlerde Yapılan MTT Sonucu	45
Çizelge 3.12.	U87 Hücre Serisinde Taspine Uygulaması Sonrası Hücre Canlılık Testi Sonuçları	46
Çizelge 3.13.	İzole Edilen RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Okumaları	47

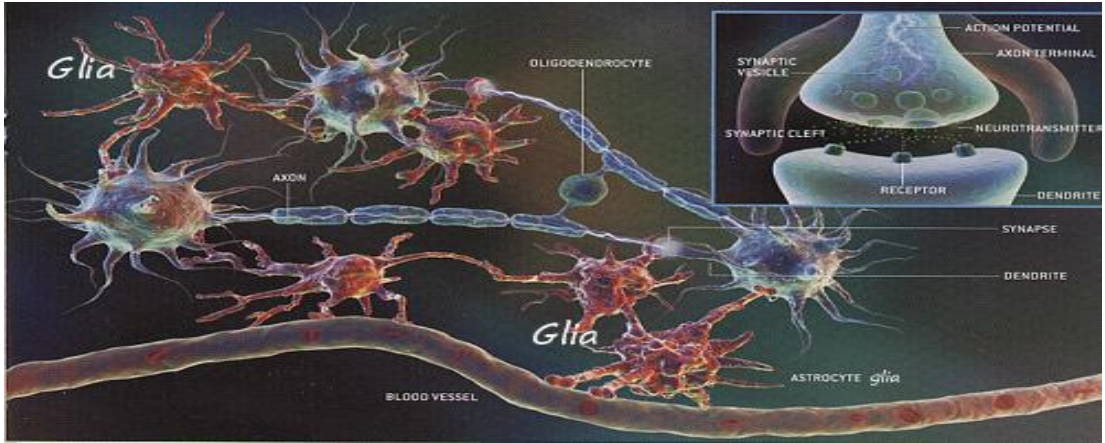
Çizelge 3.14. U118 Hücrelerinde Taspine Uygulanması Sonrası Genlerin İfadelerindeki Değişim	52
Çizelge 3.15. U87 Hücrelerinde Taspine Uygulanması Sonrası Genlerin İfadelerindeki Değişim	52
Çizelge 3.16. U118 Hücrelerinde Taspine Uygulanması Sonrası BECLİN1 Genninin İfadelerindeki Değişim	53
Çizelge 3.17. U87 Hücrelerinde Taspine Uygulanması Sonrası BECLİN1 Genninin İfadelerindeki Değişim	53
Çizelge 3.18. U118 ve U87 Hücre serilerinde Taspine Uygulanmasından önce ve sonra DNA hasarlarının yüzdesi	55
Çizelge 3.19. U118 Hücrelerinde Taspine Uygulanmasından önce DNA hasarlarının KOMET ile gösterimi	55
Çizelge 3.20. U118 Hücrelerinde Taspine Uygulanmasından sonra istatistik olarak DNA hasarlarının KOMET ile gösterimi	56
Çizelge 3.21. U87 Hücrelerinde Taspine Uygulanmasından önce istatistik olarak DNA hasarlarının KOMET ile gösterimi	56
Çizelge 3.22. U87 Hücrelerinde Taspine Uygulanmasından sonra istatistik olarak DNA hasarlarının KOMET ile gösterimi	57

1. GİRİŞ

1.1. Sinir Sistemi Hücreleri

Sinir sistemi, merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferel sinir sistemi (PSS) olarak iki gruba ayrılır. PSS, vücudun dış bölge alıcısı gibi işlev gören, dışarıdan alınan duyu bilgilerini MSS'ne taşıyan ve bu bilgilere verilecek cevabı ilgili dokulara götüren sinir ağından oluşur (Allen ve Barres, 2009). Sinir sistemi hücreleri genel olarak "Nöron" ve "Glia" hücresi olarak iki gruba ayrılır (Allen ve Barres, 2009).

Sinir sisteminde önemli fonksiyonları olan glia hücreleri nöronların çevresinde yerleşiktir. Genel olarak bu hücreler, nöronlara fiziksel destek sağlanmasında, besin ve oksijen temininde, nöronal iletişimde, patojenlerin yok edilmesinde ve ölen nöronların temizlemede görev almaktadır (Allen ve Barres, 2009).

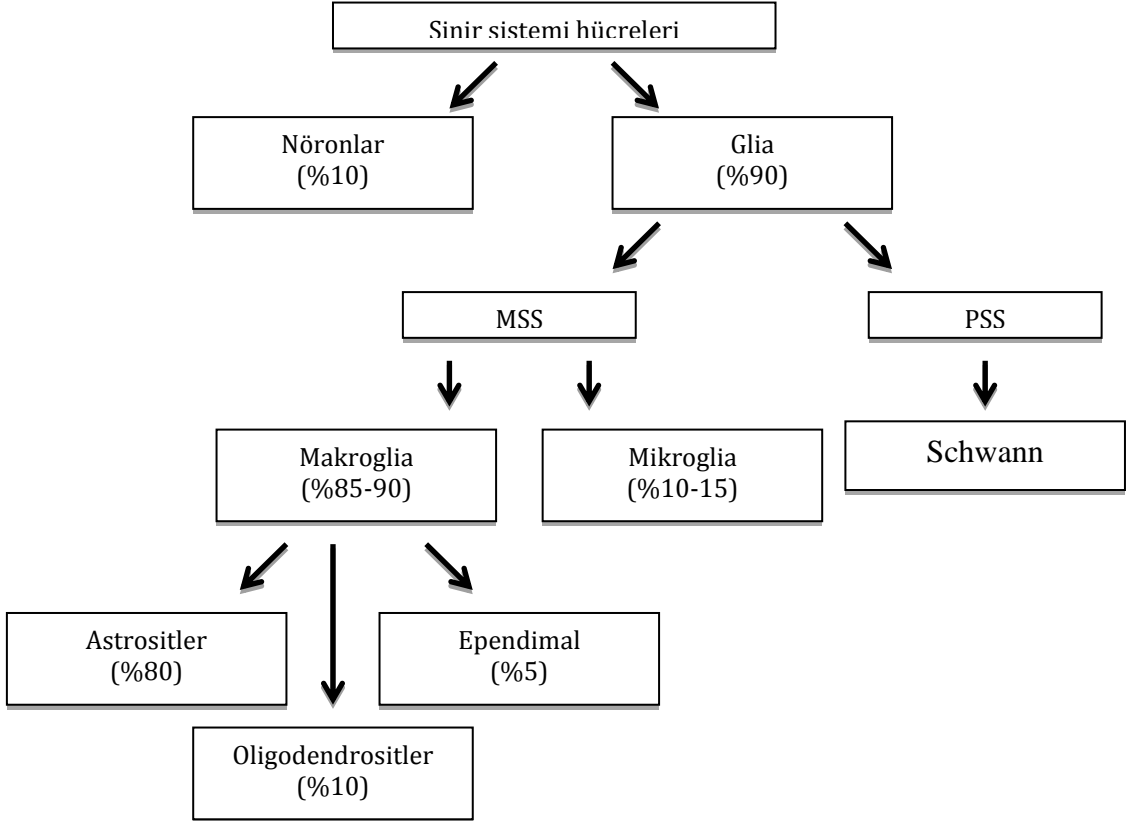


Şekil 1.1. Sinir Sistemi Hücreleri

1.1.1. Sinir Sistemi Hücrelerinin Sınıflandırması

Glia hücreleri, morfolojilerine, fonksiyonlarına ve sinir sistemindeki yerleşmelerine göre sınıflandırılmaktadır (Şekil 1.1) (Verrkhatsky ve Butt, 2007).

Genel olarak bu hücreler, MSS ve PSS’de yer alan glia hücreler olarak ayrıldığında, MSS’de yer alan hücreler “Makroglia” ve “Mikroglia”, PSS’nde yer alan glia hücreleri ise “Schwann hücreleri” olarak adlandırılır. MSS’de yer alan glia hücrelerinden oligodendrosit, endimal hücre ve astrositler embriyonel olarak, nöral tübün ventriküler bölgesinde gelişirken, PSS’de yer alan şuan hücreleri ve satellit hücreleri nöral krestten gelişir (Verrkhatsky ve Butt, 2007) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Sinir sistemi hücrelerinin sınıflandırması (Verrkhatsky Ve Butt, 2007).

1.1.2. Glia Hücreleri ve Hastalıklar

Beyin hücre popülasyonunun büyük bir kısmını glial hücreler oluşturduğu için bu hücrelerin beyin ile ilgili her türlü hastalığın patogenezinde yer alması beklenen bir durumdur (Sofroniewe ve ark, 2010). Glia hücrelerinin beyinle ilgili hastalıklarda temel rol oynadığı belirtilmektedir (Allen ve Barres,2009). Glialar, bir çok nöronal hastalığın gelişimine neden olabildiği gibi engel de olabilir. Omurilik hasarı

sonrasında astrositler, glial bağ doku oluşturarak aksonların yeniden rejenerasyonunu engellerler. Astrositlerin neden olduğu en yaygın hastalıkların başında ‘‘Glioma’’veya Glioblastoma multiforme (GBM) olarak adlandırılan beyin tümörleri gelmektedir (Allen ve Barres,2009; Sofroniewe ve ark, 2010).

1.2. Beyin Tümörleri

Beyin tümörleri tüm kanserlerin %1.5’inden ve kansere bağlı ölümlerin %2’sinden sorumludur (Lee ve ark, 2010). 20-70 yaşları arasında yüksek sıklıkta, tüm yaş gruplarında ise erkeklerde kadınlardan daha fazla görünmektedir (Sarkar ve ark, 2009). Bu tümörler primer veya sekonder olarak sınıflandırılır. Primer tümörler glial dokudan, nöronlardan, meninkslerden, damarlardan veya endokrin hücrelerden kaynaklanmaktadır. GBM, destekleyici glial dokudan köken alan nöroepitelyal tümörlerdir. 1. Astrositik, 2. oligodendrogliyal, 3. oligoastrositik ve 4. ependimomlar olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır (Sarkar ve ark, 2009, Hayden ve ark., 2010).

Merkezi sinir sistemi (MSS) tümörleri günümüzde oldukça yaygın olup, tümörlerin sınıflandırması patolojilerine göre yapılır. (Tatter ve ark,2010; Louis ve ark,2007). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yapılan sınıflandırmaya göre sinir sisteminin başlıca tümörleri;

- Nöroepitelyal,
 - Metastatik,
 - Germ Hücreli Tümörler,
 - Kranial Ve Paraspinal Sinir Tümörleri,
 - Meninks Tümörleri,
 - Sellar Bölgenin Tümörleri,
 - Lenfomalar Ve Hematopoitik Neoplazmlardan Oluşumaktadırlar
- (Kleiheus Ve Ark, 2007;Kleihues Ve Ark, 1993).

Astroditomlar bu sınıflandırmaya göre nöroepitelyal doku tümörleri içerisinde yer almaktadır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1.DSÖ 2007- MSS'nin Nöroepitelyal Doku Tümörleri (Kleihues ve ark,2007).

NÖROEPİTELYAL DOKU TÜMÖRLERİ	DERECE
1. Astroitik tümörler	
a. Piloitik astroitoma.....	I
Pilomiksoid astroitoma.....	II
b. Subependimal dev hücreli astroitoma.....	I
c. Pleomorfik ksantroastroitoma.....	II
d. Diffüz astroitoma.....	II
1. Fibriler astroitoma	
2. Gemiositik astroitoma	
3. Protoplazmik astroitoma	
d. Anaplastik astroitoma.....	III
e. Glioblastom.....	IV
1. Dev hücreli glioblastom.....	IV
2. Gliosarkom.....	IV
f. Gliomatozis serebri.....	III
2. Oligodendroglial tümörler	
a. Oligodendroglom.....	II
b. Anaplastik oligodendroglom.....	III
3. Oligoastroitik tümörler	
a. Oligoastroitoma.....	II
b. Anaplastik oligoastroitoma.....	III
4. Ependimal tümörler	
a. Subependimom.....	I
b. Miksopapiller ependimom.....	I
c. Ependimom.....	II
1. Sellüler	
2. Papiller	
3. Clear cell	
4. Tanisitik	
d. Anaplastik ependimom.....	III
5. Koroid pleksus tümörleri	
a. Koroid pleksus papillomu.....	0
b. Atipik koroid pleksus papillomu.....	II
c. Koroid pleksus karsinomu.....	III

6. Diğer nöroepitelyal tümörler	
a. Astroblastom.....	III
b. Üçüncü ventrikülün kordoid gliomu.....	II
c. Angiosentrik gliom.....	I
7. Nöronal ve miks nörogial tümörler	
a. Serebellumun displastik gangliositomu.....	0
b. Desmoplastik infantil astrositom / gangliogliom.....	I
c. Disembriyoplastik nöroepitelyal tümör.....	0
d. Gangliositoma.....	0
e. Ganglioglioma.....	I
f. Anaplastik gangliogliom.....	III
g. Santral nörositom.....	II
h. Ekstraventriküler nörositom.....	II
i. Serebellar liponörositom.....	II
j. Papiller glionöral tümör.....	I
k. Dördüncü ventrikülün roset formasyonlu glionöral tümörü.....	I
l. Paragangliom.....	I
8. Pineal bölgenin tümörleri	
a. Pineositom.....	I
b. Pineoblastom.....	IV
c. Orta derecede diferansiyasyon gösteren pineal parenkimal tümör.....	II /III
d. Pineal bölgenin papiller tümörü.....	II III
9. Embriyonel tümörler	
a. Medulloblastom.....	IV
1. Desmoplastik/nodüler medulloblastom	
2. Ekstensif nodülariteyle birlikte medulloblastom	
3. Anaplastik medulloblastom	
4. Büyük hücreli medulloblastom	
b. SSS primitif nöroektodermal tümör (PNET).....	IV
1. SSS Nöroblastomu	
2. SSS Ganglionöroblastomu	
3. Medullaepitelyom	
4. Ependimoblastom	
c. Atipik teratoid/rabdoid tümör.....	IV

1.2.1. Glioblastom Multiforme (GBM)

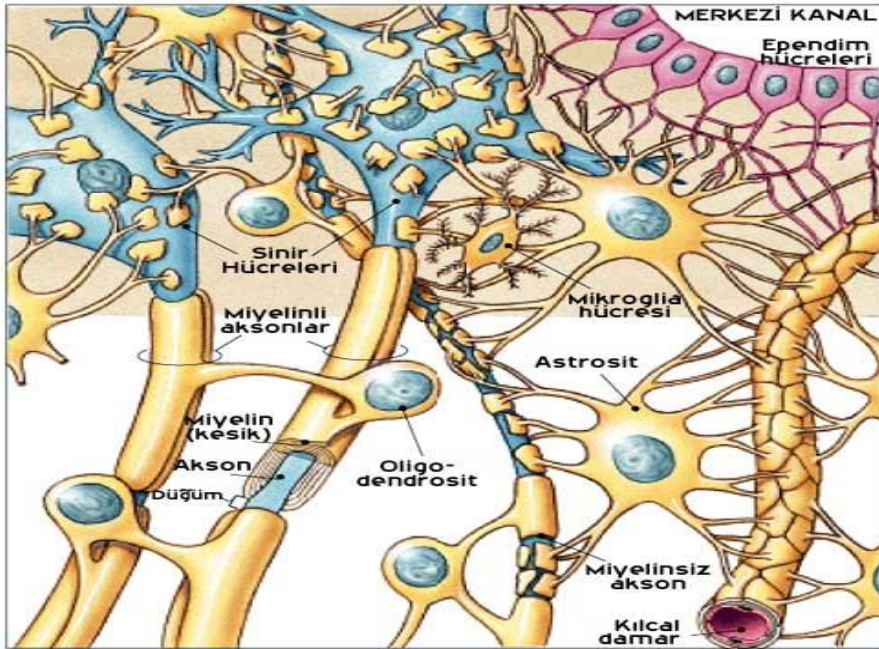
GBM, normal olarak nöral hücreleri destekleyen ve koruyan olgun glial hücrelerinden ya da daha az farklılaşmış prekürsörlerinden köken alır (Huse ve ark,

2010) (Şekil 1.3). GBM erişkinlerde en sık görülen ve en malign beyin tümördür (Rosell ve ark, 2008). İntrakranial tümörlerin %12-15'ini ve astrositik grubun ise %50-60'ını oluşturmaktadır (Sathornsumetee ve ark, 2008).

GBM çocuk yaşlarda nadir olarak, daha sıklıkla 45- 75 yaşları arasında ve erkeklerde kadınlara oranla 1.5 kat daha fazla görülür (Iacob ve ark,2008).

GBM in %90'ı primer, %10'u sekonder olan iki gruptan oluşmaktadır. İleri yaşta kendine özgü ortaya çıkan lezyonlar "primer" olarak tanımlanmıştır. Bunlar glial öncü hücrelerden direkt olarak gelişen tümörlerdir. Hızlı geliştikleri için ilk 3 ay içinde klinik belirti verirler. Primer olan GBM (60 yaş), sekondere göre (30-40 yaş) ileri yaşlarda daha sık ortaya çıkmaktadır (Durmaz ve ark, 2007).

Sekonder GBM düşük dereceli gliomların (grade II ve III) progresyonuyla birlikte gelişmektedir. Düşük dereceli astrositomların GBM dönüşme sresi ortalama 4-5 yıl sürmektedir (Durmaz ve ark, 2007).



Şekil 1.3. Nöroglial soy ağacı (Huse ve ark, 2010).

MSS tüm neoplazmlarının %70'inden fazlasını oluşturmakla, morfoloji, lokasyon, genetik değişiklik açısından ve terapiye karşı oluşturduğu yanıtta, önemli ölçüde farklılık göstermektedirler (Ohgaki ve ark, 2009, 2005).

Bu hastalık çoğunlukla kısa bir klinik seyirden sonra, hızlı bir şekilde ilerlemektedir. Sekonder GBM daha düşük dereceye sahip olmakta ve daha yavaş bir sürede gelişmektedir. GBM ve alt tipleri, farklı yaştaki hastalarda, farklı genetik değisikleri, farklı RNA ve protein ekspresyon profilleri ve kemoterapiye yanıtta da önemli değişiklikler göstermektedirler (Ohgaki ve ark, 2009, 2005).

1.2.1.1. Etiyoloji

GBM, çoğunlukla herhangi bir genetik yatkınlık olmaksızın sporadik olarak ortaya çıkmaktadır. Yapılan bir çalışmada sıçanlarda yapay tatlandırıcı aspartam tüketimi, artan beyin tümör vakası ile ilişkilendirilmiştir (Oney ve ark, 1996). GBM'nin SV40 (Baglietto ve ark, 2011, Dziurzynski ve arkö 2012), HHV-6 (Crawford ve ark., 2009; Chi ve ark., 2012) ve sitomegalovirüs ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca, iyonlaştırıcı radyasyon ile GBM arasında düşük bir bağlantı görülmüştür (Cavenee ve ark, 2000).

Düşük dereceli astrositom'nın zaman içinde, daha yüksek dereceli bir tümöre neden olduğu saptanmıştır.

Genetik düzensizliklerin söz konusu olduğu Nörofibromatoz, Tüberoskleroz, Von Hippel-Lindau Hastalığı, Li-Fraumeni Sendromu, Turcot Sendromu ile artmış GBM gelişme olasılığı ilişkilendirilmiştir (Blumenthal ve ark., 2005).

1.2.1.2. GBM'nin Klinik Özellikleri

Hastalığın yaygın semptomları arasında mide bulantısı, kusma, baş ağrısı ve kısmi felç bulunmaktadır. Bu belirtiler arasında en yaygın semptom, temporal ve frontal lobu içermesi nedeniyle hafıza kaybı, kişilik ya da nörolojik bozukluklarının ortaya çıkmasıdır (Krakstad ve ark., 2010; Maity ve ark., 2004). Semptomların türü, tümörün patolojik özelliklerinden daha ziyade tümörün konumuna bağlıdır. Bu hastalığın semptomları hızlı bir şekilde ortaya çıkabilmektedir ancak tümör belli bir büyüklüğe ulaşana kadar asemptomatik bir durumda kalabilmektedir (Krakstad ve ark., 2010; Maity ve ark., 2004).

1.2.1.3. GBM'nin Moleküler ve Sitogenetik Özellikleri

GBM'nin genetik yapısı heterojendir. Farklı hastalara ait örneklerde ve aynı tümör dokusunda farklı genetik yapı görülmektedir. Bu sebeple hastalık ‘multiform’ olarak isimlendirilmektedir (Krakstad ve ark., 2010).

Son moleküler parametreler, GBM'leri ‘primer’ ve ‘sekonder’ tipler olarak alt sınıflara ayırmaktadır (Ohgaki ve ark., 2004; Sathornsumete ve ark., 2008).

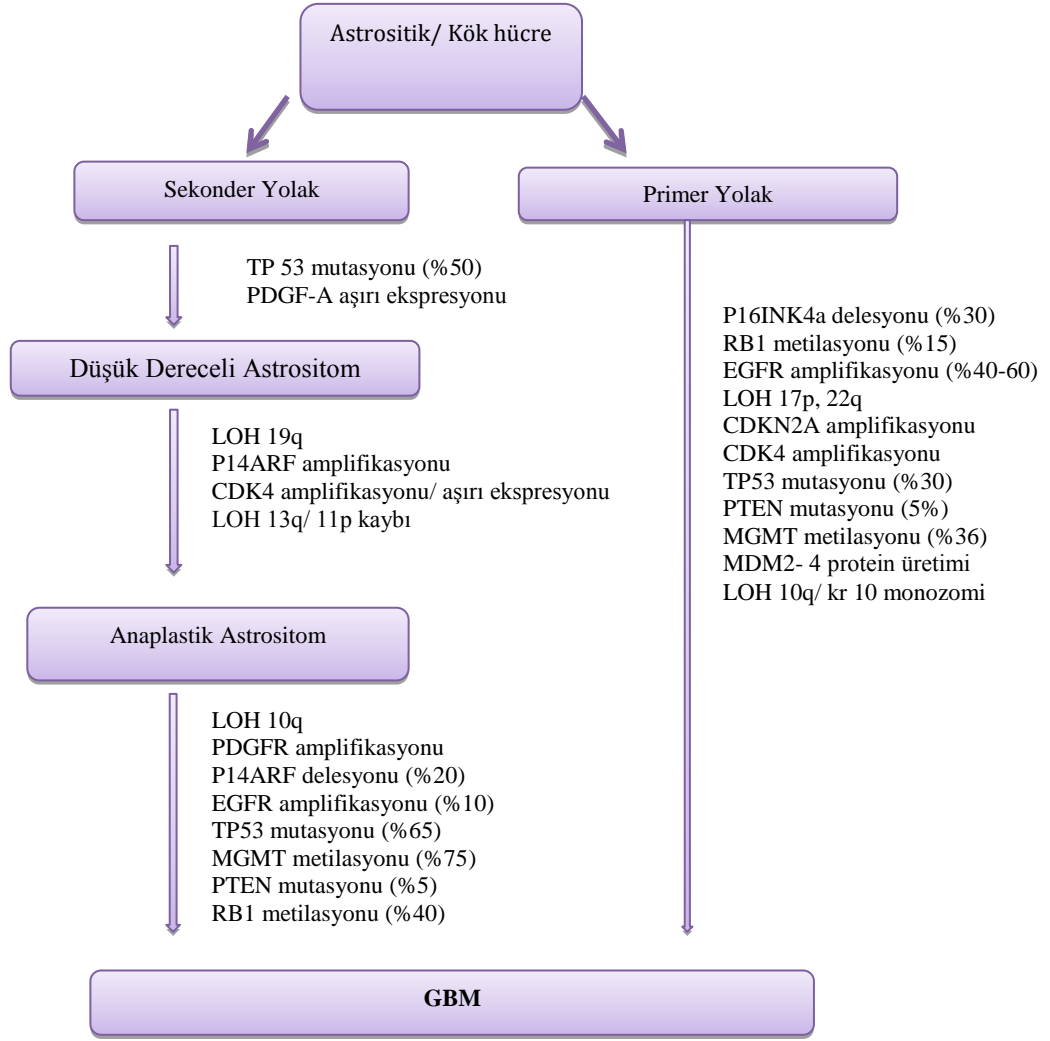
Sekonder GBM patogenezinde p53 geninde, platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü A (PDGFRA), PDGFRA ligandında çeşitli genetik değişiklikler saptanmıştır. Ayrıca p16INK4A, retinoblastom yatkınlık lokusu protein 1 (pRB1) genlerinde mutasyon, siklin bağımlı kinaz (CDK) 4/6 ve insan double minute 2 (HDM2)'de amplifikasyon, kromozom 10 delesyonları gösterilmiştir (Ohgaki ve ark., 2004; Sathornsumete ve ark., 2008). 19q kromozomundaki heterozigositlik kaybı bu grupta daha yaygın görülmektedir (Ohgaki ve ark., 2009). Ayrıca sekonder GBM'de PTEN delesyonu saptanmıştır.

Primer GBM için EGFR genin amplifikasyonu karakteristik genetik değişikliklerdendir. EGFR amplifikasyon ve aşırı ekspresyon, PTEN'de delesyonlar,

siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2 (CDKN2A) homozigot delesyonlar, kromozom 10q23'te heterozigosite kaybı (LOH), MDM2'nin ampilifikasyon sonucunda aşırı ekspresyonu ve p53 geninde mutasyon GBM'lerde en sık saptanan genetik değişikliklerdir (Durmaz ve ark, 2007).

Kromozom 10 kaybı, PTEN gen delesyonu, primer ve sekonder GBM'de saptanan ortak genetik değişikliklerdir (Ohgaki ve ark., 2009; Durmaz ve ark., 2007).

Tirozin kinazların aktivasyonu Ras onkogeni aracılığı ile mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) yolağını tetikleyerek, glia hücresinde yaşam ve büyümeyi kontrol eden genlerin ekspresyonuna neden olmaktadır. GBM'de tirozin kinaz reseptörlerinde mutasyon oluşması sinyal yolaklarının kontrolsüz aktivasyonuna neden olmaktadır. Son yıllarda, oksidatif strese karşı korumada yer alan izositrat dehidrogenaz 1 (IDH1) geninde mutasyonların da GBM ile bağlantısı dikkat çekmektedir (Ohgaki ve ark., 2009). Sitogenetik yapı bakımından GBM'lerde sayısal ve yapısal kromozomal anomaliler sık görülmektedir. t(15;19) ve t(10;19) translokasyonları ve 9p, 10p, 10q, 13q, 17p ve 19q bölgelerindeki delesyonlar sık saptanan anomalilerdir(Cavenee ve ark., 2000) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Primer ve sekonder GBM gelişmesinde meydana gelen genetik değişiklikler (Kanu ve ark, 2009).

1.2.1.4. GBM’de Bulunan En Önemli Biyolojik Belirteçler

GBM’de bulunan en önemli belirteçler çizelge 1.2’de sıralanmıştır (Weller ve ark., 2010).

Çizelge 1.2. GBM için Tanımlanan Belirteçler ve Biyolojik Rollerini (Weller ve ark, 2010).

Biyo belirteç	Biyolojik Fonksiyonu	GBM'de Önemi
<i>Tümör Doku Belirteçleri</i>		
P53	Hücre Siklusu Kontrolü Ve Dna Tamiri	Mutasyon Sekonder GBM'de Primere Oranla Daha Yaygındır
Egfr	Proliferasyon, Invazyon	Primer GBM'de Amplifikasyonu Ya Da Aşırı Ekspresyonu Yaygındır
1p/19q Translokasyonu	Biyolojik Rolü Bilinmiyor, Oligodendroglial Morfolojiye Bağımlı Eşdelesyon Ve Olumlu Sonuç	Kodelesyon Seyrek Ve Rolü Bilinmiyor
Mgmt	DNA Tamiri	Promotor Metilasyonu Sonucu Alkilleiyici Ajanlara Karşı Artan Hassasiyeti
Idh1	Biyolojik Rolü Bilinmiyor, Muhtemelen Proanjiogenik Yolaklarla Bağlantılı	Sekonder Gbm Bağlı Mutasyonlar Ve Pozitif G-Cimp
CD133	Fonksiyon Bilinmiyor, Belirteç Glioma-Öncü Hücrelerle İlişkili	Cd133+ Hücrelerin Miktarı Daha Kötü Prognoz İle İlgili
<i>Serum Belirteçleri</i>		
Metile MGMT Promoter	DNA Tamiri	Doku Testi İçin Belirteç
Vegf(R)	Anjiogenez	Anjiogenik Aktivite İndikatörü
Kollajen IV	Kan Damarlarının Bazal Membranı	Vasküler Normalizasyonun İndikatörü
Mirna	Gen Ekspresyonunun Regülasyonu	Bilinmiyor

1.2.1.4.1. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)

Epidermal büyüme faktörü (EGF) ve Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) sinyal yolu; de novo GBM gelişimine katılan temel genetik değişikliklerden biridir. EGFR “Tirozin kinaz” reseptör ailesine bağlıdır (Weller ve ark, 2010; Zhang ve ark, 2012).

Kromozom 7q12’de bulunan EGFR geninin amplifikasyonu ve proteininin aşırı ekspresyonu glioblastomların yaklaşık %35’inde bulunmuştur (Yost ve ark, 2013; Bleeker ve ark., 2012; Weller ve ark., 2010; Zhang ve ark., 2012). EGFR amplifikasyonu gösteren olguların tipik olarak kromozom 10’ da kayıpları olduğu saptanmıştır (Engström ve ark., 2012). GBM lerde EGFR amplifikasyonu %30-40’ın üzerinde bulunmuştur. EGFR amplifikasyonu primer GBM’de %39-73 iken, sekonder GBM’ de %0-9.5 düzeyinde bulunmuştur (Weller ve ark., 2010; Zhang ve ark., 2012). EGFR’ lerinin aktivasyonu hücrelerin çoğalması ve sağkalımından sorumlu mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) gibi sinyal yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır. MAPK proteinlerinde aşırı ekspresyonu gösteren hastalar, radyoterapiye karşı dirençli ve kötü prognozla uyumlu bulunmuştur. Öte yandan MAPK ve AKT aktivasyonu, anaplastik astrositomların GBM dönüşümünden sorumlu tutulmaktadır (Rivera ve ark., 2010, Acquavivı ve ark., 2011).

1.2.1.4.2. VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü)

VEGF, organların gelişim evresine ve fizyolojik aktivitesine bağlı olarak pek çok önemli biyolojik aktivitesi olan multifonksiyonel bir moleküldür. Bilinen en etkin anjiogenik sitokindir (Durmaz ve ark., 2007; Weller ve ark., 2010). VEGF ekspresyon seviyesi GBM malignite derecesi ile direkt ilişkili bulunmuş olup; GBM dokusunda VEGF’in çok fazla eksprese edildiği saptanmıştır (Franz ve ark., 2011; Crocker ve ark., 2010, Jong ve ark., 2012).

1.2.1.4.3. Ras ve PI3K/Akt

‘‘Ras association domain family protein 1’’ (RASSF1A) insan DNA tamir proteini ile etkileşime girmektedir. RASSF1A, Ras’ın apoptozdaki rolüne aracılık etmektedir. İnvazyon, hücre sağ kalımı ve proliferasyonu gibi durumları RASSF1A, PI3K/Akt üzerinden yönetmektedir. Aktif PI3K/Akt yolağı, tümör derecesinin artması, apoptozun azalmasında etkili bir yolak olarak tanınmıştır (Verhaak ve ark., 2010; Chakravarti ve ark., 2004; Rivera ve ark., 2010).

Çeşitli kanserlerin tümörogenezi, en çok promotor bölgenin metilasyonu yoluyla inaktifleşir. *RASSF1A*’nın metilasyonu gliomlar dahil farklı primer tümörlerde yüksek oranda bulunmuştur (Piperi ve ark., 2010).RASSF1A’nın metilasyonu normal dokularda nadiren görülür (Piperi ve ark., 2010).

1.2.1.4.4. P53

p53, 17p’de yerleşmiş tümör supresör genidir ve genom koruyucu olarak bilinir. Kodladığı protein p53, hipoksi, ultraviyole, radyasyon ve ilaç gibi nedenlerle hücrenin strese maruz kaldığı durumlarda p21, p14, ARF, MDM2 ve Bax aktivasyonu yaparak G1, G2 kontrol noktalarında siklusun durdurulmasına ve apoptoza neden olmaktadır. Astrositom onkogenezinde p53’ün inaktivasyonu; hücrenin G1 fazındaki kontrolünün (R noktası) değişmesi ve hücrenin kontrolsüz çoğalması ile sonuçlanmaktadır (Yost ve ark., 2013). p53 proteinin fonksiyon görmemesi için p53 geninde mutasyon veya p53 gen lokusunu içine alan allel kaybı olması gerekmektedir. Astrositomların (G II), yaklaşık 2/3’ünde p53 lokusunun içine allelde kayıp ve diğer allelinde de mutasyon saptanmıştır (Yost ve ark., 2013; Durmaz ve ark., 2007). Sonuçta yabancı p53 yokluğu, hücre çoğalmasının kontrol edilememesi ve hücrenin kendi kendini ölüme götürememesi yani bir anlamda apoptoz olayının gerçekleşmemesi ile sonuçlanmaktadır. Kromozom 17p13 lokusunda bulunan p53 geni mutasyonunun astrositik tümörler içinde en sık diffüz astrositomlarda saptanmış olması, p53’ün astrositom onkogenezinde ilk adımlardan

biri olduğunu göstermektedir (Yost ve ark., 2013;). p53 mutasyonu tüm astrositik tümörlerde gözlenmesine rağmen anaplastik astrositomda (%64) GBM multiformeden (%26) daha fazla bulunmuştur (Chun ve ark., 2013, Chen ve ark., 2013). Bu, p53'ün p16 ve p21 gibi tümör inhibitör proteinlerle uyumlu çalışmasını engelleyerek, daha malign formlara dönüşümünü açıklamaktadır. p53 genindeki mutasyon sekonder GBM'de %65 iken, primer GBM'de sadece %10 olarak bulunmuştur (Franz ve ark.,2011; Croce ve ark., 2008).

1.2.1.4.5. Kromozom 10 Kaybı

Kromozom 10'da heterozigosite kaybı GBM'lerde en sık karşılaşılan sitogenetik değişikliklerden biridir ve olguların %80'inde görülür. Bunlar en sık 10p, 10q23 ve 10q25-26 bölgesinde bulunur (Rivera ve ark., 2010). Kromozom 10'da gözlenen bu kayıplar primer ve sekonder GBM'lerde eşit sıklıkta gözlenmiştir (Rivera ve ark., 2010). Ancak 10. kromozomun bir allelinin kaybı (monozomi) daha çok primer GBM'lerde rapor edilmiştir (Rivera ve ark., 2010). Kayıplar düşük dereceli astrositomlarda nadiren saptanırken anaplastik astrositomlarda %40 düzeyinde bulunmuştur (Rivera ve ark., 2010).

PTEN geni kromozom 10q23.3 bölgesinde yerleşmiş tümör baskılayıcı genidir ve iki araştırmacı tarafından 1997 yılında saptanmıştır (Chun ve ark., 2013, Chen ve ark., 2013).. PTEN lokusunun kaybı, gliblastomlarda %80 dolayında bildirilmesine rağmen PTEN mutasyonu %20–30 dolayında ve daha yaşlı hastalarda rapor edilmiştir (Chun ve ark., 2013, Chen ve ark., 2013). Ancak PTEN geni mutasyonu primer GBM'de %32, sekonder GBM'de %4 dolayında bulunmuştur (Naik ve ark., 2012). Öte yandan primer GBM'de 10. kromozom'un q ve p kolunu içeren tüm bir allelinin kaybına karşın, sekonder GBM'de HK (heterozigosite kaybı), kısmi delesyonlarla sadece q kolunda bulunmuştur (Rivera ve ark., 2010). p53 mutasyonu gösteren GBM'lerde PTEN lokusu dışında özellikle 10q25-qter bölgelerinde kayıplar saptanmıştır ki bu sekonder GBM gelişiminde başka tümör baskılayıcı genlerin varlığını düşündürmektedir (Durmaz ve ark., 2007).

1.2.1.4.6. 1p ve 19q Kaybı

Oligodendrogliomalar ve anaplastik oligodendrogliomalar genellikle eş zamanlı 1p ve 19q kromozom delesyonları (%80'e varan) taşımaktadır (Perry ve ark., 2012; Durmaz ve ark., 2007; Terada ve ark., 2002). Çoğu olguda, bu delesyonlar 1p ve 19q kollarının tamamını kapsamaktadır (Perry ve arki, 2012; Durmaz ve ark., 2007; Terada ve ark., 2002). Bu olay kromozom 1p ve 19q kolları arasındaki dengesiz translokasyon ile sonuçlanmaktadır. $[t(1;19)(q10;p10)]$. 1p/19q kodelesyonu, bir hibrit kromozomun kaybına öncülük eder ve düşük dereceli astrositomların, anaplastik astrositom veya GBM'lere dönüşümünde rol oynamaktadır. Kromozom 19q'da ki bu kayıp; sekonder GBM'lerin %54'ünde gözlenirken, primer GBM lar %6 düzeyinde saptanmıştır (Durmaz ve ark., 2007; Terada ve ark., 2002; Perry ve ark., 2012).

1.2.1.4.7. Kitinaz 3-like 1 (CHI3L1)

Kitinaz benzeri protein GBM'de diğer MSS tümörleriyle karşılaştırıldığında, GBM'de aşırı eksprese edilen bir gen ürünüdür. CHI3L1 tümör kitlesinin belirteçi olarak önerilmiştir (Ducray ve ark., 2011).

1.2.1.4.8. İzositrat Dehidrogenaz (IDH)1/2 Mutasyonu

İzositrat dehidrogenaz, Krebs devrine katılan bir enzimdir. Nikotinamid Adenin dinükleotid (NAD⁺) NADH'a dönüşürken, α -ketogluterat ve CO₂ üreterek izositratın oksidatif dekarboksilasyonunu katalizler. GBM'lerin %6-12'sinde bu mutasyon belirlenmiştir (Rivera ve ark, 2010). Sekonder GBM'de %50-88 oranında görülen bu mutasyon primer grupta %3-7 oranında saptanmıştır (Ichimurave ark, 2009). Tüm gliomlarda, IDH mutasyonu olan tümörler, yaban tip içerenlere oranla daha az agresiftirler (Labussiera ve ark., 2010; Weller ve ark., 2010). IDH1 mutasyonu, bilinen klinik ve moleküler prognostik faktörlerden sonra sağ kalım ile

ilişkili olduğu gösterilen bir mutasyondur (Rivera ve ark., 2010). IDH statüsünü belirlemek, radyoterapi (RT) ya da kemoterapi (KT)'ye verilen yanıtları tahmin etmeye yardımcı değildir.

1.2.1.4.9. MGMT (Metil Guanin Metil Transferaz)

Metil Guanin Metil Transferaz, enzim benzeri ve nispeten stabil bir proteindir (Kaina ve ark., 2010, Perry ve ark., 2012). Ribozomlarda sentezlendikten sonra sitoplazmadan çekirdeğe geçer. MGMT, hücrel genomu alkilleyici ajanların mutajenik etkilerinden koruyan en önemli DNA tamir proteindir (Dunwell ve ark., 2010, Kaina ve ark., 2007, Parkinson ve ark., 2008). GBM hastalarında önemli değişim, DNA tamir enzimi olan MGMT'nin metilasyonudur. MGMT, alkilleyici ajanların sebep olduğu DNA hasarını tamir ederek bu moleküllere karşı gelişen direnç mekanizmasından birini oluşturmaktadır (Marchesi ve ark., 2007, Prittchet ve ark., 2012, Yan ark., 2013). Kanser hücrelerinde ise tedavi etkilerine karşı direnç gelişmesine neden olmaktadır. GBM'lerdeki ilk çalışmalarda MGMT promotor metilasyonunun kemoterapiye cevapta bir prediktif faktör olabileceği düşünülmüştür. Son çalışmalarda ise metilasyonun, radyoterapi ve kemoterapi'ye cevapta iyi bir prediktif marker olduğunu gösterilmiştir (Hasse ve ark., 2010; Weller ve ark., 2010; Ducray ve ark., 2011; Rosell ve ark., 2008; Sonoda ve ark., 2009).

1.2.1.4.10. Beklin-1

Beklin-1, önemli metabolik yollardan biri olan otofajide diğer moleküllerle kompleks halde vezikül formasyonunu sağlayan ve otofajinin varlığını saptmada kullanılan bir belirteçtir (Liang ve ark., 2008; Kang ve ark., 2011). Otofaji, stresin indüklediği katabolik bir işlemdir ve tüm ökaryotlarda korunmuş bir mekanizmadır. Besin yokluğu gibi uygun olmayan koşullarda adaptif cevap olarak ortaya çıkan otofaji, lizozomlar aracılığı ile gerçekleşen "kendini-yeme" mekanizmasıdır (Levine ve ark., 2004). Otofagozom denen çift membranlı veziküller, uzun ömürlü proteinler,

hasarlı organeller ve invaziv patojenler gibi kargoları lizozomlara taşır. Otofagozomun dış membranı lizozomal membran ile kaynaşır ve otolizozomları oluştururlar, iç membran ise kargo ile birlikte degrede edilir (Hoyer ve ark, 2007). Sonuçta makromoleküller açlık durumunda yeniden kullanılmak üzere sitozole geri bırakılır. Hücrenin sağkalımı için başlattığı bu mekanizma metabolik fonksiyonların normale dönmesi için yeterli olmasa, hücre otofajik veya apoptotik yolları aktive ederek ölüme gider. Bu sebeple Beklin-1 gibi otofajik belirteçler hücre ölüm yolağını belirlemede kullanılabilir.

İnsan astrositik tümörlerinde Beklin-1 geninin ekspresyon seviyesi, hastalığın derecesi ile direkt olarak ilişkili bulunmuştur. Beklin-1'in düşük ekspresyon seviyesi hastalığın kötü prognozuyla paralellik gösterirken, bu genin yüksek seviyede ekspresyonu hayatta kalma süresini arttırmakla direkt olarak ilişkide olduğu gösterilmiştir (Pirtoli ve ark, 2009). Dolayısıyla Beklin-1 geninin kaybı otofaji mekanizmasında defektler yaratmaktadır. Yapılan çalışmalara dayanarak, otofaji mekanizmasında oluşabilecek herhangi bir defektin, hastalığın progresyonu ve tümörün inhibisyonuyla bağlantılı olduğu söylenebilir. Ama buna rağmen otofaji genelde onkogenler tarafından inhibe edilir. Beklin-1, otofaji mekanizmasında tümör süpresör olarak anahtar role sahiptir. Beklin-1 ekspresyonu astrositik tümörlerde özellikle hastalığın dereceleriyle direkt olarak ilişkide bulunmaktadır (Hoyer ve ark, 2007). Beklin-1, biyo-belirteç olarak anlamlı şekilde hastalığın derecesini göstermektedir. Üç yıldan fazla sağkalıma sahip olan hastalarda Beklin-1 yüksek ekspresyon göstermektedir. Sonuç olarak glioma hastalarında otofaji kapasitesi direkt hastalığın progresyonuyla ilişkidir (Huang ve ark, 2010; Takeuchi ve ark, 2005; Chen ve ark, 2009).

1.2.1.5. Prognoz

GBM, tedavisi zor kanserlerden biridir, yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir. Hastalığın küratif tedavisi yoktur (Gross ve ark., 1998). Hastaların yaşam süresi, en gelişmiş tedavi uygulamalarına rağmen ortalama 14.6 aydır (Blumenthal

ve ark, 2005; Weller ve ark, 2010; Stupp ve ark., 2002). Tanıdan sonra hiçbir tedavi olmaksızın ortalama hayatta kalım süresi 3 aydır. Rezeksiyonun derecesi hayatta kalmayı en çok etkileyen faktörlerden biridir. (Burger ve ark., 2002; Sonoda ve rak., 2009; Esteller ve 2002). Artan yaş (>60 yaş) daha kötü prognostik risk taşımaktadır. Ölüm, genellikle serebral ödem veya artan intrakraniyal baskıdan dolayı gerçekleşmektedir (Burger ve ark., 2002).

1.2.1.6. Metastaz ve Yayılım

İnfiltratif yayılma bütün diffüz astrositik tümörlerin ortak bir özelliği olsa da, GBM'lerin komşu beyin yapılarına hızlı invazyonları yaygındır. Tümörün korpus kallozum boyunca kontralateral hemisferlere bilateral yayılması yaygın bir özelliktir. İnternal kapsül, forniks ve anterior komissurda yayılım görülebilir. Subaraknoid boşluk nadiren tutularak serebrospinal sıvı yoluyla metastaz olabilir. Perivasküler boşluklar içinde ve boyunca ilerlemesi tümör infiltrasyonunun başka bir özelliğidir. Damar lümenlerinin invazyonu ise nadir görülür. Ventriküloperitoneal şant yoluyla peritoneal metastaz gözlenmiştir. Duraya, venöz sinüse ve kemiğe penetrasyon yapabilmektedir (Burger ve ark, 2002; Kleihues ve ark, 2007).

1.2.1.7. GBM Tedavisi

Yıllar boyuca olgularda standart tedavi olarak cerrahi ve radyoterapi kullanılmaktaydı (Hasse ve ark., 2010; Krex ve ark., 2007), günümüzde mümkün olan en geniş cerrahi rezeksiyon sonrasında radyoterapi ve uygun olan hastalarda kemoterapi uygulaması tercih edilmektedir (Gross ve ark., 1998; Levin ve ark., 2001).

1.2.1.7.1. GBM Tedavisinde Cerrahi

Cerrahi tedavisinde amaç, nörolojik bozukluğa neden olmadan tümörün maksimum oranda çıkartılmasıdır (Levin ve ark., 2001). Tümörün boyutu ve lokalizasyonuna göre kısmi veya total rezeksiyon şeklinde yapılır (Weingart ve ark., 1993).

GBM'nin infiltratif yapısı nedeni ile tamamının çıkartılması neredeyse imkansızdır. Geniş bir cerrahi sonrasında bile alınamayan mikroskopik bir tümör rezidüsü nükse neden olmaktadır. Cerrahi sonrası nüksü ve kalan tümör parçasının etkinliğini ortadan kaldırmak için radyoterapi ve kemoterapi uygulanmaktadır (Hirose ve ark., 2001; Oh ve rak., 1999).

1.2.1.7.2. GBM Tedavisinde Radyoterapi

Cerrahi uygulamaya radyoterapinin eklenmesi, ana tedavi yaklaşımıdır. Ancak sadece biyopsi yapılan olgularda radyoterapi, tek tedavi yöntemidir. Böylece hastaların ortalama sağkalım süreleri artmakta ve yaşam kalitelerinde düzelme görülmektedir (Leibel ve ark., 1994; Byrne ve ark., 1994).

1.2.1.7.3. GBM Tedavisinde Kemoterapi

Günümüzde primer GBM olgularında, cerrahi sonrası sırasıyla veya aynı anda radyoterapi ve kemoterapi uygulaması standart tedavi modelidir (Hegi ve ark., 2005).Yüksek dereceli beyin tümörlerinde kemoradyoterapinin yalnızca radyoterapi uygulamasına göre sağ kalım oranını %10 arttırdığı saptanmıştır (Weingart ve ark., 1993). Kemoterapötik maddenin seçimi, dozu, uygulama süresi ve hastanın genetik yapısı kemoterapi sürecini doğrudan etkileyen unsurlardır (Oh ve ark., 1999).

Genel olarak GBM'nin küratif bir tedavisi yoktur ve belirtileri hastalığın son aşamalarında kendini göstermektedir (Gross ve ark., 1998). Bunun en önemli nedenlerinden birisi GBM'nin her açıdan (klinik, genetik, tedavi) heterojen bir yapısının olmasıdır. Standart tedavi yaklaşımlarına rağmen başarısızlığın en önemli nedeni, tümörün lokal kontrolünün sağlanamamasıdır (Krakstad ve ark., 2010). Bu güne kadar GBM için kanser hücre serilerinde ve fare modellerinde yapılmış araştırmalara rağmen kesin bir tedavi protokolü elde edilmemiştir (Van noort, 2006). Çünkü, araştırmaların yapıldığı kanser hücre serileri elde edilirken hastadan izole edilen hücreleri çoğaltmak için onkogen aktivasyonu ve buna ek olarak büyüme faktörleri kullanılmaktadır ve bu uygulama hücrelerin asıl in vivo karakterinden uzaklaşmasına neden olmaktadır (Van noort, 2006). Fare modellerinde yapılan çalışmaların eksikliği ise fare genomunun insan genomu ile farklılık göstermesi ve bunun sonucunda tedaviye insan ile birebir örtüşen bir sonuç vermemesidir. Bu eksikliklere rağmen GBM hastalığının tedavisi için araştırmalar halen devam etmektedir. Standart tedavi protokollerinin yanı sıra, farklı tedavi yöntemleri de deneysel düzeyde kullanılmaktadır.

Bitkisel tedavi, alternatif ve tamamlayıcı tedavi yöntemleri arasında yer almaktadır (Nirmala ve ark, 2011; Yang ve ark, 2010). Son yıllarda bitkilerin kanser tedavisinde kullanılabilecek önemli doğal kaynaklardan biri olduğu kanıtlanmıştır (Nirmala ve ark, 2011; Yang ve ark, 2010). Bitkisel ilaçlar, birçok kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçların toksisitesini azaltabilmektedirler. Ayrıca bazı bitkisel ilaçların kanser tedavisinde, kemoterapötik ilaçlara göre daha az toksisiteye sahip olmaları nedeniyle kullanımları mevcuttur (Tanker ve ark., 1998).

Şimdiye kadar bitkilerden izole edilen çok sayıda bileşik, araştırma aşamasında bulunmaktadır. Bu anti-kanser amaçla kullanılan bileşikler, çeşitli kanser hücre serilerinde ve deneysel fare modellerinde klinik açıdan etkili bulunmuştur. Bu alanda yapılacak daha kapsamlı araştırmalar, kanserin tedavisinde ilerlemeye yol açabilir görüşü bazı bilim adamları tarafından kabul görmektedir (Yang ve ark., 2010; Nirmala ve ark., 2011).

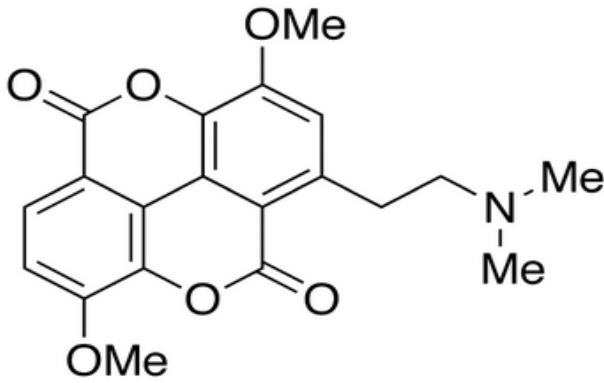
1.2.1.8. Kanser Tedavisinde Bitkisel İlaçların Kullanımı

İlaç hammaddeleri genellikle organik yapıda maddelerdir. Bununla beraber inorganik yapıdaki maddelerden bazıları da ilaç hammaddesi olarak kullanılır. Organik ilaç hammaddelerinin bir kısmı doğal kaynaklardan elde edilir; bir diğer kısmı ise sentez yöntemiyle hazırlanır. Genellikle doğal ürünler, yeni öncü bileşikler ve yeni kimyasal maddelerin keşfi için önemli rol oynamaktadırlar. Doğal kaynaktan elde edilen ilaç hammaddeleri Glusitler, Flavonoidler, Terpenler, Saponinler, Proteinler, Antibiyotikler, Uçucu yağlar, Lipitler, Alkaloidler'e ayrılmaktadır.

1805'te Friederich Wilhelm Sertürner adında bir Alman eczacısı Opium üzerindeki çalışmaları sırasında kristalize bir madde elde etmiştir. Bütün bu sekonder alkalik bileşiklere alkaloid adı verilmiştir. Alkaloidler bitkilerden elde edilen, kuvvetli fizyolojik ve farmakodinamik aktivite gösteren maddelerdir.

Alkaloidlerin, afrodisyak, analjezik, damar genişletici, antihipertansif, uyarıcı, nikotinik asetilkolin reseptörü agonisti, idrar söktürücü, adenozin reseptör antagonisti, asetilkolinesteraz inhibitörü olmasının yanı sıra anti kanserojenik etkilerinin de olduğu saptanmıştır. Taspine, bu sınıf içerisinde yer alan ve önemli farmakolojik özellik gösteren bir alkaloidtir. Taspine (Şekil 1.5) bir alkaloid olarak, Orta Asya, İran, Afganistan, Güney Amerika ülkelerinde, ve özellikle ilk kez Çin'de *Rhizoma leontics*'ten izole edilmiştir. Manolya × Soulangeana ve Croton lechleri gibi çeşitli bitkilerde bulunmaktadır (Zhang ve ark., 2010; Zhan ve ark., 2012; He ve rak., 2011).

Farmakolojik olarak anti-inflamatuvar, antiviral, antiproliferatif ve yara iyileştirici etkilere sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Zhan ve ark., 2012; He ve rak., 2011).



Şekil 1.5.Taspine'in kimyasal yapısı

Çeşitli kanser tipleri üzerinde yapılan az sayıdaki *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarında, Taspine'in hücre bölünmesi, tümör büyümesi ve angiyojeniz yolları ile ilişkili olduğu saptanmıştır.

Epidermal karsinoma hücre serisinde yapılan bir çalışmada, Taspine'in tümör anjiyogenezini ve hücre proliferasyonunu engellediği, aynı zamanda apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Yanmin Zhang ve arkadaşları, 2011).

Kolorektal adenokarsinoma hücre serisi üzerinde yapılan çalışmada ise Taspine'in farklı bir türevi olan Tas41 uygulaması sonrası, apoptozun indüklendiği ve anjiyogenezin anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir (Yanmin Zhang ve arkadaşları, 2011).

Fare üzerinde ve akciğer kanseri hücre serisi üzerinde yapılan başka bir çalışmada, yeni bir sentetik Taspine türevinin (HMQ1611) hücre proliferasyonunu, tümör büyümesini ve aynı zamanda doku vaskülarizasyonunu önemli ölçüde engellendiği gösterilmiştir (Lu ve ark, 2012).

Farede ve karaciğer hücre serisi üzerinde yapılan çalışmada Taspine'in türevi olan Tas13D'nin, apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir (He ve ark, 2009).

Hepatoma (Zheng ve ark, 2012), akciğer kanseri (Zhang ve ark, 2008, Zheng ve ark, 2012), meme kanseri (He ve ark, 2011, Zheng ve ark, 2012), mesane kanseri (Zhang ve ark, 2010, Zheng ve ark, 2012) üzerinde yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda Taspine'nin bir türevi olan Tal722'nin anti-proliferatif ve anti-anjiyogenik etkisi gösterilmiştir (Zheng ve ark, 2012).

Taspine'in bir türevi olan HMQ18-22'nin kolorektal kanseri olan farelerde, anjiyogenezi anlamlı derecede azalttığı, kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği ve buna bağlı olarak tümör gelişimini engellediği gösterilmiştir (Zhang ark, 2012).

Taspine'nin melanoma ve kolon kanseri hücre serisi üzerinde anti-proliferatif etkisi olduğu saptanmıştır (Montopoli ve ark, 2012).

Yapılan bu çalışmalarda Taspine'in anti-tümörijenik ve anti-anjiyogenik aktivitesi kanıtlanmıştır. Kanser ilerlemesinde anjiyogenezin önemli derecede etkili olduğu bilinmektedir. GBM tümör dokusunda anjiyogenezden sorumlu olan genlerin 50 kat fazla eksprese olduğu saptanmıştır (Franz ve ark, 2011). Özellikle anjiyogenez ile ilişkili olan genlerin ve olası mekanizmalarının, bu hastalığın malignite derecesiyle direkt ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bunun yanında hücre bölünmesi ve apoptoz mekanizmasından sorumlu olan genlerin GBM'da mutasyona uğradığı ve bu değişimin hastalığın gelişiminde önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (Franz ve ark, 2011).

Bu tez çalışmasında, antiproliferatif ve antiangiogenik etkileri GBM dışında diğer bazı kanserlerde gösterilmiş olan Taspine'in, anjiyogenez ile ilgili genlerin çok fazla eksprese olduğu GBM üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar

Taspine : TRC marka No:T007800

Besi yeri: Hyclone marka, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) / Yüksek Glukoz (+4,00 mM L-Glutamin, +4500mg/L Glukoz, + Dodyum Pirüvat), No: 30243.01

Besi yeri: Hyclone marka, Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (L-Glutaminsiz)

Fötal Dana Serumu (FBS): Hyclone marka, No: SV20160.03

L-Glutamin: PAA marka, 200 mM (100X), No: M11-004

Penisilin-Streptomisin: PAA marka. No: P11-010

Petri kutusu: Isotherm marka, 90 mm çap, steril

Bistüri: AE marka, karbon çelik, 11 numara

Tripsin: Biological Industries marka, No: 41-920-5

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA): Applichem marka, No: 6381-92-6

Tripsin- EDTA karışım oranı: %0.25 Tripsin + %0.1 EDTA

Flask (75 cm²): Orange Scientific marka, No: 5520200

Flask (25 cm²): Orange Scientific marka, No: 5520100

Hücre Dondurma Tüpleri: Greiner bio- one marka, 2 ml

Dimetilsülfoksit (DMSO): Applichem marka, No: 67-68-5

Fosfat Tuz Tamponu (PBS) (pH: 7,4) (Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ içermeyen): 140mM NaCl (Gerbu marka, Lot No: 210307) 3 mM KCl (Carlo Erba marka, No: 7447-40-7) 3

mM KH_2PO_4 (Carlo Erba marka, No: 7778-77-0) 6.4mM NaHPO_4 (Carlo Erba marka, No: 10028-24-7).

Kullanılan GBM Hücre Dizileri: Çalışmamızda 2 adet GBM hücre dizisi kullanılmıştır. Kullanılan hücre dizileri U- 118 MG, U87MG (U87)'dir. Bu hücrelere ait genel özellikler Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan hücre dizilerinin özellikleri

	U-118 MG	U87 MG
Organizma	İnsan	İnsan
Cinsiyet, Yaş	Erkek, 50	Bayan, 44
Doku	Beyin	Beyin
Morfoloji	Karışık	Epitel
Yüzey tutunma	Yapışan hücreler	Yapışan hücreler
Tümörjenik	Evet	
Karyotip	Pentaploidiye yakın, kr.X 2 kopya, kr.Y yok, kr.10 tek kopya	Hipodiploid
Besi yeri	RPMI-1640, % 10 FBS	DMEM (düşük glikoz)-, % 10 FBS
Besi yeri yenileme süresi	Haftada 2-3 kez	Haftada 2-3 kez
Pasaj metodu	%0.25 Tripsin + %0.1 EDTA	%0.25 Tripsin + %0.1 EDTA
Ayrırma oranı	1:3 – 1:6	1:2 – 1:5
Biyogüvenlik düzeyi	1	1

2.1.1. Hücre Kültürü

Hücreleri çoğaltmak için hazırlanan besiyeri:

U-118 MG için, RPMI-1640 %10 FBS, %1 Penisilin – Streptomisin, %1 L-Glutamin

U87 MG için, DMEM besiyeri, %10 FBS, %1 Penisilin – Streptomisin, %1 L-Glutamin

Hücre dondurma solüsyonu: %90 FBS ve %10 DMSO

Tranfer Pipeti: Citotest marka, 155 mm, Lot No: 090036

Serolojik Pipet: Greiner bio-one, 5 ve 10 ml'lik

Sterilizasyon amaçlı Etil Alkol (%75'lik): Riedel-de Haen, No: 64-17-5

15 ve 50 ml'lik steril tüpler: Sarstedt marka, No: 62.554.502 (15 ml), Sarstedt marka, No: 62.547.254 (50 ml)

Hücre kültür işleminde steril kabin olarak Holten S-20100 1,8, CO₂' li etüv olarak Sanyo MCO-20 AIC ve ters mikroskop olarak Nikon TS 100 kullanıldı.

2.1.2. [3-(4,5- Dimethyldiazol-2-yl)-2,5 Diphenyl Tetrazolium Bromid] MTTSitotoksisite Testi

MTT tozu: Bioworld marka, No: 42000092-2

MTT solüsyonu: 5 mg toz MTT 1 ml steril PBS içerisinde çözüldü ve filtre edilerek (0.20 µm'lik) kullanıldı.

MTT besiyeri karışımı (96'lık plaka her bir kuyucuk için): 10 µl MTT solüsyonu (5mg/1ml) 90 µl besi yeri

DMSO: Applichem marka, No: 67-68-5

96 kuyucuklu plak: Orange Scientific marka, No: 5530100

2.1.3. RNA İzolasyonu

Tri-reagent RT: Molecular Research Center Marka, No: RT 111.

BAM (4-bromoanisole): Molecular Research Center marka, No: BN 191

İsopropanol: Merk marka, No: K37727334

Etil Alkol (%75'lik, soğuk): Riedel-de Haen, No: 64-17-5

Diethylpyrocarbonate (DEPC): Applichem marka, No: 1609-47-8

2.1.4. RNA Kantitasyonu

RNA miktarının ölçümü spektrofotometre yardımıyla yapıldı.

RNA izolasyonunda Eppendorf 5415R marka soğutmalı satrifüj kullanıldı.

2.1.5. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

cDNA sentezi için Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kiti kullanıldı.

Bu izolasyon için kit dışında sarf malzeme olarak 200 µl'lik ependorf tüpler ve steril dH₂O kullanıldı.

2.1.6. Gerçek Zamanlı PZR (RT_PZR)

RT_PZR için, Roche marka Light Cycler 480 cihazı kullanılarak yapıldı.

2.1.7. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz, normal erime sıcaklığına sahip: Pronase marka, Lot No: 084518PR

TEB solüsyonu (pH: 7.5): Tris baz (Biobasic marka, No: 77-86-1)

Yükleme tamponu: 1XTBE solüsyonu, 100 ml

Etidyum Bromür: 10 mg/ml (İnvitrogen marka, No: 15585-011)

DNA marker: Jena Bioscience marka, No: M-213, 50 baz çifti (bç)'lik

%1'lik agaroz jel: 1 gr Agaroz, 100 cc 1XTBE (Tris Borik Asit EDTA), 2.5 µl
Etidyum bromür

2.1.8. Tek Hücre Jel Elektroforezi (KOMET)

Agaroz, normal erime sıcaklığına sahip: Pronadisa, No: 8012

Agaroz, düşük erime sıcaklığına sahip: Sigma marka, A0701

Lamel: Isotherm marka, 24X32 mm

Tris-Borik Asit EDTA (TBE) solüsyonu: Tris baz (Biobasic marka, No: 77-86-1) (pH: 7.5) Borik asit (Amresco marka, No: 10043-35-3) Na₂EDTA (Merk marka, No: 324503)

DTT (Dithiothreitol): Fermentas, No: R0861

Sodyum Lauril Sarkozinat: Amresco, No: 137-16-6

Lamların Hazırlaması: Lamlar %1'lik normal erime sıcaklığına sahip agaroz ile oda sıcaklığında kaplanmıştır. 100 ml PBS içerisinde hazırlanmış %1'lik normal erime sıcaklığına sahip agaroz bir şale içerisinde aktarılmıştır. Kullanılacak olan temiz lamlar bu şale içerisine yaklaşık 2 saniye batırılmış ve 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Lizing solüsyonu (soğuk): NaCl (2.5 M/L), EDTA (0.1 M), Tris (0.01 M), Triton X-100 (%1), Sodyum Lauril Sarkozinat (%1), DTT (%0.14)

Ayrıca kullanılan plastik tüpler, PBS, Triton-X 100, Lam, Proteinaz K (20 µg/ml), NaOH, NaCl, Tris, EDTA, TBE ve Etidyum Bromür (8 µg/ml) malzemelerine ait bilgiler yukarıda belirtilenlerin aynısıdır.

2.1.9. Sitogenetik Analizi

Sitogenetik analizi için ekstra gereçler:

Kolşisin: Biological Industries / Israel, No: 12-003-1C

Metanol: Merck/Germany, No: 53350

Asetik asit: Merck/Germany, No: K 40332763

Trypsin: Biological Industries marka, No: 41-920-5

Giemsa: Biostain/ A.B.D, No: 1.0920412500

KCl (Carlo Erba marka, No: 7447-40-7)

2.2. Yöntemler

2.2.1. Hücre Kültürü

- Kültür flasksı %70 oranında hücre ile kaplanınca pasaj işlemi yapıldı. Bunun için hücrelerin üzerindeki besiyeri atılarak steril PBS (Ca^{++} ve Mg^{++} içermeyen) ile hücreler yıkandı.
- PBS yıkanmasından sonra PBS alınarak 25 cm²'lik flaska 0.4 ml, 75 cm²'lik flaska 1 ml Trypsin/EDTA eklenmiş ve 37 °C'de 5 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında birbirlerinden ve tutundukları yerden kopan hücrelerin üzerine Trypsin/EDTA miktarı kadar medyum eklendi.
- Hücreler 1200 rpm (revolutions per minute, dakikadaki devir sayısı)'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısım atıldı. Hücrelerin bir kısmı dondurmak üzere ayrıldı. Geri kalan kısmın üzerine serolojik pipet yardımıyla pasaj yapılacak flask sayısına göre kültür medyumunu eklenerek karıştırılmıştır. Karıştırıldıktan sonra hücreler flasklara homojen biçimde dağıtıldı.
- Dondurulacak hücre popülasyonunun üzerine dondurma solüsyonu eklenerek karıştırılmıştır ve sonrasında özel dondurma tüplerine aktarıldı. Bu tüpler, buz içerisinde -20 °C'de 1 saat ve -80 °C'de 24 saat tutulduktan sonra likit nitrojen bulunan tanklara aktarıldı.

2.2.2. MTT ile Sitotoksisite Testi

Taspinin'nin hücreler üzerindeki sitotoksisite düzeylerini (IC50=İnhibitör doz) saptamak amacıyla MTT yöntemi kullanıldı. Bu amaçla aşağıda yer alan protokol izlendi.

Hücre kültüründe elde edilen hücre dizilerine ait hücrelerden 96 kuyucuklu plakın her bir kuyucuğuna 20.000 hücre olacak biçimde 100 µl hücre besiyeri ile karıştırılarak ekim yapıldı. Plak kuyucuklarına hücrelerin homojen bir biçimde yayılması sağlandı. Bu hücrelerin 37 °C'de, %5 CO₂'li etüvde bir gece yapışmaları beklendi.

Bekleme süresi sonrasında yapışan hücrelerin üzerindeki besiyeri alınarak farklı konsantrasyonlarda Taspin içeren besiyerleri eklendi. Hazırlanan ilaç konsantrasyonları 1, 2.5, 5, 7.5, 10µM Taspin'dir. İlaçlar 24 saat, 48 saat ve 72 saat aralıklarla uygulandı. Bunların yanı sıra kontrol amaçlı ilaç verilmeyen kuyucuklara ilacın çözücüsünden aynı oranda uygulandı (<0,001). Hazırlanan farklı ilaç konsantrasyonlarının her biri için en az 5 kuyucuk kullanıldı. Bu süre sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri alınarak daha önce hazırlanan MTT solüsyonu (5mg/ml) toplam besiyeriyle karıştırılıp ve hücrelerin üzerine bırakıldı. MTT hücre besiyeri karışımı toplamda 100 µl'dir.

- Plak 37 °C'de, %5 CO₂'li etüvde 2 saat bekletildi.
- Bu süre sonunda plak alınıp kuyucukların üzerindeki MTT hücre besiyeri karışımı atıldı ve her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi.
- Tüm kuyucuklar karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede 550 ve 690nm'de ölçüm yapıldı.
- Spektrofotometrik analiz: Spektrofotometrede boş ve hücre içeren kuyucuklardan elde edilen veriler GraphPad Prism programında değerlendirildi, taspinin farklı hücrelerdeki sitotoksisite değerleri hesaplandı.

2.2.3. RNA İzolasyonu

RNA izolasyon işlemi son derece temiz bir ortamda gerçekleştirildi. kullanılan bütün malzemelerin RNAas açısından steril olmasına dikkat edildi. Hücre kültüründen elde edilen hücreler 6'lık plaklara ekildikten sonra MTT sonucunda saptanan konsantrasyonlarda ilaç kombinasyonları uygulandı. İlaç uygulandıktan ve 24 saat bekledikten sonra aşağıdaki protokol izlenerek RNA izolasyonu yapıldı.

- Hücre kültüründe, 6'lık plaklarda bulunan ve ilaç uygulandıktan sonra 37 °C %5 CO₂'li etüvde bekletilen hücrelerin süre sonunda üzerlerindeki besiyeri alınmış ve atıldı.
- Kalan hücrelerin üzerine "Tri Reagent" isimli solüsyondan 1 ml eklenmiş ve mikropipet yardımıyla karışması sağlandı. Bu karışım 2 ml'lik yeni, steril bir ependorf tüpüne aktarılarak 10 dakika kadar bekletildi.
- Bu süre sonunda, bu tüpün üzerine, 4-bromoanisole solüsyondan 50 µl eklenmiş ve hızlı bir şekilde, 15 saniye boyunca el yardımıyla kuvvetlice karıştırılmış ve 10 dakika kadar bekletildi.
- Bekleme işlemi sonunda +4 °C'de, 12.000 rölatif satrifüj gücünde (rcf, relative centrifugal force) 15 dakika santrifüj edilmiş ve sonunda tüplerde 3 faz oluşmuştur. En üstte kalan berrak fazda RNA, ortada kalan köpük rengindeki kısımda DNA ve en alta kalan kırmızı renkli kısımda ise protein bulunmaktadır.
- Üst berrak kısımdan yaklaşık olarak 500 µl alınıp yeni, steril bir 2 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı. Bu işlem sırasında DNA kontaminasyonu önlemek için DNA olduğu belirtilen kısma yaklaşılmamalıdır.
- RNA'nın yer aldığı yeni ependorf tüpüne 500 µl soğuk izopropanol eklenmiş ve tüp hafifçe alt üst ederek karıştırıldı. Bu karışım 10 dakika kadar oda ısısında bekletildi.
- Bekleme sonunda tüp +4 °C'de, 12.000 rcf'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve satrifüj sonunda tüpün üst kısmı (dip kısmına yaklaşılmadan) yavaşça döküldü. Tüpün üzerine 1 ml %75'lik soğuk etanol eklenip alt üst edilerek karıştırıldı. Bu aşamada RNA çıplak gözle görülebilir hale geldi.

- Bu karışım +4 °C’de 7.500 rcf’de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda tüpün üst kısmı dip kısmına yaklaşılmadan yavaşça mikropipet yardımıyla atıldı ve tüp kurumaya bırakıldı.
- Yaklaşık 5-10 dakika sonunda 50 µl steril, DEPC ile muamele edilmiş distile su eklenerek RNA’nın çözülmesi sağlandı.
- Elde edilen 50 µl hacmindeki RNA’nın 4 µl kadarı başka bir temiz 200 µl’lik ependorf tüpüne aktarıldı. Bu işlem ana stoğun sürekli dondurma ve çözünme süreçlerine maruz kalmasını önlemek için yapılmaktadır. Ayrılan bu RNA miktarı agaroz jelinde RNA kalitesinin değerlendirilmesi ve spektrofotometrede ölçülmesi için kullanıldı. Geri kalan RNA hemen -80°C’ye kaldırıldı.

RNA’nın kalitatif değerlendirmesi:

- Elde edilen RNA’dan ayrılan 2µl RNA etidyum bromür eklenmiş %1’lik agaroz jel de yürütüldü.
- Yürüme sonunda 28S, 18S ve 5S RNA görüntüsü net bir biçimde gözlemlendi. Görüntüde herhangi bir RNA parçalanması gözlenmez ise bu elde edilen RNA’nın kalitesinin iyi olduğuna işaret etmektedir.

RNA’nın kantitasyonu:

- RNA miktarının ölçümü Biotek marka spektrofotometre ile yapıldı.

2.2.4. cDNA Sentezi

Bu çalışmada qRT-PCR yöntemi kullanılarak genlerin ifadesi kantitatif olarak analiz edildi. İlk olarak hücrelerden’den izole edilen RNA örneklerinden 500 ng

kullanılarak "Transcriptor High Fidelity c-DNA synthesis kit" ile c-DNA sentezlendi (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. c-DNA sentez protokolü

Kalıp-Primer Mix Hazırlanışı:		
Komponentler	Hacim	Final Konsantrasyon
Total RNA	Değişken	500 ng
Random Hexamer Primer	2µl	60µM
H ₂ O, PCR-grade	Değişken	Son hacim H ₂ O ile 11.4 µl'ye tamamlanır.
Toplam Hacim	11.4 µl	
65 °C' de 10 dk → inkübasyon		
Master Mix Hazırlanışı:		
Komponentler	Hacim	Final Konsantrasyon
Transcriptor High Fidelity Revers Transkriptaz Reaksiyon Buffer (5X)	4 µl	1X
Protector RNaz İnhibitor (40 U/ µl)	0.5 µl	20 U
Deoksinükleotid Karışımı (10 mM her bir dNTP)	2 µl	1 mM her bir dNTP
DTT	1 µl	5 mM
Transcriptor High Fidelity Revers Transkriptaz	1.1 µl	10 U
Toplam Hacim	20 µl	
29 °C' de 10 dk	→ inkübasyon	
48 °C' de 60 dk	→ inkübasyon	
85 °C' de 5 dk	→ revers transkriptaz inaktivasyon	

2.2.5. RT-PZR (Gerçek Zamanlı Poimeraz Zincir Reaksiyonu)

Hücre kültüründe ilaç verildikten sonra RNA ve cDNA sentezi yapılan hücrelerdeki EGFR, p53, VEGFR, BİM, BAD, BAX, BCL2 genlerinin ekspresyon düzeylerini analiz etmek amacıyla RT-PZR yöntemi kullanıldı. PZR sonrası elde edilen sonuçlar döngü numaralarına göre ve konsantrasyonlarına göre hesaplandı. RT-PZR reaksiyon şartları Çizelge 2.3'te verildi.

qRT-PZR uygulamalarında kullanılacak olan genlere özgü primerler. "Perl Primer" programı kullanılarak tasarlandı.

VEGF F: CTCCGAAACCATGAACTTTCTG
 VEGF R: CACCACTTCGTGATGATTCTG
 EGER F: AGACTCACTCTCCATAAATGCT
 EGER R: GATTTCTAGGTTCTCAAAGGCA
 Hprt: 5'F: TGACACTGGCAAACAATGCA
 Hprt: 5'R: GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
 Bad: 5'F: GATGAGTGACGAGTTTGTGGA
 Bad: 5'R: CAAGTTCCGATCCCACCAG
 Bcl-2: 5' F: CGCCCTGTGGATGACTGAGT
 Bcl-2: 5'R: GGGCCGTACAGTTCCACAA
 BIM: 5'F: ATCTCAGTGCAATGGCTTCC
 BIM: 5'R:CATAGTAAGCGTTAAACTCGTCTCC
 Bax: 5' F: GACGGCAACTTCAACTGGG
 Bax: 5' R: AGGAGTCTCACCCAACCAC

"SYBR Green" floresans boyası kullanılarak primerlerin optimize edildiği sıcaklık olan 60°C'de kantitasyon (qRT-PCR) yapıldı (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. VEGF, EGFR, p53, BİM, BAX, BCL2, BECLİN1 ve HPRT için RT-PZR şartları

Master Mix Hazırlanışı:	
Komponentler	Hacim
H ₂ O, PCR-grade	2µl
Primer (10xconc) (Forward)	0.5 µl
Primer (10xconc) (Reverse)	0.5 µl
Sybr Green (2xconc)	5 µl
c-DNA	2µl
Toplam Hacim	10 µl
qRT-PCR Programı:	
Denatürasyon	95°C 5 dak
Amplifikasyon	95°C 30 sn
	60°C 30 sn
	72°C 30 sn
Erime	95°C 10 sn
	65°C 1 dak
	95°C continuous
Soğuma	40°C 10 sn

2.2.6. Tek hücre jel elektroforezi (Komet)

Hücelere ilaç verildikten sonra hücrelerde meydana gelen DNA hasarını tespit etmek için KOMET (kuyruklu yıldız) testi yapıldı. Bu testin başlangıcında hücrelerin hazırlanması süreci hücre kültüründe diğer aşamaları ise loş bir ışıkta moleküler laboratuvarında gerçekleştirildi. Bu işlem için izlenen protokol aşağıda yer almaktadır.

KOMET yapılacak hücreler tripsine edilerek 15 ml'lik tüplere alındı. Bu tüpler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı ve hücrelerin üzerine transfer pipeti ile 2 ml PBS eklendi.

PBS ile karışan hücrelerin 18 µl'si 36 µl %0.75'lik düşük erime sıcaklığına sahip agaroz ile karıştırılıp oda ısısında bekleyen ve normal erime sıcaklığına sahip agaroz ile kapalı lamların üzerine yayılarak üzerleri ince lamellerle kaplandı.

Üzeri hücre ve agaroz karışımıyla kaplanan lamlar buz üzerine alındı ve 20 dakika donmaları beklendi. Agaroz lam üzerinde donduktan sonra lameller dikkatlice kaldırılır. Lameller kaldırıldıktan sonra lamlar daha önce hazırlanmış olan ve +4 °C'de bekleyen soğuk lizing solüsyonunda 1 saat bekletilir. Bekleme sonunda bu solüsyona 14 µl (20 µg/ml) proteinaz K eklenir 37 °C'lik etüve kaldırıldı. Burada da lamlar 2 saat inkübe edildi.

İki saat sonunda lamlar soğuk TBE nötral solüsyon da 20 dakika beklendi ve ardından 25V'ta 20 dakika yürütüldü. Yürütme işlemi süresince elektroforez tankının üstüne soğuk alküler ve buz parçaları konarak TBE solüsyonunun ısınması engellendi.

Elektroforezden alınan lamlar karanlıkta, oda ısısında kurutulduktan sonra her bir lamel 50 µl etidyum bromid (8 µg/ml) ile boyandı. Boyanan prepratlar floresan mikroskopta (Olympus BX51) ilgili filtrede incelendi. Her bir hücre DNA görüntüsü

kuyruk uzunluğu ve kafa bölgesine göre değerlendi ve hasar miktarına göre 0 (hasarsız), 1 (az hasarlı), 2 (hasarlı), 3 (orta hasarlı), 4 (çok hasarlı) olarak kategorize edildi (Şekil 2.6). Her bir preparat için 250 hücre sayıldı.

2.2.7. Hücre Hatlarının Sitogenetik Analizi

U118 ve U87 hücre hatlarının sitogenetik analizi GTG (Giemsa/Tripsin) bantlama yöntemine göre yapıldı. Bunun için önce etüvde bulunan U118 ve U87 Hücre kültürlerinden yaklaşık 3'er ml alınarak T-25 flask içine kondu ve üzerine 8'er ml. besiyeri eklendi. Hücreler 37 °C etüvde bir gece inkübe edildi. Ertesi sabah hücre kültürleri üzerine 200'er ul kolşisin eklenerek 1 saat inkübe edildi ve ardından hücre çıkarımı yapıldı.

Çıkarıma başlamadan önce yapışan hücrelerin flasktan iyi ayrılması için önce üzerindeki besiyerini alıp ve hücrelerin birbirinden ayrılması için her flaska 1.5 ml tripsin eklenip ve 5 dk 37 °C etüvde bekletildi. Bu aşamadan sonra tripsini ortamdan uzaklaştırmak için tekrar besiyeriyle yıkayıp, tekrar 2500 rpm.'de 5 dk. çevrildi. Bunun devamında hücreler 15 ml.'lik falkon tüplerine alınarak 2500 rpm.'de 5 dk. çevrildi ve süpernatant atıldı. Pelet halindeki hücrelerin üzerine yaklaşık 12 ml 37 °C'de tutulan Potasyum Klorür (KCl) aynı anda vortekslenerek eklendi ve 37 °C'lik etüvde 20 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 2000 rpm.'de 5 dk. santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Ardından Carnoby solüsyonu ile (3:1 Metanol/Asetik asit)) yıkamalara geçildi. Yaklaşık 5 ml yıkama solüsyonu aynı anda vortekslenerek hücre peleti üzerine damla damla eklendi ve takiben 2000 rpm.'de 5 dk. Sanrifüj edildi ve süpernatant döküldü. Fiksatif solüsyonu ile yıkama işlemine süpernatantın rengi beyaz oluncaya kadar devam edildi. Bu şekilde hazırlanan hücreler 1 gece +4 °C'de tutularak ertesi sabah hücrelerin lam üzerine alınma işlemine geçildi.

Hücrelerin alınacağı lam'lar bir gün önceden yıkanmış ve distile su içinde +4 °C'de bekletildi. Hücreler bunların üzerine yüksekte, her lam üzerine yaklaşık 3-4 damla olacak şekilde 3 ml.'lik pastör pipeti ile damlatıldı. Ardından +65 °C'lik

etüvde bir gece yaşlanmaya bırakıldı. Ertesi gün Giemsa/Tripsin metodu ile bantlama işlemine geçildi. Bantlama işleminde kullanılacak tripsin'den 1,5 ml alınarak 13,5 ml distile su içine konarak sulandırıldı. Etüvden çıkarılan lam'lar %2,5'luk tripsin ile yaklaşık 13-15 sn. muamele edilerek hemen serum fizyolojik su ile yıkandı. Ardından Giemsa boyası ile boyandı. Kuruyunca entellan yardımı ile üzeri lamel ile kapatılarak analize hazır hale getirildi.

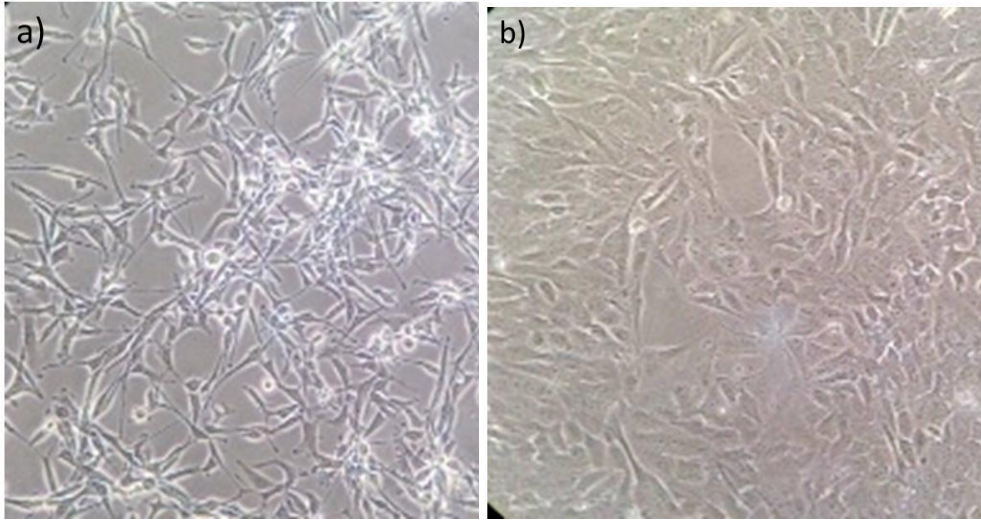
2.3. Sonuçların Değerlendirmesi

Çalışmanın istatistiksel analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla *SPSS 15.0 for windows paket programı* kullanıldı. RT-PZR sonucunda bulunan genlerin ek kat artış/azalışları ortalamalarının 1'e karşı test edilmesinde tek örneklem T-testi kullanılıp sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde özetlendi. Ayrıca U118 ve U87 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saatlerinde 6 farklı grupta toplanan verilerinin analiz edilmesi amacıyla öncelikle her bir zaman noktasına ait ölçümler Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile gruplar arasında karşılaştırılıp farklılığı yaratan grupların tespiti amacıyla *post-hoc* çoklu karşılaştırma testlerinden yararlanıldı. Bununla beraber zamana bağlı değişimin her bir grup bazında değerlendirilmesi amacıyla tekrarlanan ölçümlü ANOVA modeli kullanılmıştır ve olası tüm ikili zaman noktalarının karşılaştırılma sonuçları *post-hoc* testler ile ayrıntılı olarak elde edildi. Her iki hücreye ait (U18 ve U87) ölçümlerin sonuçları ortalama \pm standart sapma kullanılarak özetlendi. İstatistiksel anlamlılık seviyesi olarak $p < 0.05$ alındı.

3. BULGULAR

3.1. U118 ve U87 Hücrelerin Mikroskopik Görüntüleri

Uygun koşullarda büyütülen U118 ve U87 hücrelerinin morfolojik görüntüleri ters mikroskopta görüntülendi (Şekil 3.1).

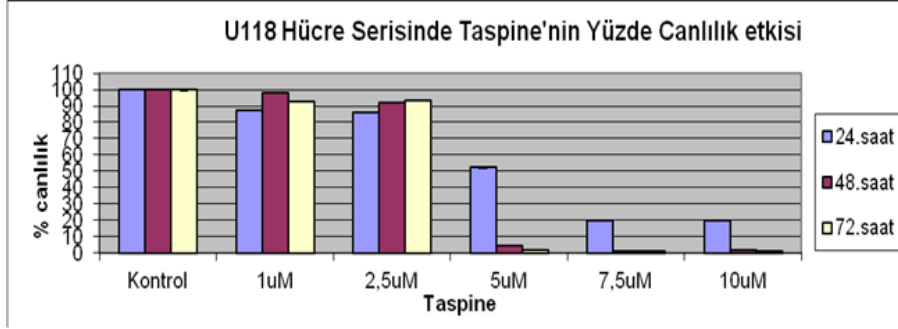


Şekil 3.1. a) U87ve b)U118 Hücrelerinin Mikroskopik Görüntüleri (10x20)

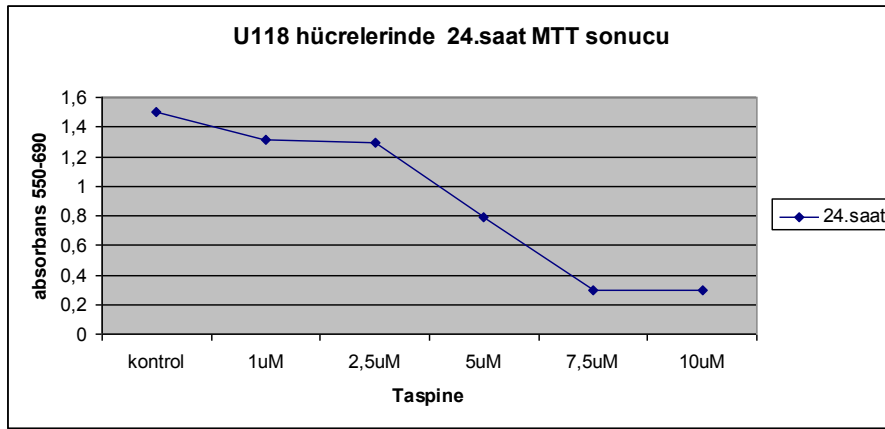
3.2. MTT Canlılık Testi (Sitotoksisite Analizi)

Taspinin hücreler üzerindeki sitotoksisite düzeylerini saptamak amacıyla yapılan MTT testi sonucunda, hücre dizilerinin taspine duyarlılıklarının farklı olduğu saptandı. İlaç uygulaması sonrasında hücrelerin canlılık durumları aşağıdaki çizelgelerde verildi.

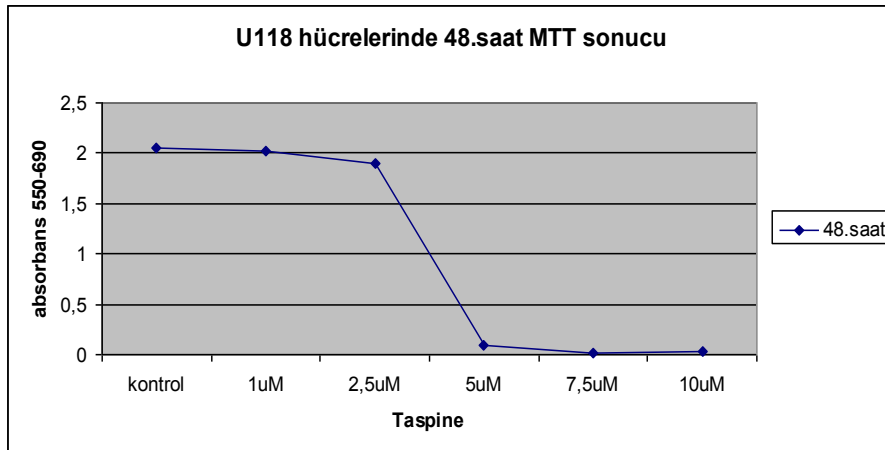
Çizelge 3.1. U118 Hücre Serisinde Taspine'in Yüzde Canlılık Etkisi

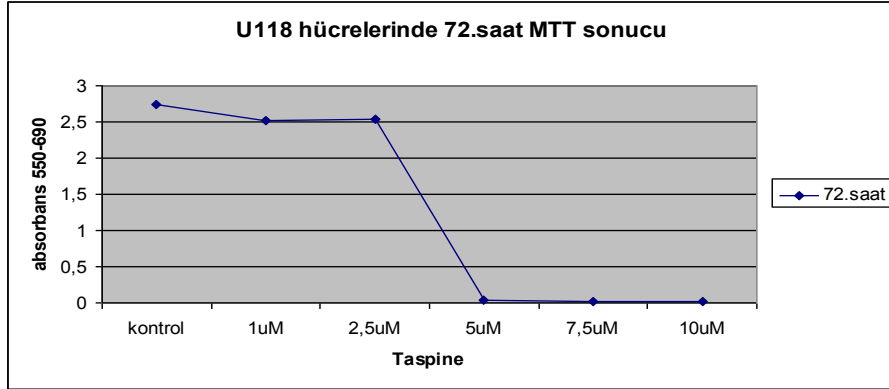
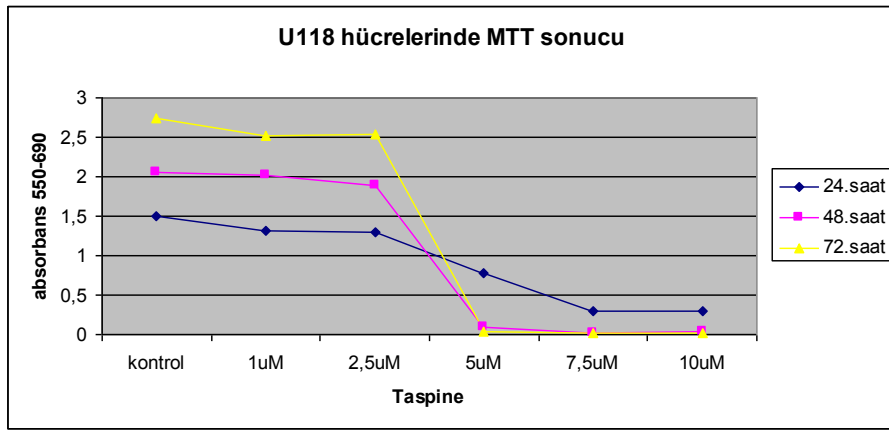


Çizelge 3.2. U118 Hücrelerinde 24. Saat MTT Sonucu



Çizelge 3.3. U118 Hücrelerinde 48. Saat MTT Sonucu



Çizelge 3.4. U118 Hücrelerinde 72. Saat MTT Sonucu**Çizelge 3.5.** U118 Hücrelerinde 24,48 ve 72. Saatlerde Yapılan MTT Sonucu

U118 hücre serisinde Taspine uygulandıktan 24 saat sonra 1 μ M Taspine dozunda hücre canlılığı %87, 2.5 μ M uygulandığında %85, 5 μ M Taspine dozunda hücre canlılığı %52, 7.5 μ M uygulandığında %19 ve 10 μ M uygulandığında %19'a düşmüştür. Bu sonuçlara göre Taspine uyguladıktan 24'uncu saatensonra 5-10 μ M arasındaki ilaç dozu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$).

U118 hücre serisinde Taspine uygulandıktan 48 saat sonra 1 μ M Taspine dozunda hücre canlılığı %98, 2.5 μ M uygulandığında %91, 5 μ M Taspine dozunda hücre canlılığı %4, 7.5 μ M dozunda %0.99 ve 10 μ M dozunda %1.69'a düşmüştür. Bu sonuçlara göre Taspine uyguladıktan 48'inci saatten sonra 5-10 μ M arasındaki ilaç dozu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$).

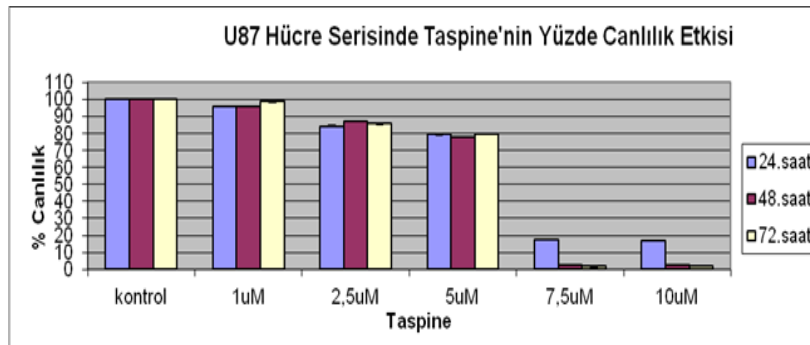
U118 hücre serisinde Taspine uygulandıktan 72 saat sonra 1 μ M Taspine dozunda hücre canlılığı %92, 2.5 μ M uygulandığında %93, 5 μ M Taspine dozunda hücre canlılığı %1.4, 7.5 μ M %0.79 ve 10 μ M uygulandığında %0.98'e düşmüştür. Bu sonuçlara göre Taspine uygulandıktan 72'inci saatten sonra 5-10 μ M arasındaki ilaç dozu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$) (Çizelge 3.6.).

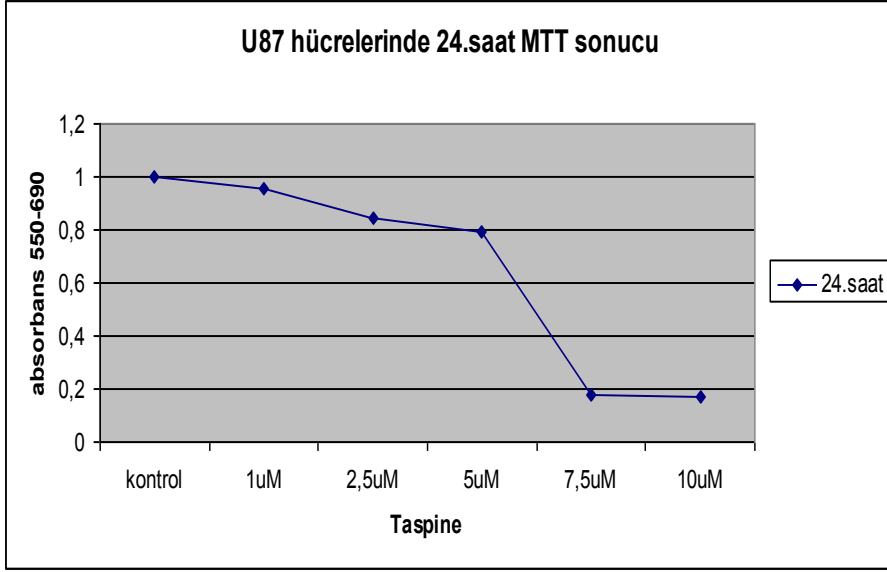
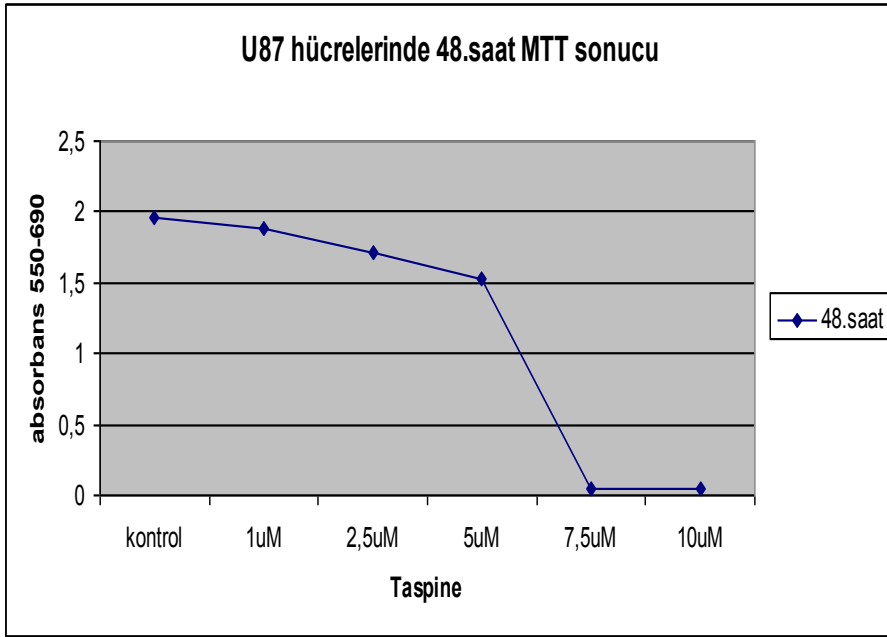
Çizelge 3.6. U118 Hücre Serisinde Taspine Uygulaması Sonrası Hücre Canlılık Testi Sonuçları

U118	1 μ M	2.5 μ M	5 μ M*	7.5 μ M*	10 μ M*
24.saat	%87	%85	%52	%19*	%19
48.saat	%98	%91	%4	%0.99	%1.69
72.saat		%93	%1.4	%0.79	%0.98

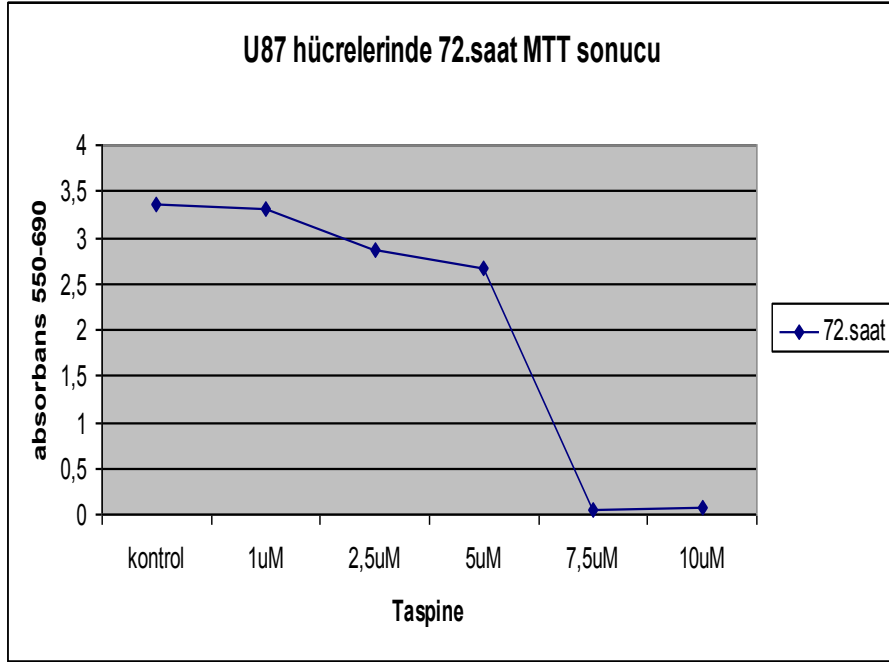
* $p < 0.001$

Çizelge 3.7. U87 Hücre Serisinde Taspine'in Yüzde Canlılık Etkisi

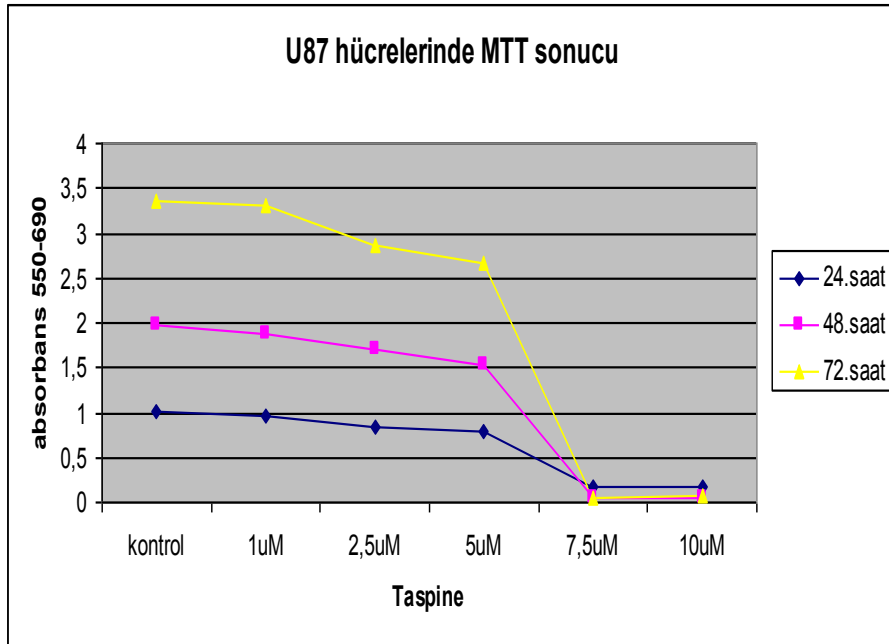


Çizelge 3.8. U87 Hücrelerinde 24. Saat MTT Sonucu**Çizelge 3.9.** U87 Hücrelerinde 48. Saat MTT Sonucu

Çizelge 3.10. U87 Hücrelerinde 72.Saat MTT Sonucu



Çizelge 3.11. U87 Hücrelerinde 24,48 ve 72. Saatlerde Yapılan MTT Sonucu



U87 hücre serisinde Taspine uygulandıktan 24 saat sonra 1 μ M Taspine dozunda hücre canlılığı %95, 2.5 μ M uygulandığında %84, 5 μ M Taspine dozunda

hücre canlılığı %79, 7.5µM uygulandığında %17 ve 10µM uygulandığında %17'ye düşmüştür. Bu sonuçlara göre Taspine uyguladıktan 24 sonra 2.5-10µM arasındaki ilaç dozu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$).

U87 hücre serisinde Taspine uygulandıktan 48 saat sonra 1µM Taspine dozunda hücre canlılığı %95, 2.5µM uygulandığında %87, 5µM Taspine dozunda hücre canlılığı %77, 7.5µM dozunda %2.5 ve 10µM dozunda %2.3'e düşmüştür. Bu sonuçlara göre Taspine uyguladıktan 48 sonra 2.5-10µM arasındaki ilaç dozu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$).

U87 hücre serisinde Taspine uygulandıktan 72 saat sonra sonra 1µM Taspine dozunda hücre canlılığı %98, 2.5µM uygulandığında %85, 5µM Taspine dozunda hücre canlılığı %79, 7.5µM %1.7 ve 10µM uygulandığında %1.5'e düşmüştür. Bu sonuçlara göre Taspine uyguladıktan 72 sonra 2.5-10µM arasındaki ilaç dozu istatistiksel olarak anlamlı bulundu($p<0.001$) (Çizelge 3.12)

Çizelge 3.12. U87 Hücre Serisinde Taspine Uygulaması Sonrası Hücre Canlılık Testi Sonuçları

U87	1µM	2.5µM*	5µM*	7.5µM*	10µM*
24.saat	%95	%84	%79	%17	%17
48.saat	%95	%87	%77	%2.5	%2.3
72.saat	%98	%85	%79	%1.7	%1.5

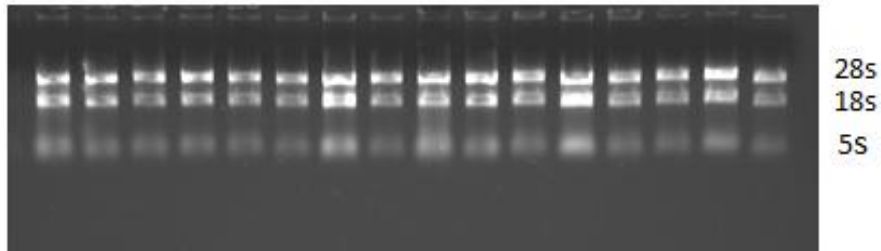
* $p<0.001$

3.3. RNA Bütünlük, Kalite ve Miktar Tayini

İzole edilen örnekler spektrofotometrik olarak ölçüldü (Çizelge 3.13), ardından %1'lik jele yüklenerek görüntülendi (Şekil 3.2).

Çizelge 3.13. İzole Edilen RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Okumaları

Sample Read#	Location	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/ μ L
U118 7,5	B2	0,243	0,166	0,067	0,171	0,095	1,801	137,103
U87 7,5	B3	0,461	0,269	0,067	0,394	0,201	1,964	315,471
U118 7,5	C2	0,159	0,116	0,04	0,112	0,071	1,581	89,839
U87 7,5	C3	0,767	0,42	0,044	0,735	0,381	1,931	587,718
U118 7,5	D2	0,413	0,227	0,039	0,374	0,187	2,004	299,162
U87 7,5	D3	0,404	0,24	0,04	0,366	0,201	1,822	292,593
U118 5	E2	0,29	0,161	0,039	0,249	0,12	2,083	199,548
U87 5	E3	0,311	0,177	0,039	0,273	0,137	1,999	218,528
U118 5	F2	0,317	0,189	0,039	0,276	0,148	1,871	220,973
U87 5	F3	0,464	0,248	0,041	0,43	0,209	2,054	344,234
U118 5	G2	0,643	0,347	0,04	0,608	0,308	1,976	486,252
U87 5	G3	0,396	0,221	0,04	0,358	0,18	1,984	286,315
U118 K	H2	0,406	0,228	0,048	0,354	0,177	2,001	282,814
U87 K	H3	0,438	0,267	0,042	0,398	0,225	1,766	318,424
U118 K	B2	0,59	0,31	0,04	0,554	0,271	2,04	442,88
U87 K	B3	0,471	0,248	0,039	0,436	0,21	2,075	348,661
U118 K	C2	0,374	0,212	0,04	0,334	0,172	1,947	267,318
U87 K	C3	0,441	0,277	0,041	0,405	0,238	1,699	323,845

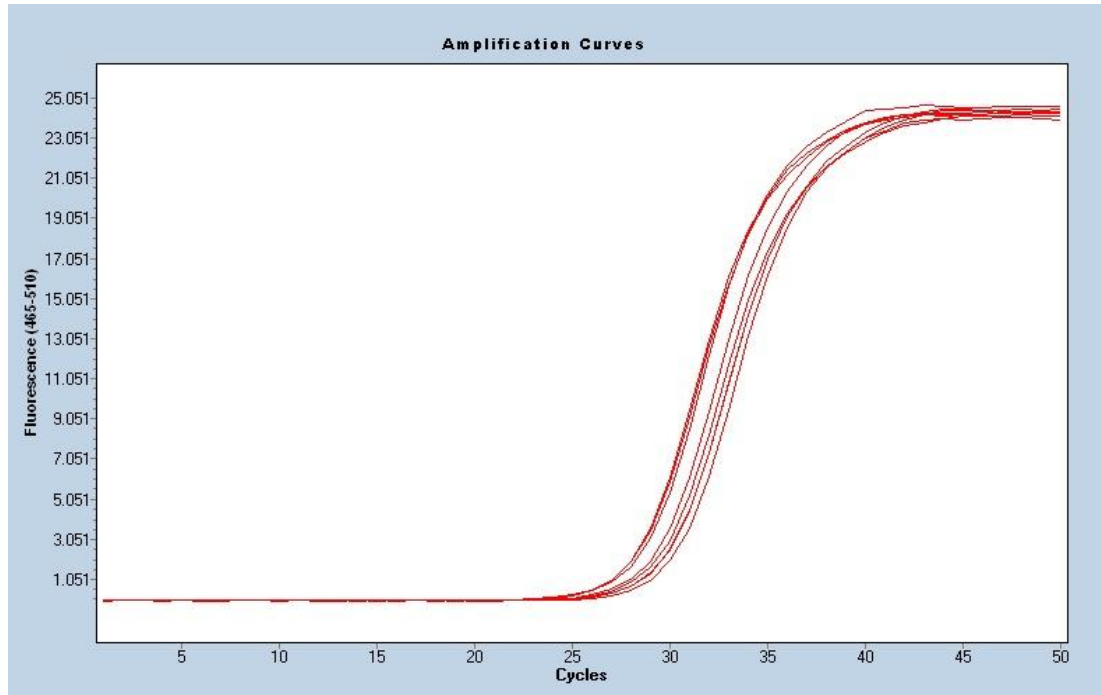
**Şekil 3. 2.** U118 ve U87 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'ların %1'lik Agaroz Jel Görüntüsü

3.4. Eş Zamanlı PCR (Real Time PCR, *qRT-PCR*) Bulguları

Birbirinden farklı RNA konsantrasyonuna sahip her bir örneğin, başlangıç RNA miktarı 500 ng olacak biçimde ayarlandı ve cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Apoptoz ve anjiyogenezden sorumlu genler ve *hprt* (housekeeping gen) genleri için tasarlanmış primerlerin optimizasyonu amacıyla yapılan PCR'lerin ardından, elde edilen cDNA'lar ile *qRT-PCR* analizi gerçekleştirildi.

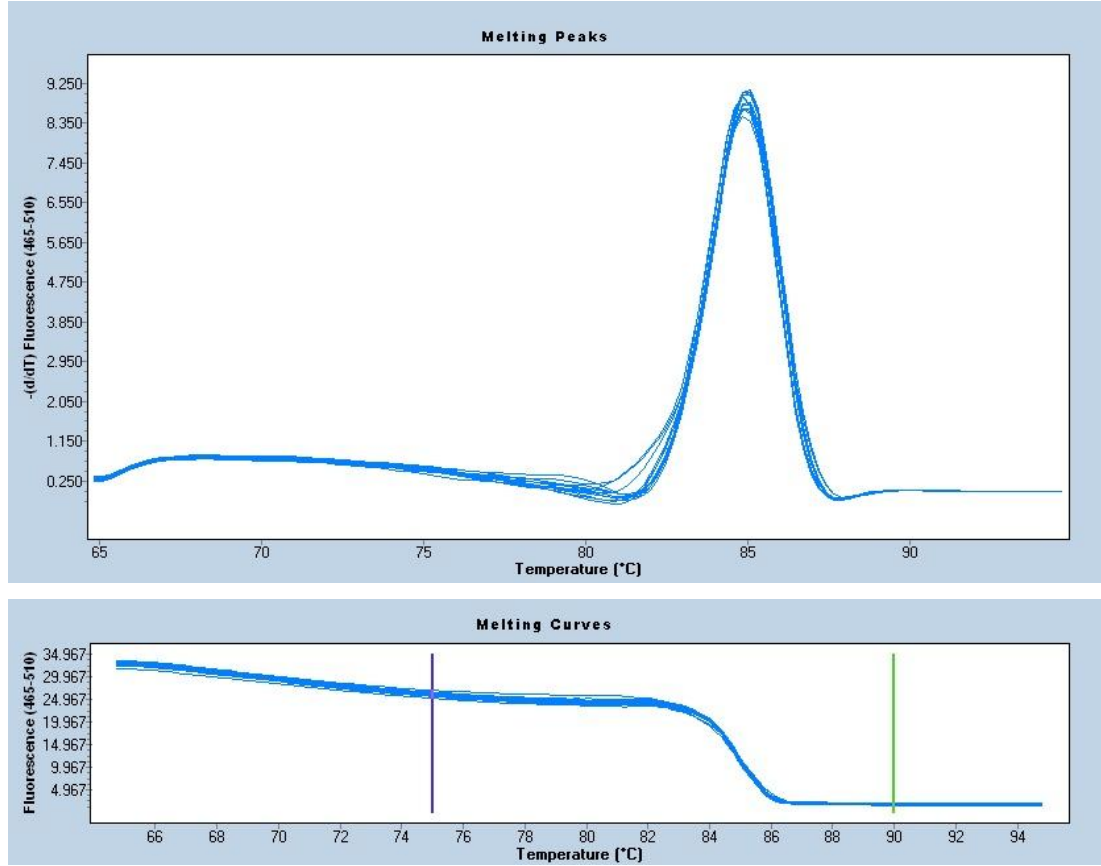
qRT-PCR sonucu oluşan ürün miktarının artmasıyla beraber SYBR Green I daha çok bağlanmakta ve böylelikle floresan ışımaya artmaktadır. Eşik değerinin üzerinde anlamlı floresan artışı gözlenen ilk döngü sayısına *Ct* (Siklus Eşit Değer) veya *Cp* (Kesişme Değer) denilmektedir. Şekil 3.3'de *Bcl2*'ye ait amplifikasyon eğrisi grafikleri gösterilmektedir.



Şekil 3. 3. *Bcl2* Amplifikasyon Eğrisi Grafığı

qRT-PCR analizi sonucunda her bir örnek için üç adet *Cp* değeri oluşmuştur ve bu değerlerin ortalaması kullanıldı.

Her qRT-PCR analizinin ardından, çoğaltılan bölgenin istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için erime eğrisi analizleri yapıldı. Şekil 3.4'te Bcl2'ye ait erime eğrisi grafikleri görülmektedir.



Şekil 3.4. Bcl-2 Erime Eğrisi

Gen ifade oranlarının hesaplanmasında;

$$R = \frac{(E_{\text{Hedef}})^{\Delta CP_{\text{Hedef}}(\text{Kontrol} - \text{Örnek})}}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta CP_{\text{Ref}}(\text{Kontrol} - \text{Örnek})}}$$

formülü kullanıldı. Bu formül genlerin amplifikasyon veriminin hesaplanıp, sonuca dahil edilmesini öngörür. Bu formül ile hesaplanan gen ifadesi oranları, log2 tabanına çevrildi.

3.5. Apoptoz, Anjiyogenez ve Otofajiden Sorumlu olan Genlerin Taspine Uygulanması Sonrası İfadelerindeki Değişim

VEGF geninin U118 hücrelerindeki ifade seviyesi 5 μ M Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 2 kat artış gösterdi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). VEGF geninin U87 hücrelerindeki ifade seviyesi 5 μ M Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 1.2 kat artış gösterdi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). VEGF geninin U118 hücrelerindeki ifade seviyesi 7.5 μ M Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 2.5 kat artış gösterdi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). VEGF geninin U87 hücrelerindeki ifade seviyesi 7.5 μ M Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 1.5 kat artış gösterdi fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

EGFR geninin U118 hücrelerindeki ifade seviyesi 5 μ M Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 1.7 kat artış gösterdi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). EGFR geninin U87 hücrelerindeki ifade seviyesi 5 μ M Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre yaklaşık 1.2 kat artış gösterdi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. EGFR geninin U118 hücrelerindeki ifade seviyesi 7.5 μ M Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 1.5 kat artış gösterdi fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.05$). EGFR geninin U87 hücrelerindeki ifade seviyesi 7.5 μ M Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre yaklaşık 1.3 kat artış gösterdi fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

P53 geninin U87 hücrelerindeki ifade seviyesi 5 μ M Taspine uygulandığında kontrol grubuna 1.6 kat artış gösterdi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). P53 geninin U87 hücrelerindeki ifade seviyesi 7.5 μ M Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 1.7 kat artış gösterdi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Bax geninin U118 hücrelerindeki ifade seviyesi 5 μ M Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 0.8 kat azalış gösterdi fakat bu azalış

istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bax geninin U87 hücrelerindeki ifade seviyesi 5µM Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 1.14 kat artış gösterdi fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bax geninin U118 hücrelerindeki ifade seviyesi 7.5µM Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 0.5 kat artış gösterdi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Bax geninin U87 hücrelerindeki ifade seviyesi 7.5µM Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 4.4 kat artış gösterdi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

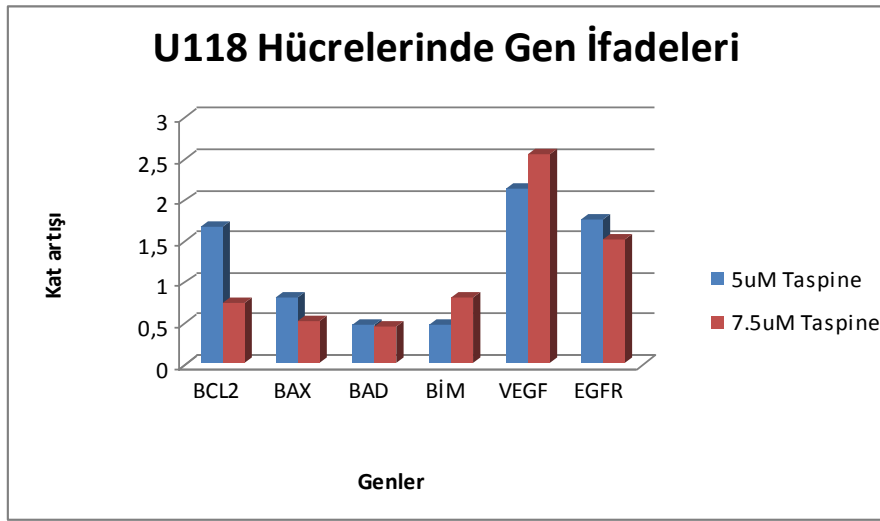
Bad geninin U118 hücrelerindeki ifade seviyesi 5µM Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 0.5 kat azalış gösterdi ve bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Bad geninin U87 hücrelerindeki ifade seviyesi 5µM Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 1.14 kat artış gösterdi fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bad geninin U118 hücrelerindeki ifade seviyesi 7.5µM Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 0.44 kat azalış gösterdi ve bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Bad geninin U87 hücrelerindeki ifade seviyesi 7.5µM Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 4.54 kat artış gösterdi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Bcl-2 geninin U118 hücrelerindeki ifade seviyesi 5µM Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 1.7 kat artış gösterdi fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bcl-2 geninin U87 hücrelerindeki ifade seviyesi 5µM Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 1.25 kat artış gösterdi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bcl-2 geninin U118 hücrelerindeki ifade seviyesi 7.5µM Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 0.7 kat azalış gösterdi fakat bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bcl-2 geninin U87 hücrelerindeki ifade seviyesi 7.5µM Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 1.3 kat artış gösterdi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

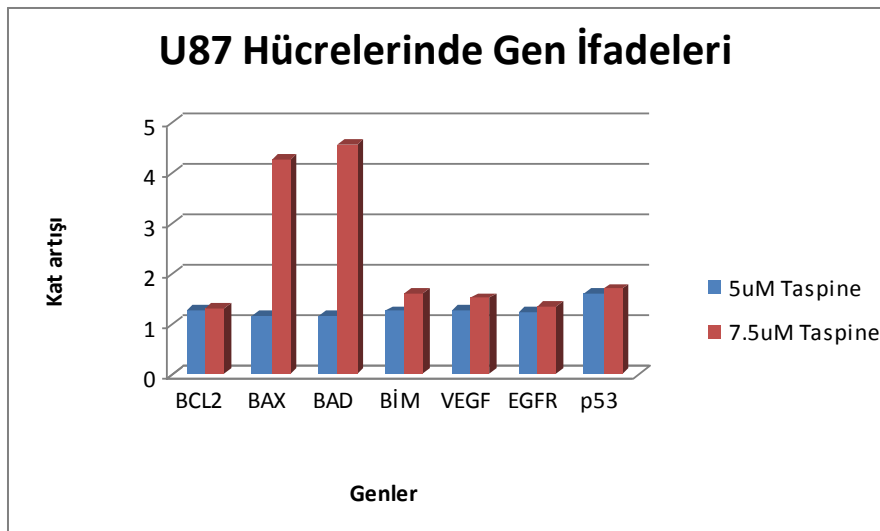
Bim geninin U118 hücrelerindeki ifade seviyesi 5µM Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 0.5 kat azalış gösterdi ve bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Bim geninin U87 hücrelerindeki ifade seviyesi 5µM Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 1.24 kat artış gösterdi ve bu

artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bim geninin U118 hücrelerindeki ifade seviyesi 7.5 μ M Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 0.8 kat azalış gösterdi fakat bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bim geninin U87 hücrelerindeki ifade seviyesi 7.5 μ M Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 1.6 kat artış gösterdi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (Çizelge 3.14 ve Çizelge 3.1

Çizelge 3.14. U118 Hücrelerinde Taspine Uygulanması Sonrası Genlerin İfadelerindeki Değişim

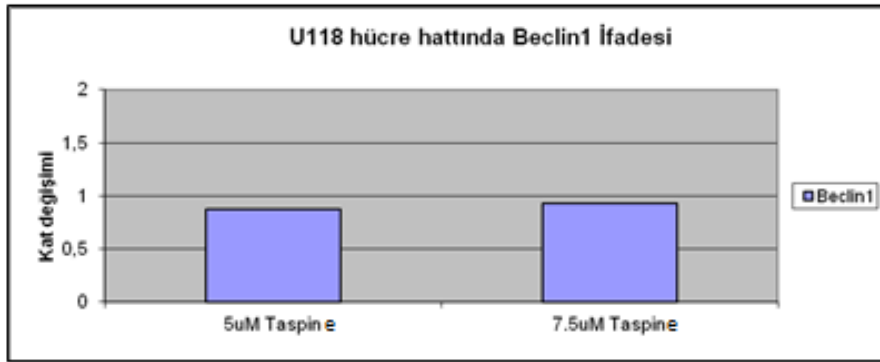


Çizelge 3.15. U87 Hücrelerinde Taspine Uygulanması Sonrası Genlerin İfadelerindeki Değişim

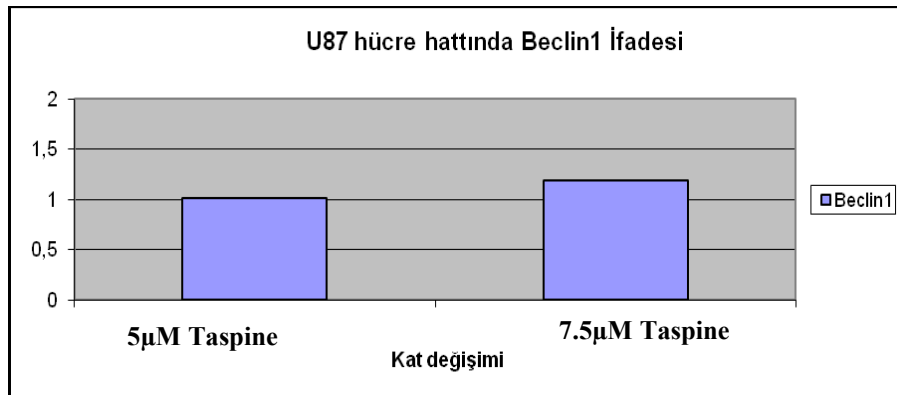


Beklin1 geninin U118 hücrelerindeki ifade seviyesi 5 μ M Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 0.8 kat azalış gösterdi ve bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p < 0.05$). Beklin1 geninin U87 hücrelerindeki ifade seviyesi 5 μ M Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 1.01 kat artış gösterdi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Beklin1 geninin U118 hücrelerindeki ifade seviyesi 7.5 μ M Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 0.9 kat azalış gösterdi fakat bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Beklin1 geninin U87 hücrelerindeki ifade seviyesi 7.5 μ M Taspine uygulandığında kontrol grubuna göre 1.1 kat artış gösterdi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p < 0.05$) (Çizelge 3.16 ve Çizelge 3.17).

Çizelge 3.16. U118 Hücrelerinde Taspine Uygulanması Sonrası BECLIN1 Geninin İfadelerindeki Değişim



Çizelge 3.17. U87 Hücrelerinde Taspine Uygulanması Sonrası BECLIN1 Geninin İfadelerindeki Değişim



3.6. Tek hücre jel elektroforezi (Komet) Analizi

U118 ve U87 hücre serilerinde, ilaç verdikten sonra apoptozu işaret eden DNA fragmantasyonunun varlığı KOMET testi ile analiz edildi.

U118 geni için; kontrol ve ilaç grupları hasarsız ve az hasarlı kategorileri arasında anlamlı fark bulunmadı.

U118 geni için; kontrol ve ilaç grupları az hasarlı ve orta hasarlı kategorileri arasında anlamlı fark bulunmadı.

U118 geni için; kontrol ve ilaç grupları orta hasarlı ve hasarlı kategorileri arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$).

U118 geni için; kontrol ve ilaç grupları hasarlı ve şiddetli hasarlı kategorileri arasında anlamlı fark bulunmadı.

U87 geni için; kontrol ve ilaç grupları hasarsız ve az hasarlı kategorileri arasında anlamlı fark bulunmadı.

U87 geni için; kontrol ve ilaç grupları az hasarlı ve orta hasarlı kategorileri arasında anlamlı fark bulunmadı.

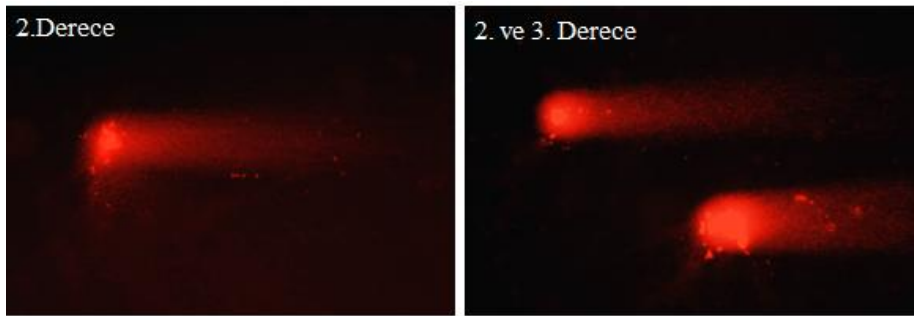
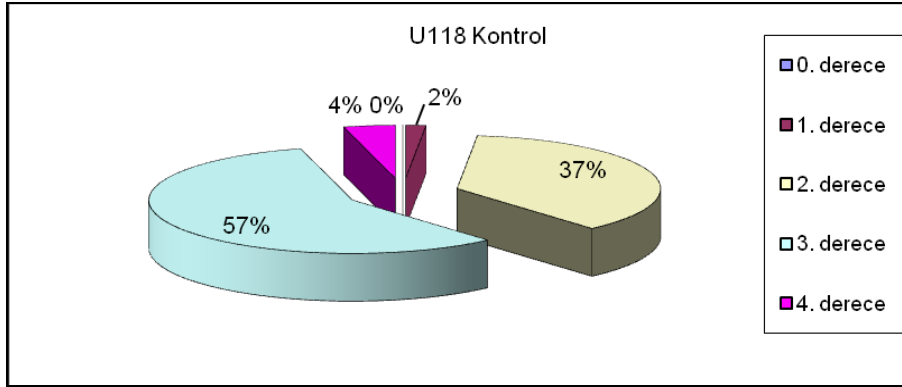
U87 geni için; kontrol ve ilaç grupları orta hasarlı ve hasarlı kategorileri arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.001$).

U87 geni için; kontrol ve ilaç grupları hasarlı ve şiddetli hasarlı kategorileri arasında anlamlı fark bulundu.

Çizelge 3.18. U118 ve U87 Hücre serilerinde Taspine Uygulanmasından önce ve sonra DNA hasarlarının yüzdesi

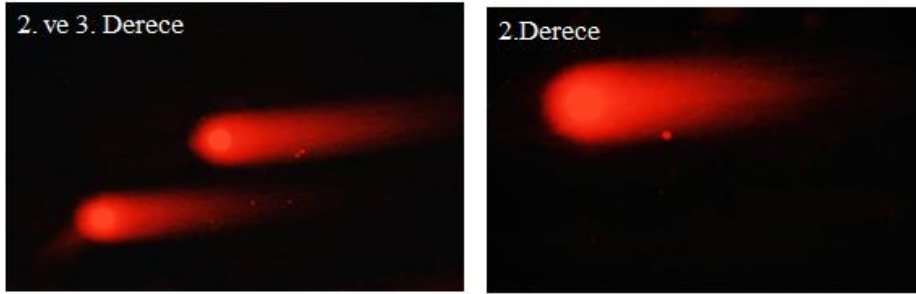
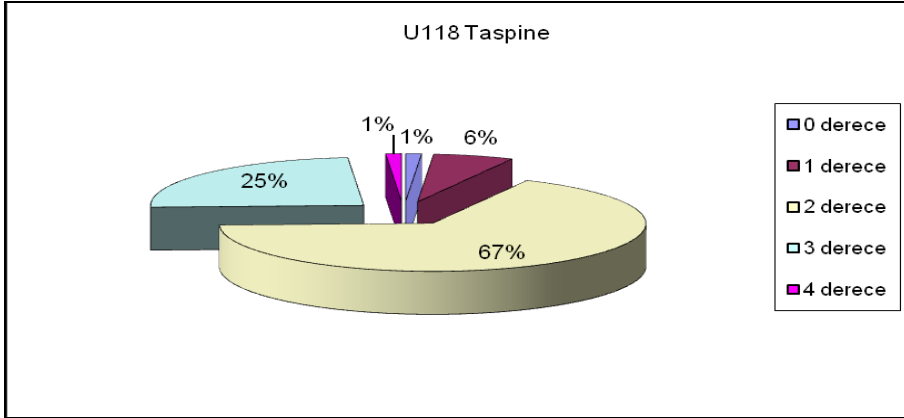
	0.Derece	1.Derece	2.Derece	3.Derece	4.Derece
U118 Kontrol	0%	1.6%	36.9%	57.4%	4.1%
U118 Taspine	1.2%	6.1%	67.1%	24.4%	1.2%
U87 Kontrol	2.5%	16.9%	70.6%	8.7%	1.3%
U87Taspine	0%	10.6%	59.6%	29.8%	0%

Çizelge 3.19. U118 Hücrelerinde Taspine Uygulanmasından önce DNA hasarlarının KOMET ile gösterimi



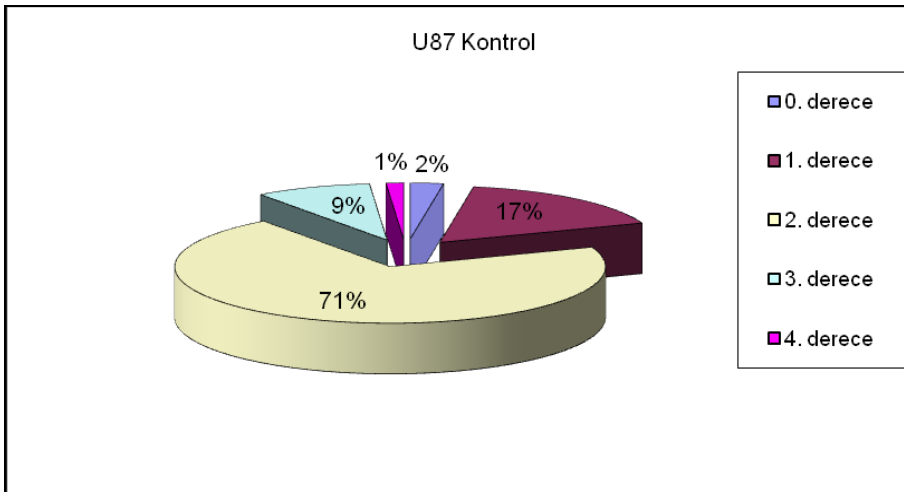
Şekil.3.5. U118 Hücrelerinde Taspine Uygulanmasından önce DNA hasarlarının KOMET ile gösterimi

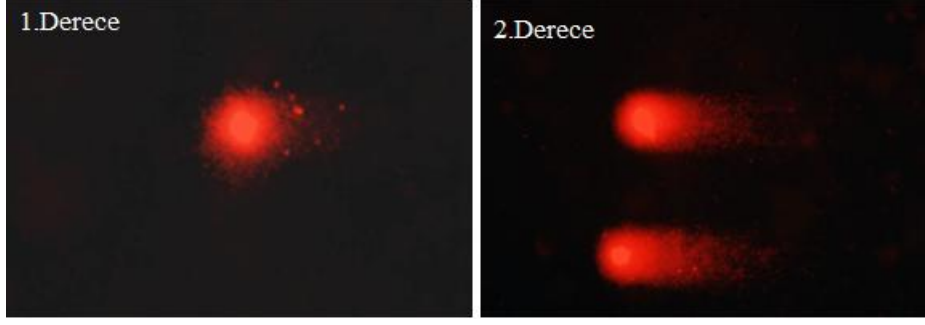
Çizelge 3.20. U118 Hücrelerinde Taspine Uygulanmasından sonra istatistik olarak DNA hasarlarının KOMET ile gösterimi



Şekil 3.6. U118 Hücrelerinde Taspine Uygulanmasından sonra DNA hasarlarının KOMET ile gösterimi

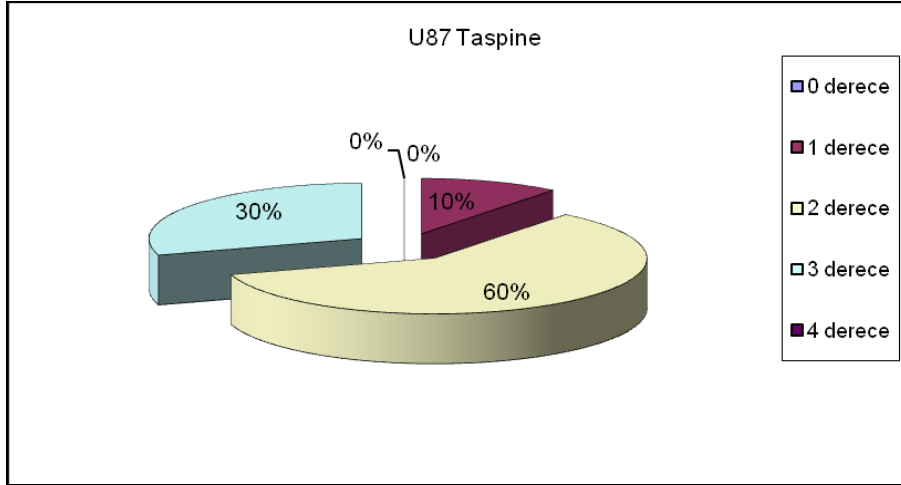
Çizelge 3.21. U87 Hücrelerinde Taspine Uygulanmasından önce istatistik olarak DNA hasarlarının KOMET ile gösterimi

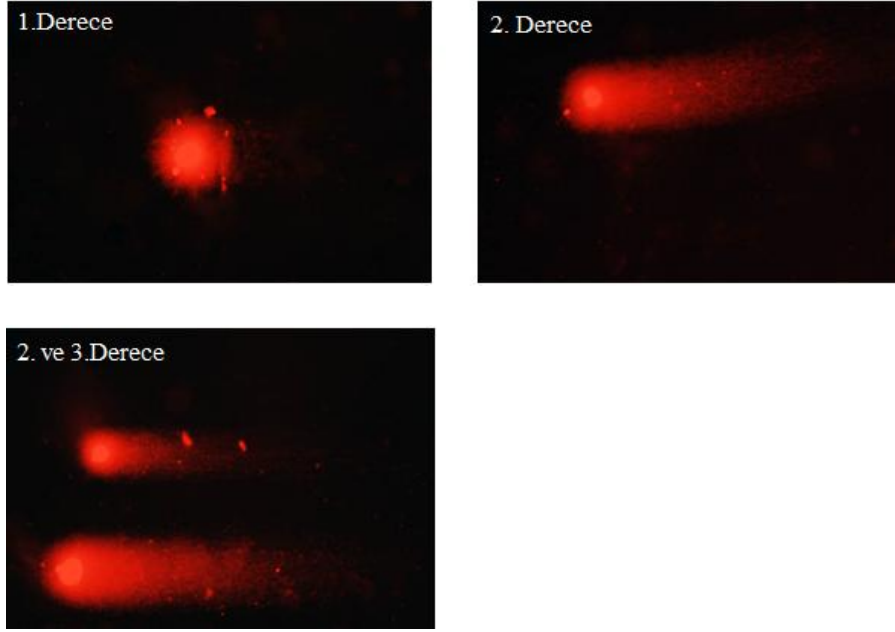




Şekil 3.7. U87 Hücrelerinde Taspine Uygulanmasından önce DNA hasarlarının KOMET ile gösterimi

Çizelge 3.22. U87 Hücrelerinde Taspine Uygulanmasından sonra istatistik olarak DNA hasarlarının KOMET ile gösterimi





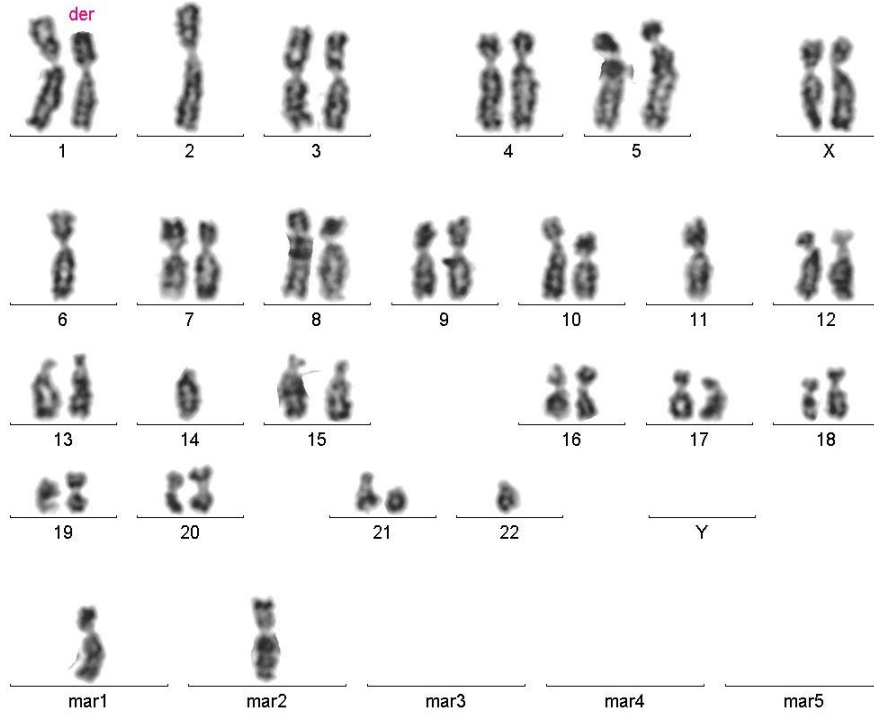
Şekil 3.8. U87 Hücrelerinde Taspine Uygulanmasından sonra DNA hasarlarının KOMET ile gösterimi

3.7. Sitogenetik analiz

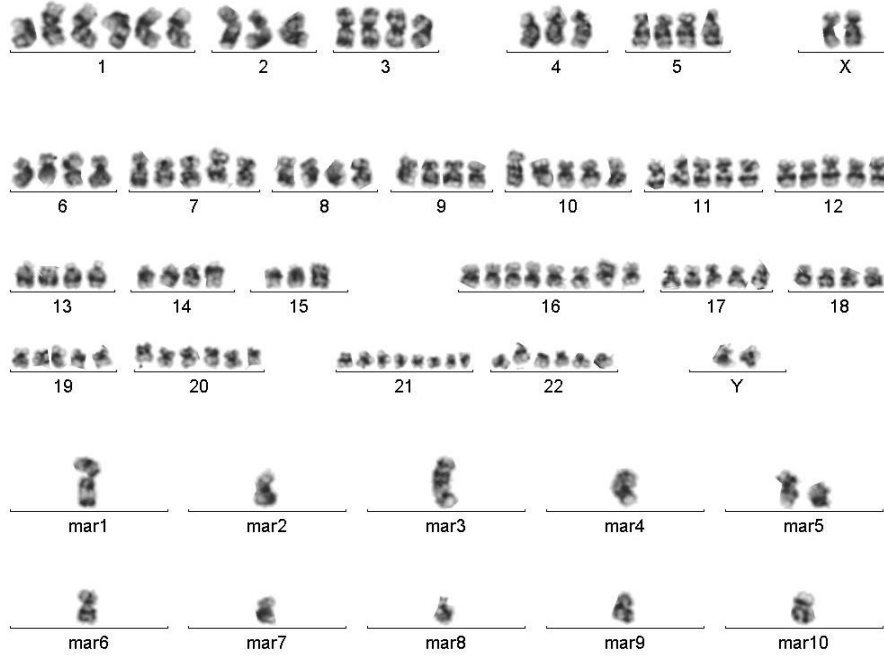
U118 ve U87 hücre serilerinde, hücrelerin kromozomal yapılarını araştırmak için sitogenetik analiz yapıldı.

U87 hücre serisinde sitogenetik analiz sonucunda karyotip: 43,XX,der(1),-2,-6,-11,-14,-22,mar1,mar2 (Şekil 3.9) gibi anomalilere rastlandı.

U118 hücre serisinde sitogenetik analiz sonucunda karyotip: 120,XY,+X,+Y,+1,+1,+1,+3,+5,+6,+7,+7,+8,+9,+10,+10,+11,+11,+12,+12,+13,+14,+6x5,+17,+17,+18,+19,+19,+20x5,+21x5,+21,+21,+21,+mar1.....mar10 (Şekil3.10)



Şekil 3.9. U87 Hücre Serisinde Yapılan Karyotip Analizi (karyotip: 43,XX,der(1),-2,-6,-11,-14,-22,mar1,mar2)



Şekil3.10. U118 Hücre Serisinde Yapılan Karyotip

Analizi(karyotip:120,XY,+X,+Y,+1,+1,+1,+3,+5,+6,+7,+7,+8,+9,+10,+10,+11,+11,+12,+12,+13,+14,+16x5,+17,+17,+18,+19,+19,+20x5,+21x5,+21,+21,+21,+mar1.....mar10).

4. TARTIŞMA

Günümüzde kanser görülme sıklığı gün geçtikçe artmaktadır. Kanseri türleri arasında beyin tümörlerinin ve beyin tümörleri içinde GBM'nin önemli bir yeri vardır. GBM, primer MSS tümörleri içinde en öldürücü olan ve en az kontrol edilebilen tümördür (Allen ve Barres, 2009).

Bitkisel tedavi, alternatif ve/veya tamamlayıcı tedavi yöntemleri arasında yer alır. Son yıllarda bitkilerin kanser tedavisinde kullanılabilecek önemli doğal kaynaklardan biri olduğu kanıtlanmıştır ((Nirmala ve ark, 2011; Yang ve ark, 2010; Tanker ve ark, 1998).

Bitkisel ilaçlar, birçok kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçların toksisitesini azaltmaktadır. Ayrıca bazı bitkisel ilaçların kanser tedavisinde, kemoterapötik ilaçlara göre daha az toksisiteye sahip olmaları nedeniyle kullanımları mevcuttur (Nirmala ve ark, 2011; Yang ve ark, 2010),

Şimdiye kadar bitkilerden izole edilen yaklaşık 30 bileşik, araştırma aşamasında bulunmaktadır (Yang ve ark, 2010; Nirmala ve ark, 2011). Bu anti-kanser bileşikler çeşitli kanser hücre serilerinde ve deneysel fare modellerinde klinik açıdan etkili bulunmuştur.

Eom ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada "Berberine", tedavi amacıyla GBM hücre serisine uygulandıktan sonra bu bitkininin hücre serisinde apoptozu (Bax ekspresyonunu artırıp Bcl2 ekspresyonunu azaltmıştır) indüklediği gösterilmiştir (Eom ve ark, 2010).

Lee ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada GBM hücre serisi üzerinde "Chinese Herb Danggui" bitkisini denedikleri zaman bu ilacın apoptozu

indüklediği ve VEGF ekspresyonunu azaltmak yoluyla anjiyogenezi yani tümör invazyonunu azalttığı görülmüştür (Lee ve ark, 2006).

Li ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada GBM hücre serisi üzerinde “Andrographolide” bitkisinin apoptozu indüklediği ve hücre bölünmesini durdurduğu saptanmıştır (Li ve ark, 2012).

Fang-Chang ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada “gamma-mangostin” GBM hücre serisinde denenmiştir ve apoptozu indüklediği bulunmuştur (Fang-Chang ve ark, 2010).

Man Tsai ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada “Angelica sinensis” GBM hücre serisinde ve *in vivo* olarak farede denenmiştir ve sonuçta p53 bağımlı apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Man Tsai ve ark, 2005).

Çalışmamızda kullanılan bileşiğin alkoloid yapıda olduğu bilinmektedir. Alkoloidlerin, uyarıcı, afrodisyak, analjezik, damar genişletici, anti-hipertansif, idrar söktürücü özellikleri ve nikotinik asetilkolin reseptörü agonisti, adenozin reseptör antagonisti, asetilkolinesteraz inhibitörü fonksiyonlarının yanı sıra anti-tümörijenik etkileri olduğu çeşitli çalışmalarda saptanmıştır (Zhang ve ark, 2010). Bu tez çalışmasında literatürde bazı tümör tiplerinde anti-tümörijenik özelliği gösterilmiş bir alkoloid olan ve kan beyin bariyerini geçebilen Taspine’in (Wen Lu ve ark, 2008) insan GBM hücre serisi üzerinde etkileri ilk kez çalışılmıştır. Şimdiye kadar Taspine ile farklı kanser tiplerinde *in-vitro* ve *in-vivo* ortamda yürütülmüş olan az sayıda çalışma vardır.

Yanmin Zhang ve arkadaşları tarafından karaciğer hücre serisinde yapılan bir çalışmada, Taspine’in tümör anjiyogenezini engellediği gösterilmiştir. Ancak karaciğer hücre serisinde hangi yolaklar ile hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği henüz bilinmemektedir. Bu çalışmada ilaç dozuna bağlı olarak hücre döngüsünde görevli olan CDK2, CDK4, ve apoptotik kaspaz-3 ve Bax’ın

mRNA ekspresyon seviyesinin arttığı, anti-apoptotik olan Bcl2 mRNA ekspresyon seviyesinin azaldığı gösterilmiştir. Taspine'in, hücre döngüsünü S fazında durdurarak bölünmeyi engellediği ve apoptozu indüklediği saptanmıştır (Yanmin Zhang ve arkadaşları, 2011).

Yanmin Zhang ve arkadaşları tarafından, kolorektal adenokarsinoma hücre serisi üzerinde yapılan başka çalışmada Taspine'in farklı bir türevi olan Tas41 uygulaması sonrası, apoptozun indüklediği ve anjiyogenezin anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir (Yanmin Zhang ve arkadaşları, 2011). Bu çalışmada apoptoz yolağında bulunan pro-apoptotik olan p53 ve Bax'ın mRNA ekspresyon seviyesinin arttığı, anti-apoptotik olan Bcl2 mRNA ekspresyon seviyesinin azaldığı; ayrıca anjiyogenezden sorumlu olan EGF ve VEGF'in mRNA ekspresyonlarının anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada sonuç olarak Taspine'in apoptozu indükleyerek, kanser hücrelerinin üzerinde anlamlı derecede etkili olduğu bulunmuştur (Yanmin Zhang ve arkadaşları, 2011).

Zhang ve arkadaşları epidermal karsinoma hücre serisinde yaptıkları bir çalışmada, Taspine'in tümör anjiyogenezini ve hücre proliferasyonunu engellediğini, aynı zamanda apoptozu indüklediğini göstermişlerdir (Yanmin Zhang ve arkadaşları, 2011).

Taspine'nin melanoma ve kolon kanseri hücre serisi üzerinde de anti-proliferatif etkisi olduğu saptanmıştır (Montopoli ve ark, 2012).

Wen Lu ve arkadaşları tarafından farede *in vivo* olarak ve akciğer kanseri hücre serisi üzerinde yapılan başka bir çalışmada, yeni bir sentetik Taspine türevinin (HMQ1611) hücre proliferasyonunu, tümör büyümesini ve aynı zamanda doku vaskülarizasyonunu önemli ölçüde engellendiği gösterilmiştir (Lu ve ark, 2012). Bu araştırmada sonuç olarak, HMQ1611'in akciğer kanseri hücre serisi üzerinde hücre proliferasyonunu ve VEGF sekresyonunu engellerken, doku vaskülarizasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca HMQ1611'in anti-tümörijenik aktivitesi nedeniyle, farelerde tümör büyümesini engellediği ve tümörü latent hale

getirdiği, buna ilaveten anjiyogenezin inhibisyonunu sağladığı saptanmıştır (Lu ve ark, 2012).

Huai-Zhen ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada Taspine'in, kansere karşı önleyici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Zhen ve ark, 2009). Taspine'in bir başka türevi olan Tas13D'nin ilginç biyolojik ve farmakolojik aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir. *In vivo*, insan karaciğer hücre hattı ve atimik fare zenografi ile yapılan çalışma sonucunda, Tas13D'nin farelerde tümör büyümesini inhibe ettiği ve aynı zamanda doza bağımlı olarak VEGF ve EGF mRNA ekspresyonlarını anlamlı derece azalttığı gösterilmiştir. Sonuç olarak Tas13D'nin tümör büyümesini, hücre çoğalmasını ve hücre göçünü, VEGF ve EGF mRNA ekspresyonlarını azaltmak yoluyla inhibe ettiği saptanmıştır. Bu çalışma sonucunda, Tas13D'nin bir kemoterapötik ajan olarak gelecekte kullanılabileceği düşünülmüştür (Zhen ve ark, 2009).

Yanmin Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan akciğer kanseri hücre serisinde yapılan çalışmada, Taspine'in VEGFR-2 inhibitörü olarak vaskülogenezde kritik bir rol oynadığı ve kanser tedavisinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmaya göre Taspine ve sentezlenecek yeni türevlerinin, kanserlerde anjiyogenez inhibitörü olarak kullanılabilecekleri düşünülmüştür (Zhang ve arkadaşları, 2008).

Zheng ve arkadaşları, hepatoma (Zheng ve ark, 2012), akciğer kanseri (Zhang ve ark, 2008, Zheng ve ark, 2012), meme kanseri (He ve ark, 2011, Zheng ve ark, 2012), mesane kanseri (Zhang ve ark, 2010, Zheng ve ark, 2012) üzerinde yaptıkları *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda Taspine'nin bir türevi olan Ta1722'nin anti-proliferatif ve anti-anjiyogenik etkisini göstermişlerdir (Zheng ve ark, 2012). Bir Taspine türevi olarak Ta1722'nin, hücre proliferasyonunu, anjiyogenezden sorumlu VEGF ve VEGFR-2 genlerinin ekspresyonlarını azaltarak anjiyogenezi engellediği gösterilmiştir. Bu veriler sonucunda, Taspine'in anjiyogenez inhibitörü olarak kanser tedavisinde umut vaad eden bir aday olabileceği belirlenmiştir (Zhang ve ark, 2012).

Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Taspine'in farklı bir türevi olan HMQ18-22'nin kolorektal kanseri olan farelerde, anjiyogenezi anlamlı derecede azalttığı, kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği ve buna bağlı olarak tümör gelişimini engellediği gösterilmiştir (Zhang ark, 2012). Kolorektal kanser, diğer hastalıklar arasında büyük bir morbidite ve mortaliteye sahiptir (Dai ve Zhang ve ark,2012). Anjiyogenez, kolon kanseri gelişiminde rol oynayan bir faktördür. Bu çalışmada, HMQ18-22'nin fare kolon dokusunda, anjiyogenezi araştırırken VEGFR2, VEGFR1, Akt, PKCa and PLCc-1 mRNA ekspresyonunu anlamlı derecede azalttığı bulunmuştur. Sonuç olarak HMQ18-22'nin, kolorektal kanser hücrelerinin çoğalmasını ve fare modelinde tümör gelişimini engellediği saptanmıştır. Bu sonuçlar HMQ18-22'nin yeni bir anjiyogenez inhibitörü olduğunu ve kolon kanseri için ileride terapötik bir aday olduğunu ortaya koymuştur (Dai ve Zhang ve ark, 2012).

Sonuç olarak yapılan çalışmalara göre Taspine akciğer kanserinde anjiyogenezi inhibe etmektedir (Wen ve ark, 2012). Kolon kanserinde yüksek oranda hücre büyümesini durdurur ve anti-proliferatif etkiye sahiptir (Montopoli ve ark, 2012). Pankreas kanserinde ise EGF ve VEGF ifadesini baskıladığı gösterilmiştir (He ve ark, 2009). Taspine'nin meme kanseri hücrelerinin invazyonunu ve adezyonunu engellediği ve metastazı da baskıladığı saptanmıştır (Zhan ve ark, 2012; He ve ark, 2011). Hepatomda ise anjiyogenez inhibitörü olarak rol oynadığı rapor edilmiştir (Lei ve ark, 2012)

Astrositik beyin tümörlerindeki ilk genetik değişiklik tümör baskılayıcı fonksiyonu olan p53 mutasyonudur. GBM'de p53 mutasyonu ve protein ekspresyonu, prognostik bir belirteç olarak kullanılmasa da, birçok anti-tümörijenik ilaç, hedef olarak p53 seviyesini arttırmak suretiyle hasarın tamirine ya da apoptoza yol açmaktadır. p53 geninde meydana gelen mutasyonlar bu dengeyi bozarak gliomaların daha malign formlara dönüşmesine neden olur. p53 mutasyonu taşıyan hücrelerde apoptoz yolağında inhibisyon olur ve aktif DNA tamir mekanizmasının hücrede hasarı sürekli olarak tamir etmesi suretiyle hücre sağ kalımı sağlanmaktadır.

Bilindiği kadarıyla EGFR sinyal yolağındaki malign değişiklikler, de novo GBM gelişmesinde temel rolü olan genetik faktörlerden biridir. GBM’de yapılan çalışmalarda, EGFR geni amplifikasyonu tanımlanmış ve buna bağlı olarak EGFR’nin aşırı ekspresyonu ile hastaların sağ kalım sürelerinin azalması arasında belirgin korelasyon saptanmıştır. Gen amplifikasyonu sonucunda EGFR aşırı ekspresyonu GBM’ların %35’inde bulunmuştur. Bu ekspresyon artışı, tümör hücrelerinde apoptoza karşı direnç gelişmesi ile sonuçlanır.

Malignant glioma, insan tümörleri arasında en vaskülerize olandır. Malignant gliomanın gelişimi ve ilerlemesinin çoğunlukla anjiyogeneze bağlı olduğu varsayılır, bu olay tümör gelişiminde patofizyolojik bir basamak olarak görülür. Anti-anjiyogenik etkisi olan tedavi stratejileri diğer tümör çeşitlerinde de başarıyla kullanılmaktadır. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), tümörün neovaskülerizasyonu, kanser hücrelerinin kan dolaşımına girmesi ve diğer organlara metastaz yapmasına neden olur. VEGF ekspresyonu birçok kanser tipi için ayırt edici özelliktir. VEGF ekspresyon seviyesi, GBM malignite derecesi ile direkt ilişkili bulunmuş olup; GBM dokusunda VEGF’in 50 kat fazla eksprese edildiği saptanmıştır.

Bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında, GBM dışında başka kanserler üzerinde antikanserojen etkileri gösterilmiş olan Taspine’in, GBM üzerindeki etkileri incelenmiştir. GBM U87 ve U118 hücre serilerine doza bağlı olarak Taspine uygulanması ve sonrasında antiproliferatif, apoptotik ve anti-anjiyogenik etkilerinin incelenmesi gerçekleştirildi. GBM hücre serilerinde, apoptoz yolağında görevli olan önemli genlerden p53, Bax, Bim, Bad ve Bcl2; anjiyogeneze etkili olan VEGF ve EGFR ve otofaji yolağında etkili olan Beklin-1 geni araştırıldı.

Çalışmamızda literatüre uyumlu olarak U87 hücre serilerinde 0-10µM doz aralığında Taspine’nin hücre proliferasyonunu engellediği gösterildi (Zhang ve ark, 2008, 2011). Literatürde Taspine ile yapılmış diğer çalışmalarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da Taspine’nin aynı doz aralığında p53 mutasyonu taşımayan U87 hücre serisinde apoptotik genlerinin ekspresyonunu, Bax/Bcl-2 oranını arttırdığı

saptandı (Zhang ve ark, 2011). Çalışmamızda p53 mutasyonu taşımayan U87 hücre serisinde, apoptotik yolda bulunan p53, Bax, Bim ve Bad genlerin ekspresyon seviyesinde anlamlı artış saptandı. Bcl2, VEGF ve EGFR gen ekspresyon seviyesinde anlamlı değişiklik görülmedi. Bu sonuçlar hücrelerin doğrudan p53 bağımlı apoptoza gittiğini düşündürdü. U87 hücre serisinde DNA hasarını tespit etmek amacıyla Taspine uygulanması sonrası hücrelerde meydana gelen DNA fragmentasyonunun morfolojik olarak incelenmesi KOMET analizi kullanılarak yapıldı ve hücrelerde DNA hasarının varlığı tespit edildi. DNA'da meydana gelen bu fragmentasyonun ağırlıklı olarak apoptoz bağımlı bir yolak nedeniyle oluştuğu sonucuna varıldı.

Çalışmamızda U118 hücre serisinde literatürle uyumlu olarak 0-10µM doz aralığında Taspine'nin hücre canlılığını azalttığı saptandı. Bunu takiben hücrelerin kullandığı ölüm yolağını belirlemek amacıyla, p53 mutasyonu taşıyan U118 hücre serisinde apoptoz yolağında etkili olan genler araştırıldı. p53 tarafından regüle edilen apoptotik genler Bax, Bad ve Bim üzerinde herhangi bir değişiklik saptanmadı. Bu durumun aksine hücrede apoptotik ölüm mekanizmasını inhibe eden ve hücrenin hayatta kalımını devam ettiren Bcl-2 geninde anlamlı bir artış saptandı. Yapılan çalışmalara göre, tümör süpresör olan p53 geninin aktivasyonu, tümör anjiyogenezi ve VEGF transkripsiyonunu baskılayarak, tümörün ilerlemesini önlemektedir. p53 mutant olan hücrelerde bu genin fonksiyon kaybı nedeniyle anjiyogenezden sorumlu olan genlerin, mRNA ekspresyon seviyesi anlamlı derecede artmaktadır. Dolayısıyla p53 mutant olan kanserlerde anjiyogenez daha yüksek bulunmaktadır (Qin ve ark, 2006). Başka bir çalışmada VEGF'ün p53^{-/-} olan tümörlerde, p53 mutant olmayan tümörlere göre daha yüksek seviyede eksprese olduğu gösterilmiştir. Anjiyogenezde etkili olan VEGF, tümör malignitesi ile orantılı olarak artar. p53 mutant hücrelerde EGFR ekspresyon seviyesinde de p53 mutant olmayan hücelere göre anlamlı artış saptanmıştır (Lewin ve ark, 2008; Bheda ve ark, 2008; Shapira ve ark, 2013). Literatürde kanser tedavisi ile ilgili yapılan çalışmalarda bazı agresif tümör hücrelerinin ölümden korunmak amacıyla, bir hayatta kalım mekanizması olarak VEGF genini ve devamında programlanmış hücre ölümünü önlemek için Bcl2 genini aktive ettiği gösterilmiştir (Beierle ve ark., 2002; Pidgeon ve ark, 2001; Kaneko ve

ark, 2007). Bu mekanizma tümör hücrelerinin devamlılığını sağlar. Bunun devamında apoptoz yolağında görevli olan genler aktive olur ve hücrelerin hayatta kalım mekanizması bozular (Beierle ve ark., 2002). Yapılan çalışmalarda nöroblastoma hücrelerinde Bcl2 ekspresyonunun tümörjeniteyle yani tümörün malignite derecesiyle korele olduğu gösterilmiştir. Beierle ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ekzojen VEGF uygulaması sonrası, nöroblastoma hücrelerinde Bcl2'nin yüksek ekspresyonu sonucu hücrenin apoptoza karşı direnç kazandığı gösterilmiştir (Beierle ve ark., 2002). Bu nedenlerden dolayı, çalışmamızda p53 mutasyonu taşıyan aynı zamanda agresivitesi yüksek olan U118 hücre serisinde, Taspine uygulaması sonrası apoptoz yolağında görevli olan genlerden Bax, Bim ve Bad gen ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişiklik saptanmazken, EGFR, VEGF ve Bcl2 ekspresyonunun kontrole göre anlamlı şekilde arttığı tespit edildi. Yapılmış başka çalışmalar göz önüne alındığında artan Bcl-2, VEGF, EGFR gen ekspresyon artışının, hücrelerde ilacın etkisinden korunmak ve hücre sağ kalımını sağlamak amacıyla olduğu, sonucuna varıldı (Kil ve ark. 2012; Beierle ve ark., 2002).

DNA hasarını tespit etmek amacıyla Taspine uygulanması sonrası hücrelerde meydana gelen DNA fragmantasyonunun morfolojik olarak incelenmesi KOMET analizi kullanılarak yapıldığında, U118 hücre serisinde, DNA hasarının varlığı tespit edildi fakat apoptotik genlerin aktive olmaması bize burada p53 bağımsız bir ölüm yolağının etkili olduğunu düşündürdü. Bu ölüm yolağını saptamak amacıyla programlı ölüm yollarından diğeri olan otofajide, efektör gen Beklin-1'in ekspresyon seviyesi de RT-PCR kullanılarak bakıldı, fakat bu genin ekspresyon seviyesinde herhangi bir değişiklik saptanmadı. Programlı ölüm yollarından otofaji ve apoptozdan sorumlu olan genlerin aktive olmaması, fakat hücre ölümünün ve DNA hasarının gözlenmesi bu hücre serisinde programlı nekroz gibi farklı bir ölüm mekanizmasının kullanıldığını, düşündürmüştür.

Bu tez çalışmasında bir alkaloid olan ve GBM dışında bazı kanserlerde anti-tümöral etkileri gösterilmiş olan Taspine'in, ilk kez GBM üzerindeki etkileri *in vitro* olarak incelendi. Taspine'in p53 mutant U118 ve p53 sağlam U87 hücre serilerinde antiproliferatif etkilerinin; U87'de apoptoz yolağı ile U118'de ise apoptoz ve

otofajiden bağımsız bir yolakla gerçekleştiği sonucuna varıldı. Anjiyogenez ve proliferasyon için önemli olan genlerden VEGF, EGFR ekspresyonunun Taspine uygulamasından sonra U87'de anlamlı bir şekilde değişmediği gözlenirken, p53 mutant agresif U118 hücre serisinde Bcl2, VEGF, EGFR ekspresyonunun anlamlı şekilde arttığı, bu artışın ilacın etkisinden korunmak ve hücre sağ kalımını sağlamak amacıyla gerçekleştiği, P53 mutasyonunun, GBM tedavisine yanıtta önemli bir role sahip olduğu sonucuna varıldı.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında,

- Alkaloid kökenli Taspine GBM hücre serilerinde literatürde **ilk** kez kullanılmıştır.
- GBM hastalığının genetik olarak heterojen bir yapıda olduğu, bu çalışma ile desteklenmiştir.
- Hücre serilerinin Taspine'e olan duyarlılıklarının farklılık gösterdiği ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.
- GBM hücre serilerinin Taspine'e olan duyarlılıklarında p53 mutasyonunun önemli olduğu gösterilmiştir
- P53 mutasyonunun, GBM tedavisine yanıtta önemli bir role sahip olduğu düşünülmüştür.
- Heterojen yapıda olan GBM hücrelerinde p53 sağlam hücrelerde apoptozun, p53 mutant hücrelerde ise apoptoz dışında, farklı ölüm yollarının etkili olduğu düşünülmektedir. Bu ölüm yollarının çalışılması planlanmaktadır.
- Hücrelerin Taspine'e karşı göstermiş olduğu duyarlılık farkının p53 mutasyonundan olabileceği **ilk defa** gösterilmiştir.
- P53 mutant olmayan hücrelerde Taspine'nin **ilk defa** apoptozu indüklediği GBM hücre serilerinde saptanmıştır.
- P53 mutant hücre serisinde Taspine'in antiproliferatif etkisinin apoptoz ve otofajiden bağımsız farklı bir ölüm yolağı ile gerçekleştiği, bunun araştırılmasının tedaviye farklı bir yaklaşım getirebileceği düşünülmektedir. Programlı nekroz yolağının araştırılması planlanmaktadır.
- P53 mutant olan GBM hücre serisinde angiyojenin belirteci olarak kabul edilen VEGF ekspresyonunun artmış olduğunun saptanması, GBM'de artmış anjiyojenin etyopatogenezinden p53 mutasyonun sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.
- GBM tedavisinde Taspine'nin kanser hücrelerine antiproliferatif açıdan etkili olabileceği ancak anti-anjiyogenik etkisinin olmadığı bu tez çalışmasında

gösterilmiştir, derivatifleri kullanılarak etkilerinin araştırılması planlanmaktadır.

Bir sonraki aşamada yapılması planlanan çalışmalar

- Sonuçlarımıza ve literatürde Taspine ile yapılmış olan çalışmalara dayanarak Taspine'in derivatiflerini kullanarak, aynı GBM hücre serileri üzerindeki etkilerini incelemek
- Taspine'i *in vivo* oluşturulmuş GBM hayvan modellerindeki *in vivo* etkilerini incelemek planladığımız çalışma

ÖZET

U118 ve U87 Glioblastoma hücre serisinin sitogenetik olarak incelenmesi ve Taspine'nin bu hücre serisi üzerindeki antiproliferatif, antianjiyogenik ve apoptotik etkilerinin araştırılması

Beyin tümörleri tüm kanserlerin %1,5'inden ve kansere bağlı ölümlerin %2'sinden sorumludur. GBM erişkinlerde en sık görülen ve en malign beyin tümörüdür. Hastalığın küratif tedavisi yoktur ve yüksek morbidite ve mortaliteye sahip olan nöroepitelyal bir tümörüdür. Standart tedavi protokollerinin yanı sıra, farklı tedavi yöntemleri de deneysel düzeyde kullanılmaktadır. Bitkisel tedavilerin, son yıllarda alternatif ve tamamlayıcı tedavi yöntemleri arasında yer alarak kanser tedavisinde kullanılabilecek önemli doğal kaynaklardan biri olduğu kanıtlanmıştır. Çalışmamızda kan-beyin bariyerini geçebildiği aynı zamanda çeşitli kanserlerde apoptozu indükleyip anti-anjiyogenezde etkili olduğu bildirilen bir bitkisel ham madde olarak Taspine'in, ilk kez GBM hücrelerinde antiproliferatif, apoptotik, anti-anjiyogenik ve otofajik etkisi araştırılmıştır.

Bu kapsamda, GBM hücrelerin sitogenetik karakterleri araştırılmış, sonra kültür ortamında, Taspine'nin değişik dozlarının uygulanmasını takiben uygun doz ve saat, MTT testi ile belirlenmiştir. RNA izole edilerek, anjiyogenik genler olan *VEGF*, *EGFR*, apoptotik genler *p53*, *Bim*, *Bad*, *Bax*, *Bcl2* ve otofajik gen olan *Beklin 1*'in ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemiyle incelenmiştir. Apoptozun, DNA fragmentasyonu ile incelenmesi için Komet testi ile DNA hasar oranları belirlenmiştir.

Bu çalışmada, tümörün *in vivo* özelliklerine yakın olan ve *p53* mutant ve normal olan iki farklı hücre serisinde Taspine'in etkileri incelenmiştir. GBM hücre serilerinde bir alkaloid olan Taspine duyarlılığın farklı olduğu ve bu farkta *p53* mutasyonunun etkili olduğu düşünülmüştür.

İlk kez, bu tez çalışmasında Taspine'in *p53* mutant olan ve olmayan hücre serileri üzerindeki antiproliferatif etkileri gösterildi. Taspine'in *p53* normal hücre serisinde, antiproliferatif etkisini apoptozu indükleyerek, *p53* mutant hücre serisinde ise apoptoz ve otofajiden farklı bir hücre ölüm yolağı ile bu etkisini gerçekleştirdiği

sonucuna varıldı. Taspine'in p53 normal U87 hücre serisinde anjiyogenez ve proliferasyon için önemli olan VEGF ve EGFR ekspresyonlarını anlamlı olarak değiştirmediği ancak p53 mutant U118 hücre serisinde Bcl2, VEGF ve EGFR ekspresyon düzeylerini anlamlı ölçüde arttırdığı, bu artışın ilacın etkisinden korunmak ve hücre sağ kalımını sağlamak amacıyla geręekleřtięi, P53 mutasyonunun, GBM tedavisine yanıtta önemli bir role sahip olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Taspine, Glioblastoma Multiforme

SUMMARY

Cytogenetic analysis of U118 and U87 glioblastoma cell line and investigation of the Taspine's antiproliferative, antiangiogenic and apoptotic effects on this cell line.

Brain tumors are responsible for 1.5% of all cancers and 2% of cancer deaths. In adults, glioblastoma is the most common and most malignant brain tumors. There is no curative treatment of the disease. GBM as a neuroepithelial tumor has high morbidity and mortality. In addition to the standard treatment protocols, different types of treatments are used in the experimental level. In recent years herbal therapies as an alternative and complementary methods of treatment has proven to be one of the important natural resource can be used in cancer therapy. Taspine as an alkaloid, not only can pass the blood-brain barrier, but also has effected on apoptosis and angiogenesis in various cancer. In our study antiproliferative, apoptotic, anti-angiogenic effect of Taspine was investigated for the first time on GBM cell lines.

In this context, cytogenetic characteristics of GBM cells were investigated. the sensitivity of GBM cell lines to Taspine has been determined by MTT. Subsequently, RNA was isolated from these cells. Expression levels of angiogenic genes, VEGF, EGFR; apoptotic genes, p53, Bim, Bad, Bax, Bcl2 and autophagic gene Beklin 1 have been investigated after Taspine added to each cell lines by real time PCR. Also the proportion of DNA fragmentation after Taspine application has been analyzed by KOMET assay.

In this study the effects of Taspine has been investigated on two different cell lines p53 mutant and p53 normal cell lines which are close to the *in vivo* characteristics of tumors. Sensitivity of GBM cell lines to Taspine were different. The reason of the different sensitivity to Taspine was thought to be because of the presence and absence of p53 mutation.

For the first time, it was shown the effect of Taspine on GBM p53 mutant, and p53 normal cell lines in this thesis study. The antipolifrativ effect of Taspine on p53 normal cell line was due to apoptosis, but on p53 mutant cell line, it was due to

another programmed cell death, other than apoptosis and autophagy. Taspine addition did not change VEGF and EGFR expression in p53 normal U87 cell line however, it increased the expression level of Bcl2, VGEF, EGFR significantly in p53 mutant U118 cell line. It was thought, this increase might be due to protect the cells from the effect of Taspine in order to survive. It was concluded that p53 mutation might be one of the important factor in response to the treatment of GBM.

Key Words: Taspine, Glioblastoma Multiforme

KAYNAKLAR

- ACQUAVIVA, J., JUN, H.J., LESSARD, J., RUIZ, R., ZHU, H., DONOVAN, M., WOOLFENDEN, S., BOSKOVITZ, A., RAVAL, A., BRONSON, ROLF PFANNL, R. T., WHITTAKER, C., HOUSMAN, D. E. and CHAREST, A. (2011). Chronic Activation of Wild Type Epidermal Growth Factor Receptor and Loss of Cdkn2a Cause Mouse Glioblastoma Formation. *Cancer Researc.* 1; 71 **23**:7198–7206.
- ALLEN, N.J, BARRES, B.A. (2009). Neuroscience: Glia — more than just brain glue. *Nature*, **457**(7230): 675-7
- BAGLIETTO, L., GILES, G.G., ENGLISH, D.R., KARAHALIOS, A., HOPPER, J.L., SEVERI, G. (2011). Alcohol consumption and risk of glioblastoma; evidence from the Melbourne collaborative cohort study. *International Journal of Cancer*. **128** (8): 1929. doi:10.1002/ijc.25770.
- BEIERLE EA, STRANDE LF, CHEN MK. (2002). VEGF Upregulates BCL-2 Expression and Is Associated With Decreased Apoptosis in Neuroblastoma Cells. *Journal of Pediatric Surgery*, **Vol 37**, No 3, 467-471
- BHEDA, A., CREEK, K.E., PIRISIL, L. (2008) Loss of p53 induces epidermal growth factor receptor promoter activity in normal human keratinocytes. *Oncogene*, **27**, 4315–4323.
- BLEEKER, F.E., MOLENAAR, R.J., LEENSTRA, S. (2012). "Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma". *Journal of Neuro-Oncology*. **108**(1): 11–27.
- BLUMENTHAL D.T., SCHULMAN S.F. (2005). Survival outcomes in glioblastoma multiforme, including the impact of adjuvant chemotherapy. *Expert review of neurotherapeutics*. **5**(5):683-90.
- BREN E.C. (2007) VEGF in Biological Control. *Journal of Cellular Biochemistry*.
- BURGER P.C., SCHEITHAUER B.W., VOGEL F.S. (2002). *Surgical Pathology of the Nervous System and Its Coverings*. 4th Ed. Philadelphia: *Churchill Livingstone*. 180-196.
- BYRNE T.N. (1994). Imaging of gliomas. *Seminars in Oncology*. **21**(2): 162-171.
- CAVENEY W.K., KLEIHUES, P. (2000). Diffusely infiltrating astrocytomas. *Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System*. 2nd ed. *IARC Press*. Lyon. 10–21.
- CAVENEY, W.K., (2000). High-grade gliomas with chromosome 1p loss. *Journal of neurosurgery*. **92**(6): 1080–1.
- CHAKRAVARTI, A., ZHAI, G., SUZUKI, Y., SARKESH, S., BLACK P.M., MUZIKANSKY A., LOEFFLER, J.S. (2004). The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *J Clin Oncol*. **22**(10), 1926–1933.

- CHANG, H.F., HUANG, W.T., CHEN, H.J., YANG, L.L. (2010). Apoptotic effects of α -mangostin from the fruit hull of *Garcinia mangostana* on human malignant glioma cells. *Molecules*, **15**(12):8953-66.
- CHEN, Y., HU, F., ZHOU, Y., CHEN, W., SHAO, H. AND ZHANG, Y. (2013). MGMT Promoter Methylation and Glioblastoma Prognosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Archives of Medical Research*. **4**:33-34.
- CHI, J., GU, B., ZHANG, C., PENG, G., ZHOU, F., CHEN, Y., ZHANG, G., GUO, Y. (2012). Human Herpesvirus 6 Latent Infection in Patients with Glioma. *Journal of Infectious Diseases*. **206**(9): 1394–8.
- CHUN-I S., WAN-PEI S., MING-FU C., CHEN-YU L., YU-AN C., NAN-SHAN C. (2013). Assessing current therapeutic approaches to decode potential resistance mechanisms in glioblastomas. published: 19 March 2013 doi: 10.3389/fonc.2013.00059
- CRAWFORD, J.R, SANTI, M.R, THORARINSDOTTIR, H.K., CORNELISON, R., RUSHING, E.J., ZHANG, H., YAO, K., JACOBSON, S. (2009). Detection of human herpesvirus-6 variants in pediatric brain tumors: Association of viral antigen in low grade gliomas. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. **46**(1): 37–42. doi:10.1016/j.jcv.2009.05.011. PMC 2749001. PMID 19505845.
- CROCE C.M. (2008), Molecular origins of cancer. *Oncogenes and Cancer*.
- CROCKER, M., ASHLEY, S., GIDDINGS, I., PETRIK, V., HARDCASTLE, AHERNE, A., PEARSON, A., BELL, A., ZACHAROULIS, S., PAPADOPOULOS M. (2010). Serum angiogenic profile of patients with glioblastoma identifies distinct tumor subtypes and shows that TIMP-1 is a prognostic factor. *Neuro-Oncology*. **13**(1):99–108.
- DUCRAY F.Ç., IDBAIH A., WANG X.W, CHENEAU C., LABUSSIÈRE M., SANSON M. (2011). Predictive and prognostic factors for gliomas. *Expert Rev. Anticancer Ther*. **11**(5), 781–789.
- DUNWELL T., HESSON L., AT A., (2010). Genome-wide screen identifies frequently methylated genes in haematological and epithelial cancers, *Molecular Cancer*.
- DURMAZ R, VURAL M. (2007). Primer ve Sekonder Glioblastoma Multiforme Genetiği. *Türk Nöroşirürji Dergisi*. **17**(2):80-90.
- DZIURZYNSKI K., CHANG S.M., HEIMBERGER A.B., KALEJTA R.F., MCGREGOR DALLAS S.R., SMIT M., SOROCEANU L., COBBS C.S. (2012). Consensus on the role of human cytomegalovirus in glioblastoma. *Neuro Oncol*. **14**(3):246-255
- ENGSTRÖM, P.G., TOMMEI, D., STRICKER, S.H., ENDER, C., POLLARD, S. M., BERTONE, P. (2012). Digital transcriptome profiling of normal and glioblastoma-derived neural stem cells identifies genes associated with patient survival. *Genome Medicine*. **4**:76

- EOM K.S, KIM H.J., SO, H.S., PARK, R., KIM, T.Y. (2010). Berberine-induced apoptosis in human glioblastoma T98G cells is mediated by endoplasmic reticulum stress accompanying reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **33**(10):1644-9.
- ESTELLER, M., GARCIA-FONCILLAS, J., ANDION, E. (2002). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*. **343**:1350-4.
- FRANZ, F.J., TELENTSCHAK, S., GOLDBRUNNER, R., ADDICKS, K. Genetic Diversity of Glioblastoma Multiforme. *Impact on Future Therapies*. www.intechopen.com
- GROSS M.W., WEBER W.A., FELDMANN H.J., BARTENSTEIN P., SCHWAIGER M., MOLLS M. (1998). The value of F-18-fluorodeoxyglucose PET for the 3-D radiation treatment planning of malignant gliomas. *IntJ Radiat Oncol Biol Phys*. **5**: 989-995.
- HARDELL, L., CARLBERG, M., HANSSON M.K. (2009). Epidemiological evidence for an association between use of wireless phones and tumor diseases. *Pathophysiology*. **16**(2-3): 113–22.
- HASSE JC, SUCKER A, EDLER L, KURZEN H, MOLL I, STRESEMANN C, SPIETH K, MAUCH C, RASS K, DUMMER R, SCHADENDORF D. (2010). MGMT gene promoter methylation correlates with tolerance of temozolomide treatment in melanoma but not with clinical outcome. *Br J Cancer*; **7**; **103**(6): 820– 826.
- HAYDEN, E.C. (2010). Genomics boosts brain-cancer work. *Nature*. **463**(7279): 278. doi:10.1038/463278a. PMID 20090720.
- HE, H., ZHAN, Y. (2011). Synthesis of novel taspine diphenyl derivatives as fluorescence probes and inhibitors of breast cancer cell proliferation. *Wiley Online Library*
- HE, H.Z., WANG, N., ZHANG, J., ZHENG, L., ZHANG Y.M. (2009-2014) Tas13D Inhibits Growth of SMMC-7721 Cell via Suppression VEGF and EGF Expression. *Asian Pacific J Cancer Prev*.
- He, H.Z., Wang, N., Zhang, J., Zheng, L., Zhang, Y.M. (2012). Tas13D inhibits growth of SMMC-7721 cell via suppression VEGF and EGF expression. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, **13**(5):2009-14.
- HEGI M.E., DISERENS A.C., GORLIA T., (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. **352**: 997–1003.
- HIROSE Y., BERGER M.S., PIEPER R.O. (2001). Abrogation of the Chk1-mediated G2 checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. **61**: 5843-9.
- HOYER-HANSEN M, BASTHOLM L, SZYNIAROWSKI P, et al. (2007). Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Molecular Cell*, **25**(2):193-205.

- HUSE, J.T., HOLLAND, E.C. (2010). Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nature Reviews Cancer*, **10**: 319-31.
- IACOB G., DINCA EB. (2008) Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *Journal of medicine and life*. **2**(4):386-93.
- ICHIMURA K., PEARSON D.M., KOCIALKOWSKI S., BÄCKLUND L.M., CHAN R., JONES D.T., COLLINS V.P. (2009). IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol*. **11**(4):341-7.
- JONG Kil W., TOFILON PJ, CAMPHAUSEN K. (2012). Post-radiation increase in VEGF enhances glioma cell motility in vitro. *Radiation Oncology*, **7**:25
- KAINA, B., CHRISTMANN, M., NAUMANN, S., ROOS, W.P. (2007). MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA repair*. **6**(8):1079- 1099.
- KAINA, B., MARGISON, G.P., CHRISTMANTN, M., TARGETING, O. (2010). Methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Science*. **67**(21):3663-81.
- KAN, P., SIMONSEN, S.E., LYON, J.L., KESTLE, J.R.W. (2007). Cellular phone use and brain tumor: A meta-analysis. *Journal of Neuro-Oncology*. **86** (1): 71–8.
- KANEKO, T., ZHANG, Z., G. MANTELLINI, M., ET AL. (2007) Bcl-2 Orchestrates a Cross-talk between Endothelial and Tumor Cells that Promotes Tumor Growth. *Cancer Res*; **67**:9685-9693
- KANG R, ZEH HJ, LOTZE MT, TANG D. (2011). The Beklin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, **18**, 571–580
- KANU, O.O., HUGHES, B., DI, C., NINGJING, L.N., JINRONG, F.J, BIGNER, D.D., YAN, H., ADAMSON, C. (2009). Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin Med Oncol*. Apr 8; **3**:39-52.
- KIL, W.J., TOFILON, P.J., CAMPHAUSEN, K. (2012). Post-radiation increase in VEGF enhances glioma cell motility in vitro. *Radiation Oncology*, **7**:25.
- KIM, T.Y., ZHONG, S., FIELDS, C.R. (2006) Epigenomic Profiling Reveals Novel and Frequent Targets of Aberrant DNA Methylation-Mediated Silencing in Malignant Glioma. *Cancer Research*. **66**:7490-7501.
- KLEIHUES P., PC, SCHEITHAUER BW. (1993). The new WHO classification of brain tumours. *Brain pathology*, Zurich, Switzerland. **3**(3):255-68.
- KLEIHUES, P., LOUIS, D.N., WIESTLER, O.D., BURGER, P.C., SCHEITHAUER B.W. (2007). WHO classification of tumours of the central nervous system (4th Ed.). Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K. International Agency for Research on Cancer (IARC) Lyon; 10-11.
- KRAKSTAD C, CHEKENYA M. (2010). Survival signaling and apoptosis resistance in glioblastoma: opportunities for targeted therapeutics. *Molecular cancer*; **9**:135.

- KREX, D., KLINK, B., HARTMANN, C., VON DEIMLING, A., PIETTSCH, T., SIMON, M., SABEL, M., STEINBACH, J.P., HEESE, O., REIFENBERGER, G., WELLER, M., SCHACKERT, G. (2007). Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Journal of neurology*. **130**:2596-606.
- LABUSSIERA, M., WANG, X.W., IDBAIH, A., DUCRAY, F.Ç., SANSON, M. (2010). Prognostic Markers in Gliomas. *Future Oncol.* **6**(5), 733-39.
- LEE, C.H., JUNG, K.W., YOO, H., PARK, S., LEE, S. H. (2010). Epidemiology of Primary Brain and Central Nervous System Tumors in Korea. *Journal Korean Neurosurg Soc.* **48**: 145-152.
- LEE, W.H., JIN, J.S., TSAI, W.C., CHEN, Y.T., CHANG, W., YAO, C.W., SHEU, L.F., CHEN, A. (2006). Biological inhibitory effects of the Chinese herb danggui on brain astrocytoma. *Pathobiology.* **73**(3):141-8.
- LEHRER, S. (2010). Anopheles mosquito transmission of brain tumor. *Medical Hypotheses* **74**(1): 167–8. doi:10.1016/j.mehy.2009.07.005. PMID 19656635.
- LEIBEL, SA., SCOTT, CB., LOEFFLER, JS. (1994). Contemporary Approaches to the treatment of Malignant Gliomas With Radiation Therapy. *Seminars in Oncology*; **21**(2):198-21.
- LEVIN, V.A., LEIBEL, S.A., GUTIN, P.H. (2001). Neoplasms of the central nervous system. In: DeVita VT Jr, Hellmar S, Rosenberg SA, eds: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 6th ed. Philadelphia, Pa. *Lippincott Williams & Wilkins*. 2100-60.
- LI, Y., ZHANG, P., QIU, F., CHEN, L., MIAO, C., LI, J., XIAO, W., MA, E. (2010). Inactivation of PI3K/Akt signaling mediates proliferation inhibition and G2/M phase arrest induced by andrographolide in human glioblastoma cells. *Life Sciences*, **90**(25-26):962-7.
- LIANG C, LEE JS, INN KS, et al. (2008). Beklin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nature Cell Biology*, **10**(7):776-787.
- LOUIS, D.N., OHGAKI, H., WIESTLER, O. D., CAVENEE, W. K., BURGER, P.C., JOUVET, A., SCHEITHAUER, B.W., KLEIHUES, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* **114**:97.
- LU, W., DAI, B., MA, W., ZHANG, Y. (2012). novel taspine analog, HMQ1611, (2012) inhibits growth of non-small cell lung cancer by inhibiting angiogenesis Received April 19,; Accepted July 30,
- MAITY A, PRUITT AA, JUDY KD, PHILLIPS PC. (2004). Cancer of the central nervous system. In: Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG, eds: *Clinical Oncology*. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill Livingstone; 1347-1431.

- MARCHESE, F., TURRIZIANI, M., TORTORELLI, G., AVVISATI, G., TORINO, F., DEVECHIS, L. (2007). Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*. **56**(4):275-87.
- MICHAEL, V., SOFRONIEW, HARRY, V. VINTERS. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119:7–35.
- MONTOPOLI, M., BERTIN, R., ZHENG CHEN et. all. (2012). Croton lechleri sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, **144**(3):747-53.
- NAIK ULHAS, P. (2012). PTEN: not just a tumor suppressor. *Blood*. doi:10.1182/ - 2010-07-293464.
- NICOLA, J., ALLEN, B.A., BARRES (2009). Glia more than just brain glue. *Nature*, **457**:5.
- NIRMALA, M.J., SAMUNDEESWARI, A., SANKAR, P. D. (2011). Natural plant resources in anti-cancer therapy-A review. *Research in Plant Biology*, **1**(3): 01-14.
- OH, D., PRAYSON, R.A. (1999). Evaluation of epithelial and keratin markers in glioblastoma multiforme. An immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med*. **123**:917–920.
- OHGAKI H, DESSEN P, JOURDE B, HORSTMANN S, NISHIKAVA T, DI PATRE PL, BURKHARD C, SCHÜLER D, PROBST-HENSCH NM. (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*; **1**:6892- 9.
- OHGAKI, H., KLEIHUES, P. (2005). Population-Based Studies on Incidence, Survival Rates, and Genetic Alterations in Astrocytic and Oligodendroglial Gliomas. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. Volume 64 - Issue
- OHGAKI, H., KLEIHUES, P. (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Science*. 100: 12, 2235–2241.
- ONEY, John, W. MD, Farber., Nuri, B., Spitznagel., Edward., Robins, Lee N. (1996). Increasing Brain Tumor Rates: Is There a Link to Aspartame. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, **55**(11).
- PARKINSON, J.F., WHEELER, H.R. (2008). Variation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation in serial samples in glioblastoma. *J Neurooncol*. **87**:71–78
- PARKINSON, J.F., WHEELER, H.R., CLARKSON, A., MCKENZIE, C.A., BIGGS, M.T, LITTLE, N.S., COOK, R.J., MESSINA, M., ROBINSON, B.G., MCDONALD, K.L. (2008). Variation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation in serial samples in glioblastoma. *Clinical–Patient Studies*, **87**:71–78.
- Peng, C., et. al. (2010). PTEN is a tumor suppressor in CML stem cells and BCR-ABL-induced leukemias in mice. *Blood*, **115**:626–635.

- PERRY, J., OKAMOTO, M., GUIOU, M., SHIRAI, K., ERRETT, A., CHAKRAVARTI, A. (2012). Novel Therapies in Glioblastoma *Hindawi Publishing Corporation Neurology Research International*. Volume, Article ID 428565, 14 pages doi:10.1155/2012/428565
- PERRY, J., OKAMOTO, M., GUIOU, M., SHIRAI, K., ERRETT, A., CHAKRAVARTI, A. (2011). Novel Therapies in Glioblastoma. *Neurology Research International*, 2012: 14.
- PERSANO, L., RAMPAZZO, L., BASSO, L., VIOLA, G. (2013). Glioblastoma cancer stem cells: Role of the microenvironment and therapeutic targeting. *Biochemical Pharmacology*, **85**(2013) 612–622.
- PIPERI, C., THEMISTOCLEOUS, S. M., PAPAVALASSILIOU, A.G., FARMAKI, E., LEVIDOU, G. (2010). High incidence of MGMT and RARbeta promoter methylation in primary glioblastomas: association with histopathological characteristics, inflammatory mediators and clinical outcome. *Mol Med*. **16**(1- 2):1-9.
- PIRTOLI L, CEVENINI G, TINI P, VANNINI M, et.all. (2009). The prognostic role of Beklin 1 protein expression in high-grade gliomas. *Autophagy*; Vol. **5** Issue 7
- PRASAD, G., HAAS-KOGAN, D.A. (2009). Radiation-induced gliomas. *Expert review of Neurotherapeutics*. **9**(10):1511-7
- PRITCHETT,, JOSHUA C., NANAU, RADU M., NEUMAN, MANUELA G. (2012). The Link between Hypersensitivity Syndrome Reaction Development and Human Herpes Virus-6 Reactivation. *International Journal of Hepatology*. doi:10.1155/2012/723062. PMC 3362035. PMID 22666603.
- Q2, YANG CHEN., A, FULAN HU., B, YIHENG ZHOU., C, WANGYANG CHEN., D, HONGYING SHAO., E, YING ZHANGE. (2013). MGMT Promoter Methylation and Glioblastoma Prognosis. *Archives of Medical Research*.
- QIN G, KISHORE R, DOLAN CM, SILVER M, WECKER A. et.all. (2006). Cell cycle regulator E2F1 modulates angiogenesis via p53-dependent transcriptional control of VEGF. *PNAS*, vol. **103** no. 29, 11015–11020
- RICH, J.N., HANS, C., JONES, B. (2005). Gene Expression Profiling and Genetic Markers in Glioblastoma Survival *Cancer Res*. 65:4051-4058
- RIVERA, L.A., PELLOSKI, E.C. (2010). Diagnostic and Prognostic Molecular Markers in Common Adult Gliomas. *Expert Rev Mol Diagn*. 10(5),637-649.
- ROSELL, R., DE LAS PENAS, R., BALANA, C., SANTARPIA, M., SALAZAR, F., DE AGUIRRE, I., REGUART, N., VILLA, J., WEI, J., RAMIREZ, JL., MOLINA, MA., Y CAJAL, SR., JABLONS, D., TARON, M. (2008). Translational research in glioblastoma multiforme: molecular criteria for patient selection. *Future Oncology*; **4**(2):219-228.
- SARKAR C, JAIN A, SURI V. (2009) Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian Journal of Cancer*; **46**(2):108-119.

- SATHORNSUMETEE, S., RICH, JN.(2008). Designer Therapies for GlioblastomaMultiforme.*Annals of the New York Academy of Sciences*; **1142**:108-132.
- SHAPIRA,L., LEEB, A., VORAC,R., R. BUDMAN,D.(2013). P53 mutations in triple negative breast cancer upregulate endosomal recycling of epidermal growth factor receptor (EGFR) increasing its oncogenic potency. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **88**, 284–292.
- SODERBERG-NAUCLE, C., RAHBAR, A., STRAGLIOTTO, G. 2013. Survival in Patients with Glioblastoma receiving Valganciclovir.. *New England Journal of Medicine*. **369**:10-11.
- SOFRONIEW, M.V., VINTERS, H.V/ (2010). Astrocytes: biology and pathology. *ActaNeuropathologica*, **119**:7-35.
- SONODA, Y., KUMABE, T., WATANABE, M., NAKAZATO, Y., INOUE, T., KANAMORI, M., TOMINAGA, T. (2009). Long- term survivors of glioblastoma: clinical features and molecular analysis. *ActaNeurochir (Wien)*. **151**(11):1349-58.
- STUPP, R., DIETRICH, P-Y., OSTERMANN KRALJEVIC, S. (2002).Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastomamultiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide.*J ClinOncol*. **20**:1375-82.
- SZE, C.I., SU, W. P., CHIANG, M. F., LU, G.Y., CHEN, Y. A. AND CHANG, N. S. (2013). Assessing current therapeutic approaches to decode potential resistance mechanisms in glioblastomas. *Frontiers in oncology*. **3**:59.
- TANKER, M., TANKER, N. (1998). Farmakognozi. Ankara üniversitesi, eczacılık fakültesi, yayınları NO: 65, cilt 1, 2.
- TATTER SB. (2010).The new WHO Classification of Tumors affecting the Central Nervous System. Erişim, [<http://neurosurgery.mgh.harvard.edu/newwhobt.htm>]. Erişim tarihi; 20.08.2010.
- TERADA, K., TAMIYA, T., DAIDO, S., KAMBARA, H., TANAKA, H., ONO, Y., MATSUMOTO, K., ITO, S., OUCHIDA, M., OHMOTO, T., SHIMIZU, K. (2002). Prognostic value of loss of heterozygosity around three candidate tumor suppressor genes on chromosome 10q in astrocytomas. *J Neurooncol*. **58**(2):107-14.
- TSAI, N.M., LIN, S.Z., LEE, C.C., CHEN, S.P., SU,H., CHANG, W.L., HARN, H.J. (2005). The antitumor effects of *Angelica sinensis* on malignant brain tumors in vitro and in vivo.*Clinical Cancer Research*, 1; **11**(9):3475-84.
- URMAZ R, VURAL M. (2007). Primer ve Sekonder Glioblastoma Multiforme Genetiği. *Türk Nöroşirürji Dergisi*; 17(2):80-90.
- VAN WIJNGAARDEN, EDWIN., DOSEMEDI, MUSTAFA. (2006). Brain cancer mortality and potential occupational exposure to lead: Findings from the National Longitudinal Mortality Study, 1979–1989". *International Journal of*

- Cancer*. **119**(5): 1136–44. doi:10.1002/ijc.21947. PMID 16570286.
- VERHAAK, ROEL G. W., HOADLEY, KATHERINE A., PURDOM, ELIZABETH., WANG, VICTORIA., QI, YUAN., WILKERSON, MATTHEW D., MILLER, C. RYAN., DING, LI. (2010). "Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1". *Cancer Cell*. **17**(1): 98–110.
- VERKHTASKY, A.N., BUTT, A. (2007). Glial Neurobiology a textbook. *John Wiley and Sons*, Chapter 1, p.: 3-12.
- WEINGART, J., BREM, H. (1993). Brain Tumors and Cancers of the Central Nervous System. Neiderhuber JE. Current Therapy. First ED., Decker: Mosby- Year Book Inc: 538-546.
- WELLER, M., WICK, W., HEGI, M.E., STUPP, R., TABATABAI, G. Should biomarkers be used to design personalized medicine for the treatment of glioblastoma? *Future Oncology*, **6**(9):1407-14.
- WELLER, M., WICK, W., HEGI, ME., STUPP, R., TABATABAI, G. (2010). Should biomarkers be used to design personalized medicine for the treatment of glioblastoma. *Future Onco*. **6**(9):1407-14.
- WEN Lu, HE LC, ZENG XM. (2008) HPLC method for the pharmacokinetics and tissue distribution of taspine solution and taspine liposome after intravenous administrations to mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **46**:170–176
- WHEELER, LAMAR., HUNCHAREK, MICHAEL., KUPELNICK, BRUCE. (2003). "Dietary Cured Meat and the Risk of Adult Glioma: A Meta-Analysis of Nine Observational Studies". *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. **22**(2): 129–37. doi: 10.1615/JEnvPathToxOncol.v22.i2.60. PMID 14533876.
- YANG, A.K., HE, S. M., LIU, L., LIU, J. P., WEI, M.Q., ZHOU, S.F. (2010). Herbal interactions with anticancer drugs: mechanistic and clinical considerations. *Curr Med Chem*. **17**(16):1635-78.
- YOST, S. E., PASTORINO, S., ROZENZHAK, S., SMITH, E. N., CHAO, Y. S., JIANG, P., KESARI, S., FRAZER, K. A., HARISMENDY, O. (2013). High-Resolution Mutational Profiling Suggests the Genetic Validity of Glioblastoma Patient-Derived Pre- Clinical Models. *PLoS ONE* **8**(2): e56185.
- YU A, J., ZHANG, L. (2005). The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **331**:851–858.
- ZHAN, Y., WANG, N., LIU, C. (2012). A novel taspine derivative, HMQ1611, suppresses adhesion, migration and invasion of ZR-75-30 human breast cancer cells, Received: 3 February 2012 / Accepted.
- ZHANG, J., ZHANG, Y., SHAN, Y., LI, N., MA, W., HE, L. (2010). Synthesis and preliminary biological evaluation of novel taspine derivatives as anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **45** 2798e2805

- ZHANG, J., ZHANG, Y., SHAN, Y., LI, N., MA, W., HE, L. (2010). Synthesis and preliminary biological evaluation of novel taspine derivatives as anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **45**: 2798e2805.
- ZHANG, X., ZHANG, W., CAO, W.D., CHENG, G., AND ZHANG, Y.Q. (2012). Glioblastomamultiforme: Molecular characterization and current treatment strategy (Review). *Experimental And Therapeutic Medicine*, **3**: 9-14.
- ZHANG, Y., HE, L., MENG, L., LUO, W. (2008). Taspine isolated from Radix et RhizomaLeonticis inhibits proliferation and migration of endothelial cells as well as chicken chorioallantoic membrane neovascularization. *Vascular Pharmacology* **48**: 129–137.
- ZHANG, Y., HE, L., ZHOU, Y. (2008). Taspine isolated from Radix et RhizomaLeonticis inhibits growth of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) by inducing its apoptosis. *Phytomedicine* **15**:112–119.
- Zhang, Y., Zhang, J., Dai, B., Wang, N., He, L. (2011). Anti-proliferative and apoptotic effects of the novel taspine derivative tas41 in the Caco-2 cell line. *Environ Toxicology Pharmacology*, **31**(3):406-15.
- ZHENG., XU, HE., WEINA, MA., BINGLING, DAI., YINGZHUAN, ZHAN., YANMIN, ZHANG. (2012). Ta1722, an anti-angiogenesisinhibitortargeted on VEGFR-2 againsthumanHepatoma, *Biomedicine&Pharmacotherapy*. **66**: 499–505

ÖZGEÇMİŞ

1. KİŞİSEL BİLGİLER

ADI, SOYADI:	Shahrashoub Sharifi
DOĞUM TARİHİ ve YERİ:	1979.03.21
HALEN GÖREVİ: Yüksek Lisans Öğrencisi	
YAZIŞMA ADRESİ: Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD	
TELEFON: 05417926476	
E-MAIL: sh.shery89@yahoo.com	

2. EĞİTİM

YILI	DERECESİ	ÜNİVERSİTE	ÖĞRENİM ALANI
2000-2004	Lisans	İran/Tonekabon Üniversitesi	Hücre ve molekül biyolojisi(genetic)
2011-2013	Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi	Tıbbi Biyoloji

3. AKADEMİK DENEYİM

GÖREV DÖNEMİ	ÜNVAN	BÖLÜM	ÜNİVERSİTE

4. ÇALIŞMA ALANLARI

ÇALIŞMA ALANI	ANAHTAR SÖZCÜKLER
Kanser, Sitogenetik, Moleküler genetik	GBM, Taspine

Yazılar ve Makaleler:**Kitap**

Human cloning , AyizhPublications, Iran 2008

Patent

Prenatal diagnosis of fetal sex by molecular analysis of maternal plasma after 8 weeks of gestation by nested PCR (TESLİM VE HİMAYET TARİHİ 23.04.2007,KODU (30)A(85-1)T

GenBanka kayıtlı olan genler (NCBI-nucleotide)

- 1- Pseudomonas sp. YB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: JX134087.1
- 2- Exiguobacterium sp. S90 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: JX134079.1
- 3- Chryseobacterium sp. FF 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: JX134085.1
- 4- Exiguobacterium sp. Kasra 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: JX134083.1
- 5- Exiguobacterium sp. RN1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: JX134081.1
- 6- Exiguobacterium sp. S90 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: JX134079.1
- 7- Bacillus licheniformis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: JX134077.1
- 8- Serratia sp. FA1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: JX134075.1

- 9- *Brevundimonas diminuta* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: JX134073.1
- 10- *Acinetobacter* sp. BM1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: JX134086.1
- 11- *Delftia* sp. sasani 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: JX134084.1
- 12- *Comamonas* sp. PK 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: JX134082.1
- 13- *Micrococcus* sp. AA79 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: JX134080.1
- 14- *Pseudomonas* sp. SF90 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: JX134078.1
- 15- *Serratia* sp. SH1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: JX134076.1
- 16- *Planococcus* sp. AN1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: JX134074.1
- 17- *Lysinibacillus fusiformis* strain KN-Lip-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: JN043368.1
- 18- *Bacillus megaterium* strain KN-Lip-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: JN043369.1

Makaleler

1. Detection of stx1, stx2, LT and ST toxin genes and O157 and H7 antigen genes among uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Iran. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(5), pp. 867-869, 9 February, 2012.

2. Screening for Germline Mutations in STK11 gene in Iranian Patients with Various Gastrointestinal Cancers. *South Asian J Exp Biol*; 2 (2): 61-65; 2012
3. Genotypic versus Phenotypic methods to detect Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Annals of Biological Research*, 2012, 3 (5):2454-2458
4. A Novel and Simple Method for HCV Genotyping. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology* 1 (2011) 40-45.
5. Distribution of Pathogenic Genes *aatA*, *aap*, *aggR*, Among Uropathogenic *Escherichiacoli* (UPEC) and Their Linkage with *StbA* Gene. *Indian Journal of Microbiology*. Volume 51, Number 3 (2011), 355-358.
6. Isolation and molecular identification of lactic acid bacteria in raw milk Central Alborz heights using High Resolution Real Time PCR and 16S rDNA PCR Sequencing. *Journal - Microbial Biotechnology Research*. 2010 second round, No. V. Pages 21 to 28.
7. Distribution of genes encoding fimbriae in *E.coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Journal of Laboratory Sciences*, Volume IV (No. 2) 2011
8. The prevalence of beta-lactamase resistance genes SHV / CTX-M / TEM in *E. coli* isolated from urinary tract infections in Tehran. *Journal of Laboratory Sciences*, Gorgan University of Medical Sciences, Volume 4, Number 1, Spring summer 2010 pages 48 to 54.
9. Quantitative detection of major BCR-ABL gene transcripts by competitive RT-PCR in chronic myeloid leukemia (CML) patients. *Iranian journal of BIOLOGICAL SCIENCES* (vol 3, issue 2, summer (2008) (ISSN-1735-4226)

Poster

Screening for Germline Mutations in STK11 gene in Iranian Patients with Various Gastrointestinal Cancers. *Tıbbi biyoloji ve Genetik kongresi Antalya 2012*.