

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE TEMOZOLOMİDİN
TEKRARLAYAN UYGULAMASI İLE GELİŞEN DİRENÇ
MEKANİZMALARI ÜZERİNE KERSETİNİN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

Hazırlayan
Sedat GÜLAY

Danışman
Prof. Dr. Mükerrerem Betül AYCAN

Doktora Tezi

Kasım 2019

KAYSERİ

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE TEMOZOLOMİDİN
TEKRARLAYAN UYGULAMASI İLE GELİŞEN DİRENÇ
MEKANİZMALARI ÜZERİNE KERSETİNİN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

(Doktora Tezi)

**Hazırlayan
Sedat GÜLAY**

**Danışman
Prof. Dr. Mükerrerem Betül AYCAN**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TDK-2016-6538 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

Kasım 2019

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Sedat GÜLAY

İmza:

XXXXXXXXXX

YÖNERGEYE UYGUNLUK

“Glioblastoma hücrelerinde temozolomidin tekrarlayan uygulaması ile gelişen direnç mekanizmaları üzerine kersetinin etkilerinin incelenmesi” adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Sedat GÜLAY

İmza

Danışman

Prof. Dr. M. Betül AYCAN

İmza

ABD Başkanı

Doç. Dr. Zafer SEZER

İmza

Prof. Dr. M. Betül YERER AYCAN danışmanlığında **Sedat GÜLAY** tarafından hazırlanan “Glioblastoma hücrelerinde temozolomidin tekrarlayan uygulaması ile gelişen direnç mekanizmaları üzerine kersetinin etkilerinin incelenmesi” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

22 / 11 / 2019

(Tez savunma sınav tarihi yazılacaktır.)

JÜRİ:

Danışman	:Prof Dr. M. Betül AYCAN
Üye	:Prof. Dr. Seyhan ŞAHAN FIRAT
Üye	:Doç. Dr. Zafer SEZER
Üye	:Dr. Öğr. Üyesi Melike Hacer ÖZKAN
Üye	:Dr. Öğr. Üyesi Eren DEMİRPOLAT

.....

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve
 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... / /

.....

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Eğitim süresinde ve çalışmalarda her zaman yanımda hissettiğim, bilgilerini ve deneyimini koşulsuz paylaşan çok değerli hocam Prof. Dr. M. Betül Aycan'a, bu süreçte emeğini esirgemeyen Doç. Dr. Ahmet Cumaoğlu'na, Doç. Dr. Özlem Timirci Kahraman'a, Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Kübra Karaboğa Arslan'a, Dr. Öğr. Üyesi Eren Demirpolat'a, Arş. Gör. Ebru Öztürk'e, Dr. Alim Hüseyin Dokumacı'ya, Gen-Kök Araştırma Merkezi personeline, Murat Taşdemir'e, her zaman manevi destek olan eşim, kızım ve aileme, küçük büyük bu çalışmada emeği olan herkese teşekkür ederim.

Sedat GÜLAY
Kayseri, Kasım 2019

GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE TEMOZOLOMİDİN TEKRARLAYAN UYGULAMASI İLE GELİŞEN DİRENÇ MEKANİZMALARI ÜZERİNE KERSETİNİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Sedat GÜLAY
Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakoloji Dalı
Doktora Tezi, Temmuz 2019
Danışman: Prof. Dr. M. Betül AYCAN

ÖZET

Glioblastoma multiforme en sık rastlanan ve en agresif beyin tümörlerindendir. Yetişkinlerdeki beyin tümörlerinin %60'ını oluşturur. Modern tedavilere rağmen halen çok ölümcül ve hızlı prognozu olan bir hastalıktır. Temozolomid, glioblastoma hastalarında standart kemoterapi ajanıdır. DNA'da N7 ve O6 pozisyonundaki guanini metilleyerek DNA onarım mekanizmasını etkiler ve hücre siklusunu G2-M evresinde durdururarak apoptozu tetikler. O6-metilguanin metil taşıyıcı ise guaninin O6 pozisyonuna bağlanan metili uzaklaştırarak temozolomidin antikanserojenik etkisini azaltmaktadır. Çalışmalarda MGMT enzim aktivitesi ve temozolomide dirençli GBM hücreleri arasında ilişki gösterilmiştir. Bu sebeple, çalışmanın amacı temozolomide dirençli ve duyarlı iki farklı GBM hücre hattına (T98G ve U87) temozolomid ile birlikte çoklu uygulanan kersetinin ilaç direnç mekanizmaları üzerine etkisinin incelenmesidir. Bu çalışmada T98G ve U87 hücre hatlarına 50 µM temozolomid ve/veya 25 µM kersetin 72 saat boyunca 24 saatte bir uygulanmış, gerçek zamanlı hücre analizi ile hücre canlılıkları ve akış sitometrisi ile de erken ve geç apoptoz üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Aynı hücre hatlarına 120 saat boyunca 24 saatte bir 50 µM temozolomid ve/veya 25 µM kersetin uygulanmış, MTT ile hücre canlılığı ve RT-PCR ile de MGMT, LRP, ERCC2, EGFR ve Bcl-2 direnç genlerinin ekspresyon seviyeleri ölçülmüştür.

Çalışma sonuçlarına göre T98G ve U87 hücre hatlarına temozolomid ve kersetin birlikte tekrarlı uygulandığında hücre canlılıklarını azaltmıştır. Temozolomide direnç gelişmesinden sorumlu MGMT ve bazı direnç genlerinin ekspresyon seviyeleri T98G hücre hattında yüksek bulunmuştur. Tekrarlı temozolomid ve kersetin uygulaması bu genlerin ekspresyon seviyelerini azaltmakta etkili bulunmuştur. Ayrıca kersetin ve temozolomid kombinasyonu erken ve geç apoptozu tetiklemiştir. Ancak kersetinin bu etkileri *in vivo* ve klinik çalışmalarla da desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Temozolomid, ilaç direnci, glioblastoma, kersetin, kanser

**INVESTIGATION OF QUERCETIN'S EFFECTS ON DRUG RESISTANCE
MECHANISMS OCCURING WITH REPETITIVE TEMOZOLOMIDE
TREATMENT IN GLIOBLASTOMA CELL LINE**

Sedat GÜLAY

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Pharmacology

PhD Thesis, July 2019

Supervisor: Prof.Dr. M. Betül AYCAN

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme is one of the most common and aggressive brain tumors. It forms the %60 of adult brain tumors. It is very mortal and rapid prognosis disease despite novel therapies. Temozolomide is standart chemotherapy agent for patients with glioblastoma multiforme. The action of mechanism of temozolomide is the methylation of DNA guanin at position N7 and O6 and trigger apoptosis by interrupting cell cycle on G2-M. O6-methyl-guanin methyl transferase enzyme decrease the anticancinogenic effects of temozolomide by retake methyl at position O6. Relation between MGMT enzyme activity and temozolomide resistant GBM cell was shown in studies. So the aim of this study is to investigate the effects of repetative treatment of temozolomide and/or quercetin on resistant or sensitive GBM cell lines for temozolomide (T98G and U87).

In this study, T98G and U87 cell line treated with 50 µM temozolomide and/or quercetin 25 µM once a 24 hours during 72 hours and evaluated after real time cell analysis for cell survival and flowcytometry analysis for early or late apoptosis. Cell proliferation rate and MGMT, LRP, ERCC2, EGFR ve Bcl-2 resistance genes expression level evaluated with MTT and RT-PCR analysis method after 50 µM temozolomide and/or quercetin 25 µM treatment as once a 24 hours during 120 hours also.

According to our results, cell proliferation rate of T98G and U87 were reduced with repeatly temozolomid and quercetin treatment. Gene expression level of MGMT related to resistance for temozolomide and other resistance genes was evaluated as highly on T98G cell line. Treatment repeatly with temozolomide and quercetin found as effective for reducing these resistant genes expression levels. Temozomide and quercetin combination treatment induced early and late apoptosis also. However, there is still a need for further *in vivo* and clinical studies to confirm these results.

Keywords: Temozolomide, drug resistance, glioblastoma, quercetin, cancer

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	ii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.BEYİN TÜMÖRLERİ	3
2.1.1.Beyin Tümörleri Epidemiyolojisi.....	4
2.1.2.Beyin Tümörleri Etiyopatogenezi	7
2.1.3.Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması	7
2.2.GLİOBLASTOMA MULTİFORME	11
2.2.1.GBM Tedavisi ve Kemoterapi	13
2.2.2.Temozolomid'in Klinik Kullanımdaki Önemi	14
2.2.3.Temozolomid'in Sitotoksik Etkisine Direnç	16
2.3.GBM VE DİRENÇ MEKANİZMALARI ARASINDAKİ İLİŞKİ	17
2.3.1.Glioblastomada İlaç Direnç Genleri.....	19
2.4.KERSETİN'İN ANTİKARSİNOJENİK VE KEMOTERAPÖTİK ÖZELLİKLERİ	23
3.GEREÇ ve YÖNTEM.....	25
3.1.Kimyasallar	25

3.2.Cihazlar	26
3.3.Hücre Kültürü.....	27
3.4.MTT	27
3.6.Gen Ekspresyonunun Gerçek zamanlı-PCR (RT-PCR) Sistemi ile Tespit Edilmesi	29
3.7.Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (RTCA, Xcelligence).....	30
4.BULGULAR	31
4.1.MTT	31
4.2.GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZİ (XCELLIGENCE)	37
4.3.AKIŞ SİTOMETRİSİ	41
4.4.RT-PCR.....	51
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	58
6.KAYNAKLAR	66
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

ABC:	ATP bağımlı kaset
APNG:	Alkilpurin-DNA-N-glikozilaz
Bcl-2:	B-Cell CLL/Lymphoma 2
BCR:	Meme kanseri direnç proteini
CBTRUS:	Amerika merkezi beyin tümörü kayıt kütüğü
DEPC:	Dietilpirokarbonat
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EGFR:	Epidermal büyüme faktörü
ERCC2:	Kesip-çıkarma çapraz grup tamamlama tamir mekanizması
GBM:	Glioblastoma multiforme
GLUT1:	Glukoz taşıyıcı 1
KBB:	Kan beyin bariyeri
LRP:	Akciğer direnç proteini
MDM2:	Fare double minute 2
MDR:	Çoklu ilaç direnci ile ilişkili
MGMT:	O6-Metilguanin metil transferaz
MMR:	Yanlış eşleme tamir mekanizması
MTT:	Hücre canlılık testi
NF-kB:	Nukleer faktör kappa
O6 MeG:	O6 metilguanin
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PTEN:	Fosfat tutucu tensin analogu
PDGF:	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PDGFR:	Trombosit kaynaklı büyüme faktör reseptörü alfa
RTK:	Reseptör Tirozin Kinaz
SSS:	Santral sinir sistemi
TK:	Tirozin kinaz
TMZ:	Temozolamid
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Beyin kanserleri için epidemiyolojik çalışmalarda araştırılmış çevresel risk faktörleri.....	8
Tablo 2: WHO santral sinir sistemi tümörleri sınıflandırması (2016).....	9



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Çocuklarda histolojik olarak SSS tümörleri.....	5
Şekil 2: Yetişkinlerde histolojik olarak tüm SSS tümörleri.....	5
Şekil 3: Yaşa göre düzenlenmiş en sık görülen SSS tümörlerini insidansı	6
Şekil 4: Temozolomidin kimyasal yapısı	15
Şekil 5: Fizyolojik pH'da temozolomidin dönüşümü	15
Şekil 6: U87 hücrelerinin kersetin (25,50 ve 100 μ M) ile 24 saatlik inkübasyonu sonrası MTT ile ölçülen hücre canlılığı oranı.	33
Şekil 7: T98G hücrelerinin kersetin(25,50 ve 100 μ M) ile 24 saatlik inkübasyonu sonrası MTT ile ölçülen hücre canlılığı oranı.	33
Şekil 8: U87 hücrelerine 120 saat boyunca 24 saat aralıklarla TMZ (25,50,100,200 ve 400 μ M) uygulanması ve inkübasyonu sonrası MTT ile ölçülen hücre canlılığı oranı.	34
Şekil 9: T98G hücrelerine 120 saat boyunca 24 saat aralıklarla TMZ (25,50,100,200 ve 400 μ M) uygulanması ve inkübasyonu sonrası MTT ile ölçülen hücre canlılığı oranı.	34
Şekil 10: U87 hücrelerine 120 saat boyunca 24 saatte bir TMZ 50 μ M ve kersetin 25 μ M 24 uygulanması ve inkübasyonu sonrası MTT ile ölçülen hücre canlılığı oranı.	36
Şekil 11: T98G hücrelerine 120 saat boyunca 24 saatte bir TMZ 50 μ M ve kersetin 25 μ M 24 uygulanması ve inkübasyonu sonrası MTT ile ölçülen hücre canlılığı oranı.	36
Şekil 12: xCelligence ile U87 hücre profillemesi	38
Şekil 13: xCelligence ile T98G hücre profillemesi.....	38
Şekil 14: U87 hücre hattında TMZ'nin tekli ve kersetin ile birlikte uygulanması ile elde edilen hücre indeks eğrileri	40
Şekil 15: T98G hücre hattında TMZ'nin tekli ve kersetin ile birlikte uygulanması ile elde edilen hücre indeks eğrileri	40
Şekil 16: T98G hücre hattında DMSO içeren kontrol grubu ile 72 saat sonra gerçekleştirilen akış sitometri analizi.....	42
Şekil 17: T98G hücre hattına 72 saat boyunca 24 saatte bir TMZ 50 μ M uygulandıktan sonra gerçekleştirilen akış sitometri analizi.	43

Şekil 18: T98G hücre hattına 72 saat boyunca 24 saatte bir TMZ 50 μ M ve kersetin 25 μ M birlikte uygulandıktan sonra gerçekleştirilen akış sitometri analizi. ...	44
Şekil 19: T98G hücre hattına 72 saat boyunca 24 saatte bir kersetin 25 μ M uygulandıktan sonra gerçekleştirilen akış sitometri analizi.	45
Şekil 20: U87 hücre hattı DMSO içeren kontrol grubu ile 72 saat sonra gerçekleştirilen akış sitometri analizi.....	47
Şekil 21: U87 hücre hattına 72 saat boyunca 24 saatte bir TMZ 50 μ M uygulandıktan sonra gerçekleştirilen akış sitometri analizi.	48
Şekil 22: U87 hücre hattına 72 saat boyunca 24 saatte bir TMZ 50 μ M ve kersetin 25 μ M birlikte uygulandıktan sonra gerçekleştirilen akış sitometri analizi. ...	49
Şekil 23: U87 hücre hattına 72 saat boyunca 24 saatte bir kersetin 25 μ M uygulandıktan sonra gerçekleştirilen akış sitometri analizi.	50
Şekil 24: T98G dirençli glioblastoma hücre hattında 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulanan TMZ 50 μ M ve/veya kersetin 25 μ M sonrası elde edilen MGMT seviyeleri.	52
Şekil 25: T98G dirençli glioblastoma hücre hattında 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulanan TMZ 50 μ M ve/veya kersetin 25 μ M sonrası elde edilen Bcl-2 seviyeleri.	52
Şekil 26: T98G dirençli glioblastoma hücre hattında 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulanan TMZ 50 μ M ve/veya kersetin 25 μ M sonrası elde edilen ERCC2 seviyeleri.	53
Şekil 27: T98G dirençli glioblastoma hücre hattında 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulanan TMZ 50 μ M ve/veya kersetin 25 μ M sonrası elde edilen EGFR seviyeleri.....	53
Şekil 28: T98G dirençli glioblastoma hücre hattında 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulanan TMZ 50 μ M ve/veya kersetin 25 μ M sonrası elde edilen LRP-1 seviyeleri.....	54
Şekil 29: U87 duyarlı glioblastoma hücre hattında 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulanan TMZ 50 μ M ve/veya kersetin 25 μ M sonrası elde edilen Bcl-2 seviyeleri.	55
Şekil 30: U87 duyarlı glioblastoma hücre hattında 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulanan TMZ 50 μ M ve/veya kersetin 25 μ M sonrası elde edilen ERCC2seviyeleri.	55

- Şekil 31:** U87 duyarlı glioblastoma hücre hattında 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulanan TMZ 50 μ M ve/veya kersetin 25 μ M sonrası elde edilen EGFR seviyeleri..... 56
- Şekil 32:** U87 duyarlı glioblastoma hücre hattında 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulanan TMZ 50 μ M ve/veya kersetin 25 μ M sonrası elde edilen LRP-1 seviyeleri..... 56



1.GİRİŞ ve AMAÇ

Beyin tümörlerinin kaynağı beyin dokusu ve zarları ile farklı hücrelerdir (Lapointe et al., 2018). Glioblastoma multiforme (GBM) ise en sık rastlanan ve en agresif beyin tümörüdür (Holland, 2000, Ohgaki et al., 2004). Yetişkinlerdeki beyin tümörlerinin %60'ı GBM'dir (Rock et al., 2012). Ayrıca santral sinir sisteminde oluşan beyin tümörlerinin %80'inden sorumlu olduğu söylenebilir (Schwartzbaum et al., 2006, Agnihotri et al., 2013). Modern tedavilere rağmen GBM halen ve hızlı prognozu olan ölümcül bir hastalıktır. Hastalar tanı konulduktan sonra yaklaşık 15 ay kadar hayatta kalabilmektedirler (Ohka et al., 2012, Thakkar et al., 2014). Hastaların %50'si tanı konulduktan sonraki ilk yılı doldurmadan, %90'ı da üç yıl içinde ölmektedir (Ostrom et al., 2015).

Temozolomid (TMZ), karmustin, lomustin gibi alkilleyici ajanlar özellikle GBM'de avantaj sağlamıştır. Karmustin ve lomustin çok sitotoksik ajanlardır ve bunlarla yapılan tedavilerde çok erken direnç gelişmektedir. Sadece TMZ GBM hastalarında standart kemoterapi ajanıdır (Friedman et al., 2000, Reardon and Wen, 2006). TMZ'nin tedavi edici etki mekanizması sitotoksik özelliğine dayanmaktadır. DNA'da N7 ve O6 pozisyonundaki guanini metilleyerek DNA tamir mekanizmasında hasar oluşturması ve hücre siklusunda G2-M kesilmesiyle apoptozu tetikler (Scott et al., 2011). TMZ alkilleyici bir ajan olarak DNA adenin ve guanin rezervinin yaklaşık %90'ını N3-metiladenin ve N7-metilguanin şeklinde metillerken, %5-10'unu da O6-metilguanine metiller. Metillenmiş DNA temel kesip çıkarma ile ya da DNA eşlenmeyen tamir yolları ile düzeltilir. O6-metilguanin metil taşıyıcı (MGMT) guaninin O6 pozisyonunda tersine metilasyon yaparken MGMT aktivitesi ile TMZ cevabında azalma arasında korelasyon

bulunmamıştır. DNA hasarına fonksiyonel olmayan p53 cevabı, MGMT aktivitesinden daha fazla TMZ direnciyle ilişkili bulunmuştur (Bocangel et al., 2002).

MGMT ile ilgili insanda çok fazla çalışma yapılmış ve bu çalışmalara göre MGMT metilasyon kolaylaştırıcı ile TMZ ile tedavi edilen GBM hastalarının sağ kalımı arasında korelasyon bulunmuştur. Tüm GBM hastalarının metillemeyi kolaylaştırıcı MGMT'ye alkileyici ajanlarla cevap vermediklerini göstermiş ve sonuç olarak başka moleküllerin de TMZ'e dirençte etkili oldukları gösterilmiştir (Stupp et al., 2005, Hegi et al., 2008).

Son yıllarda yapılan araştırmalar bazı meyve ve sebzelerin düzenli olarak tüketiminin belirli kanserlere yakalanma riskini azaltabileceğini göstermiştir. Fitokimyasallar bazı meyve ve sebzelerin içeriğinde bulunan doğal bileşiklerdir ve bu bileşiklerin kanser oluşumunun önlenmesinde kullanılmasının yanı sıra kanser tedavisinde de kullanılabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Bu bileşiklerden kersetin, genistein, resveratrol, dialil sülfid, S-alil sistein, allisin, likopen, kapsaisin, kurkumin, 6-gingerol, ellajik asit, ürsolik asit, krisin, silimarin, anetol, kateşinler ve öjenol gibi aktif maddeler kanser önleyici ajanlar olarak adlandırılmaktadır (Dorai and Aggarwal, 2004, Kasala et al., 2015).

Kersetin bitkilerde büyümeyi düzenleyen polar oksin taşıma inhibitörüdür (Sharma et al., 2018, Srivastava et al., 2016). Kersetin serbest radikal süpürücü ve metal iyon radikale bağlanır (Costa et al., 2016, Sun et al., 2015). Bunun yanında aynı işlemde pro-oksidan etkileri de vardır. Kersetin oksitlendiğinde ilk oksidasyon ürünü stabil olmayan ve ikinci bir kinon oksidasyon işlemine giden semikinon radikalidir. Bu ürün kinonun toksik etkilerinden korumak için glutatyona bağlanır Ancak çok miktarda kersetine maruz kalan hücreler glutasyon azaldığında kinonlar proteinlere, lipitlere ve DNA'ya bağlanır ve hücredeki DNA hasarını indükler (Metodiewa et al., 1999, Chang et al., 2006, Fonseca-Silva et al., 2013, Bishayee et al., 2013).

TMZ beyin tümörü hücre hatlarında kersetin ile beraber kullanıldığında hücre hattının TMZ'ye karşı duyarlılığının arttığı ve apoptoz, proliferasyon, metastaz işlemleri üzerinden hücre ölümünü artırdığı gözlenmiştir (Gibellini et al., 2011, Hashemzaei et al., 2017, Lugli et al., 2009). Bu sebeple, çalışmanın amacı GBM hücre hatları olan T98G ve U87'de kullanılan TMZ için kersetinin etkisinin ve kersetinin ilaç direnç mekanizmaları üzerine etkisinin incelenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.BEYİN TÜMÖRLERİ

Beyin tümörlerinin kaynağı beyin dokusu ve zarları ile farklı hücrelerdir. Metastatik beyin tümörleri ve primer beyin tümörleri olarak 2 gruba ayrılır. Beyin dışındaki bir dokudan kaynaklanan tümörlere metastatik beyin tümörleri, beyin kaynaklı tümörlere de primer beyin tümörleri denir (Butowski, 2015, SS., 1997, Louis et al., 2007). Primer beyin hücreleri SSS heterojen yapıdaki tümörler olarak da adlandırılır (Lapointe et al., 2018).

Gliomalar yetişkinlerdeki beyin kanserlerinin %75'ini oluştururlar ve glial ya da prekürsör hücrelerden (astrositomalar, oligodendrogliomalar ve ependimomalar dahil) oluşan nöroektodermal kökenli tümörlerdir. Bu sınıflandırmalar Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2016'daki SSS tümörleri sınıflandırmasına girer.

Primer beyin tümörü olan hastalar, beyinde spesifik bölge ile ilişkili ya da günden haftaya, haftadan aylara yıllara varan tümörün büyüme hızına veya yerine bağlı olarak oluşan semptomlarla hastaneye başvururlar. Ayrıca ilişkili olmayan nedenlerle yapılan beyin görüntülemelerinde de ortaya çıkabilir (Lapointe et al., 2018).

Hayatta kalmayı azaltan, bilinen ve bilinmeyen çok fazla neden vardır. Bunlardan ana olanı ilaçların kan-beyin bariyerini geçememesi ki bu patojenlere karşı vücudu koruyan savunma mekanizmasıdır (Hayat, 2011). Terapi etkili olduğunda dahi yan etkiler birçok kısıtlama getirebilmektedir. Bir başka neden de difüze olmuş tümörün çıkarılması için sağlıklı dokuyu geçip tümöre ulaşamamasıdır. Buna ek olarak bu malign hücreler kemoterapi ve radyasyon terapisine yüksek oranda dirençlidir. Radyasyon tedavisinin ve kemoterapinin istenilen tedavi etkisinin yanında toksik etkileri de bulunmaktadır. (Hayat, 2011).

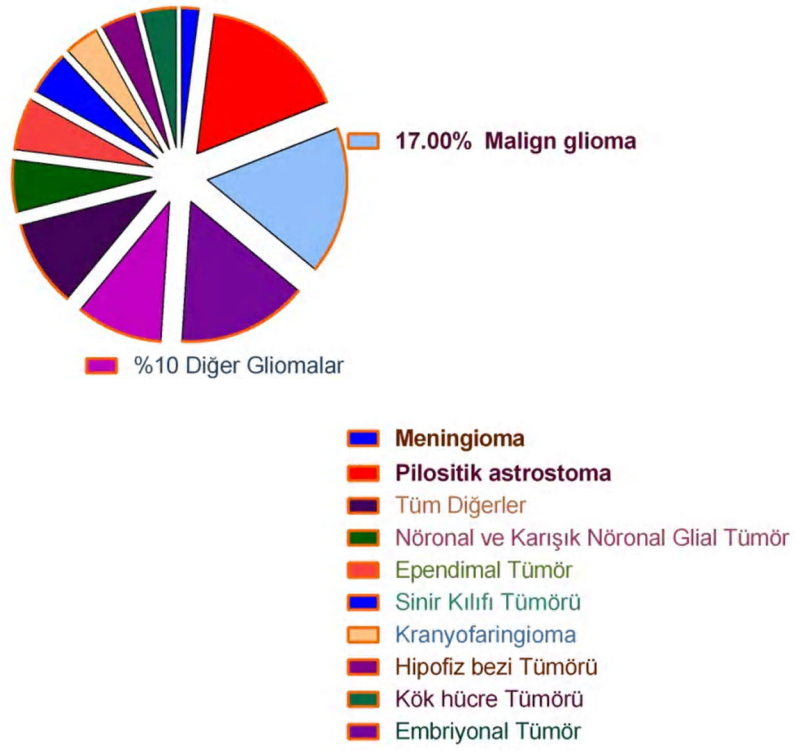
2.1.1.Beyin Tümörleri Epidemiyolojisi

SSS tümörleri nadirdir ve özellikle çocuklarda ve genç yetişkinlerdeki kanser ölümlerinin %20-30'undan sorumludur. Diğer kanserlere göre göreceli olarak daha ölümcüldür. Yeni kanser tanılarının %1,4'ünü kapsar ve tüm kanser ölümünün %2,4'ünden sorumludur (McNeill, 2016). Beyin kanserlerinde 5 yıl hayatta kalım söz konusu olup son 30 yılda ölüm oralarında da bir değişiklik olmamıştır. Çocuklarda 5 yıl hayatta kalma oranı 1970'lere kadar %25 civarında iken günümüzde %70 kadardır (Hayat, 2011).

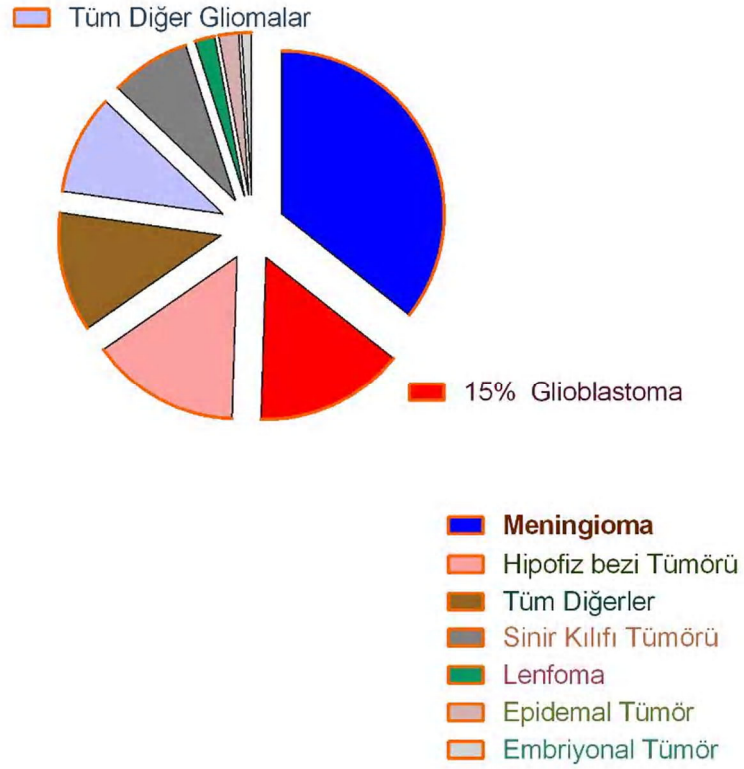
Çocuklarda en sık rastlanan SSS tümörleri, pilositik astrositoma, embriyonal tümörler, malign gliomalar iken yetişkinlerde en sık rastlanan beyin tümörleri ise meningiomalar, pitüiter tümörler, malign gliomalardır (Şekil 1 ve 2) (McNeill, 2016).

Gliomaların yaklaşık yarısını glioblastomalar oluşturur. Amerika merkezi beyin tümörü kayıt kütüğü (CBTRUS) Amerika'daki tahmini glioma ve glioblastoma insidansı 100.000'de 6,61 ve 3,19 olarak tahmin etmektedir (Ostrom et al., 2015).

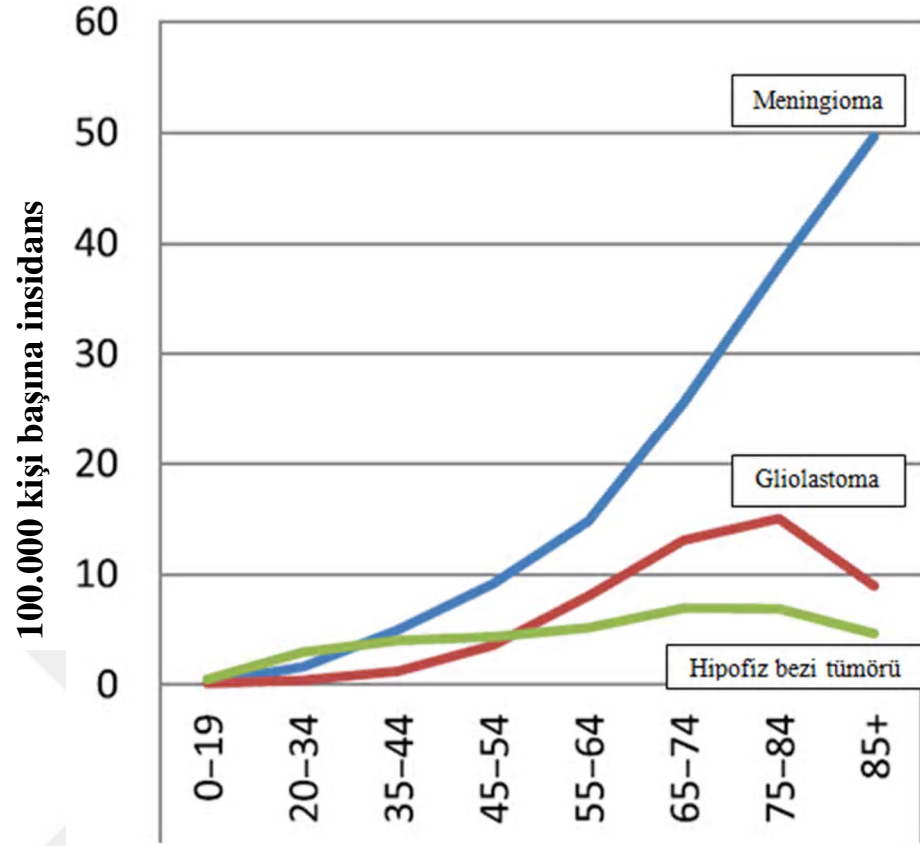
Gliomalar erkeklerde %55 oranı ile daha baskın görülmektedir. Amerika'da gliomalar esmer olmayan ırkta, siyahi ve asyalı ırka göre daha fazla görülmektedir (Ostrom et al., 2015). Evre 1 (pilositik astrositoma) çocuklarda ve genç yetişkinlerde baskın olarak görülürken Evre 2 (oligodendrogial) tümörler 20-30 yaş aralığında pik yapar. 60 lı yaşlara kadar malign glioma insidansı artar (Şekil 3) (McNeill, 2016).



Şekil 1: Çocuklarda histolojik olarak SSS tümörleri



Şekil 2: Yetişkinlerde histolojik olarak tüm SSS tümörleri



Şekil 3: Yaşa göre düzenlenmiş en sık görülen SSS tümörleri insidansı

2.1.2.Beyin Tümörleri Etiyopatogenezi

Beyin tümörlerinden sorumlu ve çalışılmış birçok muhtemel çevresel risk faktörü vardır fakat bunların birkaç tanesi iyi bilinmektedir. Beyin tümörleri ile birçok endüstriyel ve meslek maruziyet ilişkileri halen tam olarak aydınlatılamamıştır. İyonize radyasyon, genetik yatkınlık ve alerjik yönler dahil birçok risk faktörü ile beyin tümörlerinin ilişkisi kurulmuştur (Tablo 1) (Ostrom et al., 2015, Wrensch et al., 2002). En önemli risk faktörü arasında radyasyon bulunmaktadır ve cep telefonu kullanımının beyin tümörü oluşumunu artırdığı gösterilmiştir (Loiseau et al., 2009).

2.1.3.Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması

Geçtiğimiz yüzyılda beyin tümörü sınıflandırması genel olarak histogenez konsepti ile ki; mikroskopik benzerlikler ve hücrenin köken ve farklılaşmasına göre yapılmaktaydı. Bu belirleme de çeşitli boyalarla mikroskop ışığı altında protein ve yapısal karakterin immunohistokimyasal ekspresyonuna bağlıydı. Bu sınıflandırma yöntemleri ışığında 2016'da yayınlanan son WHO beyin tümörü sınıflandırması aşağıdaki şekildedir (Tablo 2) (Louis et al., 2016):

Tablo 1: Beyin kanserleri için epidemiyolojik çalışmalarda araştırılmış çevresel risk faktörleri

Beyin kanseri ile ilişkili epidemiyolojik çalışmalarda araştırılmış çevresel risk faktörleri
Az ilişkili kanıtlar
Kafa travması
Kalsiyumlu besin tüketme
N-Nitrozlu besinler tüketme
Antioksidan besin tüketimi
Annenin N-nitroz içerikli besin tüketmesi
Annenin veya hayatın ilk evrelerinde antioksidan tüketimi
Annenin folat desteği alması
Sigara içilmesi
Elektromanyetik alanlar
Hava kirliliği
Yetersiz kanıt olanlar
Pestisitler
Gübre
Formaldehit
Sentetik kauçuk
Petrokimyalar ve petrol
Vinil klorit

Tablo 2: WHO santral sinir sistemi tümörleri sınıflandırması (2016)

WHO classification of tumours of the central nervous system

Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours		Neuronal and mixed neuronal-glial tumours	
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	9400/3	Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	9413/0
Gemistocytic astrocytoma, IDH-mutant	9411/3	Gangliocytoma	9492/0
<i>Diffuse astrocytoma, IDH-wildtype</i>	9400/3	Ganglioglioma	9505/1
Diffuse astrocytoma, NOS	9400/3	Anaplastic ganglioglioma	9505/3
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	9401/3	Dysplastic cerebellar gangliocytoma (Lhermitte-Duclos disease)	9493/0
<i>Anaplastic astrocytoma, IDH-wildtype</i>	9401/3	Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	9412/1
Anaplastic astrocytoma, NOS	9401/3	Papillary glioneuronal tumour	9509/1
Glioblastoma, IDH-wildtype	9440/3	Rosette-forming glioneuronal tumour	9509/1
Giant cell glioblastoma	9441/3	<i>Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumour</i>	
Gliosarcoma	9442/3	Central neurocytoma	9506/1
<i>Epithelioid glioblastoma</i>	9440/3	Extraventricular neurocytoma	9506/1
Glioblastoma, IDH-mutant	9445/3*	Cerebellar liponeurocytoma	9506/1
Glioblastoma, NOS	9440/3	Paraganglioma	8693/1
Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	9385/3*	Tumours of the pineal region	
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9450/3	Pineocytoma	9361/1
Oligodendroglioma, NOS	9450/3	Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	9362/3
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9451/3	Pineoblastoma	9362/3
<i>Anaplastic oligodendroglioma, NOS</i>	9451/3	Papillary tumour of the pineal region	9395/3
<i>Oligoastrocytoma, NOS</i>	9382/3	Embryonal tumours	
<i>Anaplastic oligoastrocytoma, NOS</i>	9382/3	Medulloblastomas, genetically defined	
Other astrocytic tumours		Medulloblastoma, WNT-activated	9475/3*
Pilocytic astrocytoma	9421/1	Medulloblastoma, SHH-activated and TP53-mutant	9476/3*
Piloxyoid astrocytoma	9425/3	Medulloblastoma, SHH-activated and TP53-wildtype	9471/3
Subependymal giant cell astrocytoma	9384/1	Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH	9477/3*
Pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3	<i>Medulloblastoma, group 3</i>	
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3	<i>Medulloblastoma, group 4</i>	
Ependymal tumours		Medulloblastomas, histologically defined	
Subependymoma	9383/1	Medulloblastoma, classic	9470/3
Myxopapillary ependymoma	9394/1	Medulloblastoma, desmoplastic/nodular	9471/3
Ependymoma	9391/3	Medulloblastoma with extensive nodularity	9471/3
Papillary ependymoma	9393/3	Medulloblastoma, large cell / anaplastic	9474/3
Clear cell ependymoma	9391/3	Medulloblastoma, NOS	9470/3
Tanycytic ependymoma	9391/3	Embryonal tumour with multilayered rosettes, C19MC-altered	9478/3*
Ependymoma, <i>RELA</i> fusion-positive	9396/3*	<i>Embryonal tumour with multilayered rosettes, NOS</i>	9478/3
Anaplastic ependymoma	9392/3	Medulloepithelioma	9501/3
Other gliomas		CNS neuroblastoma	9500/3
Chordoid glioma of the third ventricle	9444/1	CNS ganglioneuroblastoma	9490/3
Angiocentric glioma	9431/1	CNS embryonal tumour, NOS	9473/3
Astroblastoma	9430/3	Atypical teratoid/rhabdoid tumour	9508/3
Choroid plexus tumours		<i>CNS embryonal tumour with rhabdoid features</i>	9508/3
Choroid plexus papilloma	9390/0	Tumours of the cranial and paraspinal nerves	
Atypical choroid plexus papilloma	9390/1	Schwannoma	9560/0
Choroid plexus carcinoma	9390/3	Cellular schwannoma	9560/0
		Plexiform schwannoma	9560/0

(Louis et al., 2016)

WHO grades of select CNS tumours		
Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours		
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	II	
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	III	
Glioblastoma, IDH-wildtype	IV	
Glioblastoma, IDH-mutant	IV	
Diffuse midline glioma, H3K27M-mutant	IV	
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	II	
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	III	
Other astrocytic tumours		
Pilocytic astrocytoma	I	
Subependymal giant cell astrocytoma	I	
Pleomorphic xanthoastrocytoma	II	
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	III	
Ependymal tumours		
Subependymoma	I	
Myxopapillary ependymoma	I	
Ependymoma	II	
Ependymoma, <i>RELA</i> fusion-positive	II or III	
Anaplastic ependymoma	III	
Other gliomas		
Angiocentric glioma	I	
Chordoid glioma of third ventricle	II	
Choroid plexus tumours		
Choroid plexus papilloma	I	
Atypical choroid plexus papilloma	II	
Choroid plexus carcinoma	III	
Neuronal and mixed neuronal-glial tumours		
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	I	
Gangliocytoma	I	
Ganglioglioma	I	
Anaplastic ganglioglioma	III	
Dysplastic gangliocytoma of cerebellum (Lhermitte-Duclos)	I	
Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	I	
Papillary glioneuronal tumour	I	
Rosette-forming glioneuronal tumour	I	
Central neurocytoma	II	
Extraventricular neurocytoma	II	
Cerebellar liponeurocytoma	II	
Tumours of the pineal region		
Pineocytoma	I	
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	II or III	
Pineoblastoma	IV	
Papillary tumour of the pineal region	II or III	
Embryonal tumours		
Medulloblastoma (all subtypes)	IV	
Embryonal tumour with multilayered rosettes, C19MC-altered	IV	
Medulloepithelioma	IV	
CNS embryonal tumour, NOS	IV	
Atypical teratoid/rhabdoid tumour	IV	
CNS embryonal tumour with rhabdoid features	IV	
Tumours of the cranial and paraspinal nerves		
Schwannoma	I	
Neurofibroma	I	
Perineurioma	I	
Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)	II, III or IV	
Meningiomas		
Meningioma	I	
Atypical meningioma	II	
Anaplastic (malignant) meningioma	III	
Mesenchymal, non-meningothelial tumours		
Solitary fibrous tumour / haemangiopericytoma	I, II or III	
Haemangioblastoma	I	
Tumours of the sellar region		
Craniopharyngioma	I	
Granular cell tumour	I	
Pituitaryoma	I	
Spindle cell oncocytoma	I	

(Louis et al., 2016)

2.2.GLİOBLASTOMA MULTİFORME

Glioma genel olarak beyin tümörleri için kullanılmakta; GBM ise en sık rastlanan ve en agresif beyin tümörüdür (Holland, 2000, Ohgaki et al., 2004). Yetişkinlerdeki beyin tümörlerinin %60'ı GBM'dir (Rock et al., 2012). Ayrıca santral sinir sisteminde oluşan beyin tümörlerinin %80'inden sorumlu olduğu söylenebilir (Schwartzbaum et al., 2006, Agnihotri et al., 2013). Modern tedavilere rağmen GBM halen çok ölümcül ve hızlı ilerleyen bir hastalıktır. Hastalar tanı konulduktan sonra yaklaşık 15 ay kadar hayatta kalabilmektedirler (Ohka et al., 2012, Thakkar et al., 2014). Hastaların %50'si tanı konulduktan sonraki ilk yılı doldurmadan, %90'ı da üç yıl içinde ölmektedir (Ostrom et al., 2015).

Erken tanı konulabilmesi semptomların spesifik olmaması nedeniyle zordur (Goodenberger and Jenkins, 2012). Tedaviye en iyi yanıt veren hastalarda bile 2 yıl içinde ölüm görülmektedir. Çok az bir hasta grubu ise 3 yıldan daha uzun yaşamaktadır (Krex et al., 2007).

Hayat sürelerini uzatmak için çalışmalar halen devam etmektedir. Klinik ve deneysel yöntemlerin yanında yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır. Günümüz tedavisinde hastaların %95'inde tümörün çıkarılması ve akabinde radyoterapi ve TMZ ile kemoterapi uygulanmaktadır. Güncel çalışmalar genetik üzerine yoğunlaşmış ve uzun yaşayan kişilerdeki genetik farklılıklar araştırılmaya devam etmektedir (Kanu et al., 2009).

Dünya'da insidansı 100.000'de 10'un altındadır. Her yaşta görülebilir ancak 55-60 yaş aralığında görülme olasılığı en üst seviyededir. Kansere nedenli ölümlerin %2,5'i GBM nedenlidir ve 15-34 yaş arasındaki ölüm nedeni sıralamasında ise üçüncü sıradadır. GBM görülme sıklığı erkeklerde daha yüksektir (Ohgaki et al., 2004).

Batı toplumlarında daha az gelişmiş ülkelere göre daha fazla GBM görülmektedir. Bunun sebebi de bildirimlerin ve tanının batıda daha fazla olması olabilir (Thakkar et al., 2014, Ohgaki et al., 2004). Az sayıda yapılmış çalışmalar siyah ırkta beyazlara göre (Asyalı, latin ve beyazlar dahil) daha az yatkın olduğunu göstermiştir (Iacob and Dinca, 2009).

Tedavisi mümkün olmayan beyin kanserleri hakkında çok az bilgi vardır. Altta yatan karsinogenetik nedenler tanımlanamamıştır. Şu zamana kadar yüksek doz iyonize radyasyon tanımlanmış risk faktörüdür (Inskip et al., 2001, Bondy et al., 2008, Ohgaki et al., 2004). 1960'tan beri bildirilmiş 116 vaka ile yüksek doz radyasyonun radyoterapi

ile görülme riskini %2,5 artırdığı görülmüştür. Ayrıca uzun süre düşük doz radyasyon da çocuklarda göreceli olarak deride hemanjioma riskini artırmaktadır (Salvati et al., 2003, Wensch et al., 2002). Japonya'ya atılan atom bombası sonrasında Nagasaki ve Hiroshima'da gliomalar dahil beyin kanserinin görülme insidansının arttığı görülmüştür (Prasad and Haas-Kogan, 2009).

Pestisitlerin ve bazı bakır sülfür ile birleştirilmiş ilaçlar gibi çevresel faktörler hayvan çalışmalarında kanseri indüklediği bulunsada kontrollü çalışmalarda bu doğrulanmamıştır (Wensch et al., 2002). Bazı çalışmalarda over steroid hormonlarının GBM'i indüklediği göstermiştir (Kabat et al., 2010).

Enfeksiyonlar ve alerjik durumlar bağışıklık sistemi aktive ederek GBM oluşumuna neden olmuş olabilir (Fisher et al., 2007, Bondy et al., 2008). 2007'de sunulan bir meta-analizde alerjiden korunan grupta GBM gelişim riski %40'a kadar daha az olarak bulunmuştur (Lin et al., 2007).

Gliomaların aileden genetik olarak aktarılabileceği düşünülse de sorumlu genler tam olarak bulunamamıştır. Bazı genetik hastalıklar ile artmış GBM insidansı hastaların %5-10'unda gösterilebilmiştir (Bondy et al., 2008, Fisher et al., 2007).

GBM'in en fazla görüldüğü anatomik bölge serebral hemisferdir ki bunların %95'i supratentoryal bölgeden çıkar. Çok az bir kısmı serebellum, beyin kökü ve spinal kordda oluşur (Nakada et al., 2011).

Çağdaş ileri genomik gelişmeler GBM'yi tetikleyen anahtar moleküler değişimleri ortaya çıkarmaktadır. WHO malign gliomalar ile ilgili histolojik ve immunohistokimyasal benzerliklerin temellerini ortaya koymuştur. Bu özelliklerine göre (nekroz, mitotik özellikler, vasküler hiperplazi gibi) sınıflandırmalar da yapılmıştır (Louis et al., 2007, Cloughesy et al., 2014). Primer ve sekonder GBM özellikleri bakımından değişiklik gösterir. Primer GBM öncül hasar olmadan oluşur. Sekonder GBM ortaya çıkmasından düşük evreye kadar yavaş ilerleme gösterir (Agnihotri et al., 2013).

Şimdiki ve devam eden çalışmalarda primer GBM'de epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) gen mutasyonu ve çoğalması, fare double minute 2 (MDM2), p16 delesyonu ve 10q kromozomu fosfat tutucu ve tensin homologu (PTEN) heterozigotluğu kaybetme (LOH) ile korele değişiklikler mevcut. Sekonder GBM ile trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), trombosit kaynaklı büyüme faktör reseptörü alfa (PDGFR), retinoblastoma, 19q heterozigotluğu kaybetme IDH1/2, TP53

ve ATRX gen mutasyonları ilişkili bulunmuştur (Ohgaki et al., 2004, Agnihotri et al., 2013, Cloughesy et al., 2014).

Analizler GBM'nin yaklaşık %88'inde tirozin kinaz/sıçan sarkoma virüs protein/fosfo inositol 3-kinaz (tirozin kinaz/RAS/PI3K), %87'sinde P53 yolağı, %78'inde retinoblastoma proteini (RB) sinyal yolağı üç ana sinyal yolağı üzerinden artmış genetik aşınma ve lezyon gerçekleştiğini göstermiştir. Pediatrik GBM alanında yapılan güncel araştırmada primer ve sekonderden farklı olarak histon H3F3 gen mutasyonu olan ayrı bir kategori de olabilir (Aldape et al., 2015).

Global gen ekspresyon çalışmaları, ekspresyon bazlı moleküler GBM sınıflandırması temelli klasik, mezenkimal, pronöral ve nöral alt tipleri hakkında bilgi sunmaktadırlar (McLendon et al., 2008, Agnihotri et al., 2013).

Karakteristik tanı ve sıkça rastlanan moleküler değişimleri açıklamak ve yeni tümör sınıflandırması konseptini sunmak için çalışmalar yapılmaktadır. Böyle çalışmalar ölümcül maligniteler için terapötik stratejileri geliştirmek ve hastalığın yönetilmesinde yeni paradigmlar oluşturmak için vizyonlar sunmaktadır (Hanif et al., 2017).

Ayrıca son yıllarda genomik ve proteomik çalışmalar da glioblastoma gelişimini ve bunun altında yatan mekanizmayı ortaya çıkarmak için yapılmaktadır (Long et al., 2017).

2.2.1.GBM Tedavisi ve Kemoterapi

Son 20-30 yıl içinde GBM tedavisi hala medikal onkoloji için zorlayıcıdır ve düşük başarı oranlarıyla gerçekleştirilmeye devam edilmektedir (Mrugala, 2013).

GBM tedavisinde ana zorluklar hastalığın anatomik ve morfolojik lokasyonu, kompleksliği ve heterojenliği ile ilişkilidir. Cerrahi yaklaşımdaki uzmanlık, radyoterapi ve destekleyici kemoterapi hayatta kalım ve hayat kalitesinde iyileşme sağlar. Fakat kötüleşme hala baskın olan durumdur. Olumlu sonuçlar elde edilmesi için, gerekli ve önemli adımlar atılmış olmasına rağmen diğer kanser türlerinde daha başarılı tedavi yapılabilmektedir (Mrugala, 2013, Ohka et al., 2012, Kesari, 2011).

İleri evre gliomalı hastalar için standart tedavi, hastalara kapsamlı efektif bir tedavi desteği sunar. Etkin bir tedavi serebral ödem, gastrointestinal sistem rahatsızlığı, osteoporoz, venöz tromboemboli, kognitif bozulma tedavilerini de kapsar (Norden and Wen, 2006).

Spesifik tedavi yönetimi tümörün cerrahi rezeksiyonu ile başlar, sonrasında radyasyon ve birlikte TMZ kullanımı ile tedavi devam eder (Mrugala, 2013).

TMZ, karmustin, lomustin gibi alkilleyici ajanlar özellikle GBM'de avantaj sağlamışlardır. Karmustin ve lomustin çok sitotoksik ajanlardır ve bunlarla yapılan tedavilerde çok erken direnç gelişmektedir. Sadece TMZ, GBM hastalarında standart kemoterapi ajanıdır (Friedman et al., 2000, Reardon and Wen, 2006). TMZ'nin tedavi mekanizması DNA'da N7 ve O6 pozisyonundaki guanini metilleyerek DNA hasarı oluşturması ve hücre siklusunu G2-M evresinde durdurarak apoptozu tetiklemesidir (Scott et al., 2011).

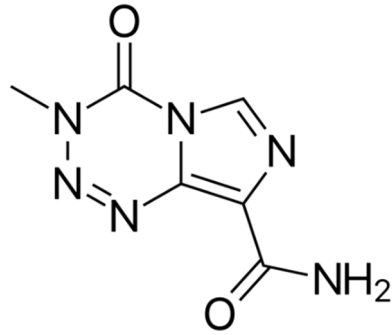
2.2.2. Temozolomid'in Klinik Kullanımındaki Önemi

TMZ imidazotetrazin türevi alkilleyici ajan dekarbazinin ön-ilacıdır. Kimyasal adlandırması 3-metil-4-oksoimidazo(5,1-d)(1,2,3,5)tetrazin-8-karboksamid'dir (Şekil 4).

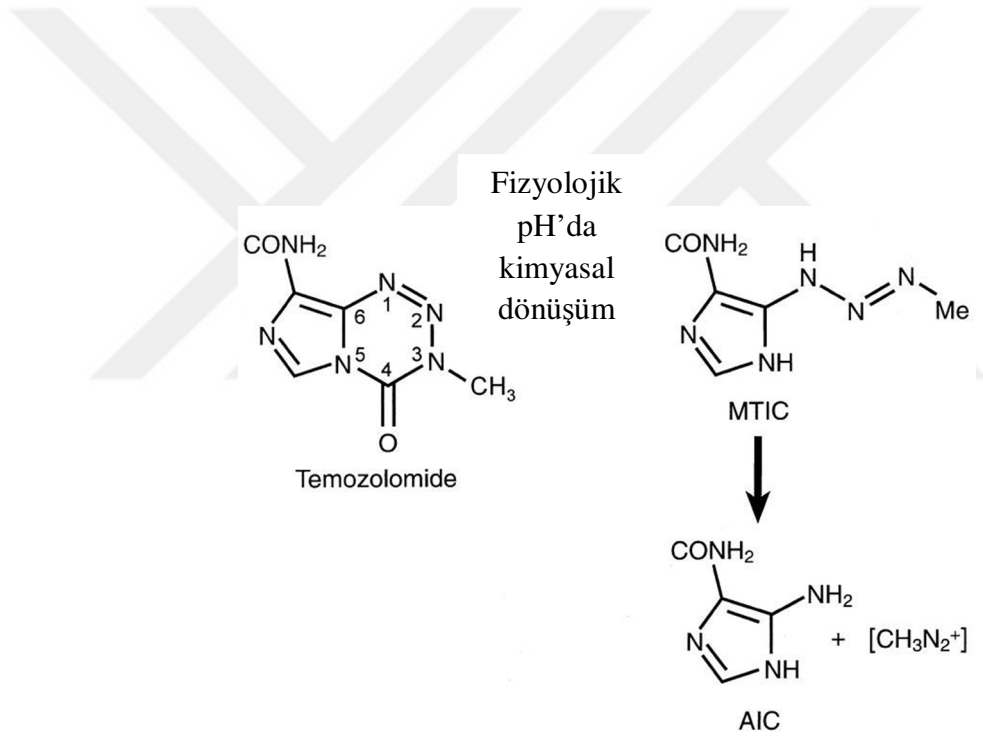
TMZ pH 5'in altında stabildir ancak pH 7'nin üzerinde hızlıca hidrolize olur. Fizyolojik pH'da kısa ömürlü aktif formu olan hidrolize 5-aminoimidazol-4-karboksamide dönüşür (Şekil 5). TMZ lipofilik yapısından dolayı kan-beyin bariyerini geçer ve oral olarak kullanılır (Moody and Wheelhouse, 2014, Reid et al., 1997). TMZ hücre siklusunu G2/M evresinde durduran ve apoptoza öncülük eden DNA alkilleyici bir ajandır. TMZ sitotoksitesini yapısındaki metil gruplarının guaninin N7 ve O6 bölgelerine ve DNA adeninin N3 bölgesine eklenmesi ile gösterir. Guanindeki O6 bölgesinin alkilenmesi ile DNA replikasyonu sırasında metilguaninin karşısına sitozin yerine timin eklenir ve bu da hücre ölümüne neden olur (Alonso et al., 2007).

TMZ malign melanoma ve astrositoma gibi kanser tiplerine karşı kullanılır ve Amerika Gıda ve İlaç Kurumu'nda 1999 yılında anaplastik astrositoma için onay almıştır. Yetişkin GBM kullanımı için 2005'te onay almıştır.

Antitümör etkinliği çoklu uygulamada tek doz uygulamaya göre daha fazladır. Faz 1 çalışması ile önerilen oral kullanım doz ve şeması $750-1000 \text{ mg/m}^2$ 4 hafta boyunca haftada 5 gün üst üste kullanılmasıdır. 5-250 mg'lık kapsülleri ve 100 mg intravenöz preparatı da mevcuttur (Middleton et al., 2000, Quirbt et al., 2007, Yung et al., 1999, Hart et al., 2008, Newlands et al., 1992).



Şekil 4: Temozolomidin kimyasal yapısı



Şekil 5: Fizyolojik pH'da temozolomidin dönüşümü (F. G. Stevens et al., 1987)

AIC: 5-aminoimidazol-4-karboksamid, MTIC: 5-(3-metiltriazen-1-y)imidazol-4-karboksamid

Yeni GBM tanısı alan yetişkinlerde radyasyon tedavisi ile TMZ'nin birlikte kullanımı, sadece radyasyon tedavisi alanlara göre hayatta kalımı iyileştirmiştir. Yeni tanı almış GBM hastaları 6 hafta boyunca 6 siklus radyoterapi ile birlikte $75 \text{ mg/m}^2/\text{gün}$ TMZ alır. Takiben günlük 150 mg/m^2 5 gün boyunca alır ve sonraki sıklusa kadar 23 gün tedaviye ara verilir. IV olarak verilen TMZ 90 dakikanın üzerinde yavaş infüzyon ile verilir (Cohen et al., 2005).

2.2.3. Temozolomid'in Sitotoksik Etkisine Direnç

TMZ alkilleyici bir ajan olarak DNA adenin ve guanin rezervinin yaklaşık %90'ını N3-metiladenin ve N7-metilguanine metillerken, %5-10'unu da O6-metilguanine metiller. Metillenmiş DNA temel kesip çıkarma ile ya da DNA eşlenmeyen (MMR) tamir yolları ile düzeltilir. MGMT enzimi guaninin O6 pozisyonunda revers metilasyon yaparken MGMT aktivitesi ile TMZ cevabı arasında korelasyon bulunmamıştır. Çalışmada DNA hasarına fonksiyonel olmayan p53 cevabı, MGMT aktivitesinden daha fazla TMZ direnciyle ilişkili bulunmuştur (Bocangel et al., 2002). Kanseri hücrelerinin TMZ'e direncinde sadece p53 mutasyonu rol almaz. TMZ dirençli hücrelerde duyarlı hücrelere nazaran daha fazla MGMT ekspresyonu olduğu da gösterilmiştir. İyi bilinen TMZ duyarlı GBM hücreleri A172, U87, U251 ve U373 hücre hatlarıdır. Rezistan hücreler ise LN-18, T98G ve U138 hücre hatlarıdır (Alonso et al., 2007, Natsume et al., 2005, Liu et al., 2006, Hermisson et al., 2006, van Nifterik et al., 2010, Goellner et al., 2011).

MGMT ekspresyonu, T98G gibi metillenmiş hücrelerde MGMT protein ekspresyonu ve TMZ direnci göstermesine rağmen MGMT metilasyon kolaylaştırıcı durumu ile ters orantılıdır (Uno et al., 2011). GBM hücrelerinin TMZ verdikleri cevap için en önemli iki parametre 1) MGMT protein ekspresyonu 2) MGMT metilasyon kolaylaştırıcı durumu. T98G'nin TMZ direncine sadece MGMT proteini değil alkilpurin-DNA-N-glikozilaz (APNG) proteini de neden olur (van Nifterik et al., 2010, Uno et al., 2011, Agnihotri et al., 2013, Agnihotri et al., 2012).

Bazı dirençli GBM hücreleri MGMT eksprese etmez. Örneğin CCF-STTG1 MGMT proteinini eksprese etmez ayrıca TMZ rezistandır. MGMT ekspresyonu yerine TMZ dirençli hücrelere göre daha fazla p16INK4A proteini eksprese eder (Lee et al., 2011). Yani TMZ'ye karşı direnç sadece MGMT enzimi üzerinden gerçekleşmemektedir.

MGMT ile ilgili insanda çok fazla çalışma yapılmış ve bu çalışmalara göre MGMT metilasyon kolaylaştırıcı ile TMZ ile tedavi edilen GBM hastalarının sağ kalımı

arasında korelasyon bulunmuştur. Çalışmalar tüm GBM hastalarının metillemeyi kolaylaştırıcı MGMT'ye alkileyici ajanlarla cevap vermediklerini göstermiş ve sonuç olarak başka moleküllerin de TMZ'e dirençte etkili oldukları gösterilmiştir (Stupp et al., 2005, Hegi et al., 2008). MGMT ve APNG'ye ek olarak TMZ direncine yardım eden başka proteinler de bulunmaktadır. Örneğin TMZ'ye direnç artmış göğüs kanseri proteini-1, çıkararak ana düzeltme, nikotinamid fosforibozil transferaz, NAD+, CD133 ekspresyonu ve apoptoz inhibisyonu ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca U87 ve T98G'nin TMZ (200µg) ile 72 saatlik tedavisinde artmış miR-9 ve epidermal büyüme faktörü ile indüklenmiş konnenksin43'de artış gözlenmiştir. Tüm bu veriler TMZ direncinin GBM hücrelerinin kompleks cevabı sonucunda olduğunu göstermektedir (Liu et al., 2006, Goellner et al., 2011, Munoz et al., 2013, Munoz et al., 2014).

2.3.GBM VE DİRENÇ MEKANİZMALARI ARASINDAKİ İLİŞKİ

GBM'de kemoterapötik ilaçların etkili olmasını kısıtlayan en önemli faktörler; ilaçların etki göstermesi beklenen hedef dokudaki etkin konsantrasyonunun azalması ile tümör hücrelerinin ilaca duyarlılığının azalması ve strese bağlı seçim sonucunda gelişen doğal veya kazanılmış ilaç direncidir. Doğal direnç ilk kez alınan bir kemoterapötik ajana karşı tümörün çok az cevap vermesi ya da hiç cevap vermemesi; kazanılmış ilaç direnci ise, başta ilaca cevap veren tümörlerin belli bir süre sonra aynı ilaca cevap vermez hale gelmesidir (Bozkurt, 2013).

GBM'deki ilaca karşı direnç diğer tümörlerin genel davranışları ile benzerdir. Genel olarak tümör hücrelerinin ilaca olan cevabını etkileyen ve hedef dokudaki konsantrasyonu azaltan olmak üzere temel olarak üç başlık altında değerlendirilebilir.

A) Tümör hücrelerinin ilaca hassasiyetini azaltan mekanizmalar

1. a. Beyni periferel dolaşımdan ayıran ve MSS'deki doğal savunma mekanizması olan kan beyin bariyeri (KBB),
b. Membran transport proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonundaki artışa bağlı olarak hücre içine ilaç girişinin azalması,
2. Artan ilaca bağlı olarak DNA tamir sistemlerindeki adaptif cevap,
3. İlacın hedef molekülünde mutasyonlara veya posttranslasyonel modifikasyonlara bağlı olarak, hedef molekülün ilaca bağlanma etkinliğinin azaltılması,

B) İlaçların hedef dokudaki etkin konsantrasyonunu azaltan mekanizmalar

1. Detoksifikasyonda rol alan proteinlerdeki değişimler,
2. Tümör mikro çevresinde meydana gelen hipoksik bölgeler.

C) Glioblastomada kemoterapötiklere karşı dirence zemin hazırlayan diğer olası mekanizmalar ve ilişkili moleküller

1. Onkogenlerin aktivasyonu,
2. Bcl-2 ailesi proteinlerinin ekspresyonundaki bozukluklar
3. Kök hücrenin olası rolü,

(Bozkurt, 2013).

GBM hücrelerinin ilaca olan hassasiyetini azaltan mekanizmalardan KBB ilaç direncinin temel mekanizmalarındandır. Kılcal damarların kontrolünde ilaçların hücre içine girişleri mümkündür. Birinci olarak endotelial hücrelerarası moleküllerle oluşan bariyer ve geçirgenlik; ikicisi ise endotel hücre membranında bulunan taşıyıcı proteinler ve enzimatik pompaların aktivite derecesi bu moleküllerin geçişini kontrol eder (Chen and Liu, 2012). Bu mekanizmalar KBB'den ilaçların geçişini etkilemektedirler. Zira tümörlü dokularda ilaçların KBB'yi geçmesi ve etkin konsantrasyona ulaşması bozulmuş durumdadır. Yapılan araştırmada paklitaksel ile yapılan tedavide GBM hücresinde normal beyin hücresine göre on kat daha düşük ilaç konsantrasyonuna rastlanılmıştır (Sevc et al., 2011).

KBB'de bulunan kılcal damarların aktif transport ile hücre içine ilaç taşınması taşıyıcı proteinlerin aktivasyon düzeyleri ile ilişkilidir. Çoklu ilaç direncinde ortaya çıkan proteinler ATP-bağımlı kaset (ABC) taşıyıcı protein sınıfıdır. Bunlar P-glikoprotein, çoklu ilaç direnciyle ilişkili protein (MDR) ve meme kanseri direnç proteini (BCR)'dir. İlaç direncine neden olan diğer bir protein ise akciğer direnç proteini (LRP/MVP)'dir (Nagane et al., 1999, Haar et al., 2012, Potschka, 2010).

DNA tamir mekanizmalarında adaptif cevap gelişebilir. GBM tedavisinde alkilleyici ajanlar kullanılır. Normal şartlarda hücre tamir mekanizmaları ile bu ajanlar uzaklaştırılır. Bu enzimlerin aşırı üretilmesi alkilleyici ajanlara (sisplatin, TMZ gibi) karşı direkte önemli rol oynarlar. Bu enzimler arasında MGMT, yanlış eşleşme tamir mekanizması (MMR) ve kesip-çıkarma çapraz grup tamamlama tamir mekanizması

(Excision Repair Cross-Complementation Group 2 - ERCC2) genleri rol oynamaktadır (Hayat, 2011, Fink et al., 1998, Ramirez et al., 2013).

Bazı ilaçlar hücre içi moleküllerin çoğalması için kritik olan enzimleri (topoizomera, dihidroredüktaz gibi) etkilerler. Bu enzimlerde oluşabilecek mutasyonlar bu enzimlerle ilaçların bağlanmasını önleyebilir ve bu sayede direnç kazanabilirler (Bozkurt, 2013).

Ayrıca ilacı vücuttan uzaklaştırıcı mekanizmaların rolü olduğu gösterilmiştir. Glutasyon s-transferaz gibi ilacın metabolizmasında rol oynayan enzimlerin kodlanmasında meydana gelen değişiklikler ve mutasyonlar ile ilacın vücuttan uzaklaştırılması etkilenebilir. GBM'de ilaca karşı gelişen dirençlerde bu mekanizma da rol oynamaktadır (Bredel and Zentner, 2002).

Bazı genlerin glioblastoma hücrelerinde daha fazla eksprese edildiği görülmüştür. Örneğin EGF ve PDGF ve PDGFR fazla eksprese olmaktadır. Bu genlerin aktivasyonu sonrasında direnç kazanması ve apoptozun engellenmesine yol açmaktadır (Ronellenfitsch et al., 2010, Lo, 2010).

Morfolojik olarak tanımlanmış farklı glioblastoma tümörleri farklı klinik seyir izler. Bu farklılıkları moleküler mekanizmaların farklılığı ile açıklamak mümkündür (Olar and Aldape, 2014).

2.3.1. Glioblastomada İlaç Direnç Genleri

Son yıllarda yapılan çalışmalar glioblastoma hücrelerinde direnç gelişmesi üzerinde etkili olduğu düşünülen LRP (Lung Resistance-Related Protein), MGMT, ERCC2, EGFR, Bcl2 (B-Cell CLL/Lymphoma 2) ve Bax (BCL2-Associated X Protein) gibi bazı aday belirteç moleküller üzerinde yoğunlaşmaktadır.

LRP glial hücrelerde sentez edilmeyen ancak glioblastomalarda ve astrositik beyin tümörlerinde aşırı sentez edilen bir proteindir (Aronica et al., 2003, Berger et al., 2001).

LRP'nin varlığı ilk defa, ABCB1 negatif, çoklu ilaç direncine sahip akciğer dokusu kanser hücrelerinin nükleus zarında gösterilmiştir. DNA'yı hedef alan kemoterapötiklere karşı hücreyi koruyan LRP, P-glikoprotein mekanizmasına benzer şekilde ilaçların hücre içi birikimini azaltır (Lu and Shervington, 2008, Sasaki et al., 2002).

MGMT, guanine bağlı promutajenik alkil gruplarını kendi sistein akseptör bölgesine transfer ederek guaninde oluşabilecek mutasyonları engelleyen bir DNA tamir

enzimidir. MGMT enzim aktivitesinde artış olduğunda ilaç direnci geliştiği gözlenmiştir (Silber et al., 2012). MGMT bulunmayan hücrelerde O6-metilguanin (O6 MeG) tamiri mümkün olmayacağından, bu hücreler alkilleyici ajanların mutajenik ve sitotoksik etkilerine daha duyarlıdırlar. O6 MeG, MGMT tarafından tamir edilmez ise kromozomal anomaliler ve nokta mutasyonları gibi durumlar gözlenebilir. Glioblastomalarda O6 MeG, Fas ve p53 bağımlı yollar üzerinden apoptozu indüklemektedir. Friedman ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, glial tümör hücrelerinin TMZ duyarlılık düzeyi ile MGMT geni arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir. MGMT geni bulunmayan hücrelere transfeksiyon ile bu enzim eklenmiş ve bu yolla TMZ direncinin arttığı görülmüştür (Friedman et al., 1998). Birçok klinik çalışmada glioblastomada MGMT'nin metilasyonu, MGMT gen ekspresyonunun düşük olması ya da hiç olmaması, glioblastomanın nitrozo-ürelere (kloroetilnitrozo-üre, BCNU, lomustin ve fotemustin) ve TMZ'ye karşı daha iyi klinik cevap alınması ile ilişkilendirilmiştir (Hegi et al., 2005, Paz et al., 2004, Weller et al., 2009).

Adapte TMZ direnci hem oluşturmuş GBM hücreleri hem de insan beyin primer tümörleri için TMZ ile 72 saatten 6 aya kadar farklı zamanlarda oluşabilir. Çalışmalarda duyarlı olduğu bilinen hücrelerin (A1972, SNB-19, U87, U251 gibi) yanında dirençli olduğu bilinen hücreler (LN-18, T98G) de kullanılmaktadır (Ujifuku et al., 2010, Huppold et al., 2012, Kohsaka et al., 2012, St-Coeur et al., 2015). TMZ dirençli GBM hücreleri altı aya kadar 1-1000µg TMZ ile tedavi edildikten sonra TMZ maksimum tedavi dozuna cevap verip vermemelerine göre tanımlanır. Adapte dirençli hücreler konak hücreye göre TMZ'e 2-98 kez daha fazla dirençlidir. SNB-19 hücresinin Auger ve arkadaşlarının çalışmasında TMZ için LC₅₀ değeri 55-101 µg iken Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 280 µg bulunmuştur (Auger et al., 2006, Zhang et al., 2010).

Transkripsiyon faktör IIH'nin, on alt ünitesinden biri olan ERCC2 olarak da bilinen XPD (Xeroderma pigmentosum grup D) proteini, RNA polimeraz II tarafından transkripsiyonun başlaması için gerekli olan bir proteindir. İnsan glioblastoma hücre soylarında yapılan çeşitli çalışmalarla ERCC2'nin kloroetilnitrozo-üre gibi alkilleyici ajanlara gelişen dirençte rol aldığı gösterilmiştir (Chen et al., 1997, Chen et al., 1998). 2011 yılında temozolomid uygulanan 58 malign glioblastoma hastasıyla yapılan bir

çalışmada, temozolomide duyarlı hastalarda MGMT ve ERCC2 transkript düzeylerinin, dirençli hastalarla karşılaştırıldığında daha az olduğu tespit edilmiştir (Hou et al., 2011).

Glioblastoma tümörlerinin dikkat çeken karakteristik özelliği, Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) reseptörlerinin aşırı ekspresyonudur. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR), Tirozin Kinaz (TK) reseptörlerinin erbB ailesine ait bir transmembran proteindir. Ligandının EGFR'ye bağlanması sonucu, RTK'nin (Reseptör Tirozin Kinaz) otofosforilasyonu gerçekleşir. Fosforile olmuş RTK, hücrenin yaşamını sürdürmesinde, proliferasyonunda ve farklılaşmasında rol alan sinyal yollarını aktive eder (Friedman et al., 1998). Örneğin; glioblastomalarda fosforile RTK, glikolitik aktiviteyi arttırıcı genleri (glikoz taşıyıcı 1 (GLUT1)) ve onkogenleri aktive ederken, tümör baskılayıcı genlerin inhibisyonuna yol açar (Ronellenfitsch et al., 2010).

GBM'de, EGFR ve/veya onun aktive olmuş varyantı EGFRvIII'ün aşırı ekspresyonunun, glial tümörlerin daha invazif ve tedaviye daha dirençli olmasına yol açtığı gösterilmiştir (Lo, 2010).

Kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen çoklu ilaç direncinde apoptotik hücre ölümünü engelleyici faktörlerin de etkili rol oynadığı tespit edilmiştir (Potschka, 2010). Apoptozun düzenlenmesinde anti-apoptotik BCL-2 protein ailesi üyeleri Bcl-2 ve Bcl-XL ile birlikte Bax ve Bad gibi pro-apoptotik üyeler de rol alır. BCL-2 protein ailesi üyelerinin ekspresyonundaki artış ya da azalışların hem radyoterapiye hem de kemoterapiye karşı gelişen dirençte etkili olduğuna dair çeşitli çalışmalar vardır (George et al., 2009a, George et al., 2009b, Streffer et al., 2002, Weller et al., 1995). Malign glioblastoma hücrelerindeki Bcl-2 protein düzeylerinin, sitotoksik Fas antikörlerine karşı direnç gelişiminde belirleyici bir etken olduğu tespit edilmiştir (Weller et al., 1995). Düşük dozlarda taksole maruz bırakılan insan glioblastoma hücrelerinde, siRNA kullanılarak Bcl-2 geni susturulduğunda apoptozun %70 oranında arttırdığı belirlenmiştir (George et al., 2009a). Bcl-2 geni susturulmuş glioblastoma tümörlü farelerde, taksol tedavisinin tümör büyümesini ve anjiyogenezi büyük ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir (George et al., 2009b).

2.3.2.GBM ve Kemoterapötik İlaç Dirençliliğinde Doğal Ürünlerin Önemi

Son yıllarda yapılan araştırmalar bazı meyve ve sebzelerin düzenli olarak tüketiminin belirli kanserlere yakalanma riskini azaltabileceğini göstermiştir. Fitokimyasallar bazı meyve ve sebzelerin içeriğinde bulunan doğal bileşiklerdir ve bu bileşiklerin kanser oluşumunun önlenmesinde kullanılmasının yanısıra kanser tedavisinde de kullanılabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Bu bileşiklerden kersetin, genistein, resveratrol, dialil sülfid, S-alil sistein, allisin, likopen, kapsaisin, kurkumin, 6-gingerol, ellagic asit, ürsolik asit, krisin, silymarin, anetol, katekinler ve öjenol gibi etken maddeler kemopreventif ajanlar olarak adlandırılmaktadır (Dorai and Aggarwal, 2004, Kasala et al., 2015). Çünkü bu ajanlar kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılar, apoptozu indükler, nükleer faktör kappa'yı (NF-kB), AP-1 ve JAK-STAT aktivasyon yolağını ve anjiyogenezi inhibe eder, antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu baskılar, siklooksijenaz-2'yi inhibe eder (Dorai and Aggarwal, 2004, Wang et al., 2014). Bu kemopreventif ajanlar ayrıca kanser tedavisi gören hastalarda çok yakın zamanda kemoterapötik dirençliliği de tersine çevirmiştir. Bu yüzden, bu kemopreventif ajanlar kanser tedavilerine katkı olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Ayrıca doğal kaynaklardan elde edildiğinden farmakolojik güvenirlilikleri de oldukça yüksektir. Sonuçta amaç kemoterapötik kaynaklı toksisiteyi minimuma indirmektir.

Yapılan son çalışmalarda bu doğal ürünler düşük dozda etkinliği arttırmak amacı ile kemoterapötik ajanlarla kombine edilerek kullanılmaya başlanmıştır (Wang et al., 2014, Terlikowska et al., 2014). Bu besinsel ajanların karsinogenezin başlangıcında proliferatif ve inflamatuvar süreçleri baskıladığına inanılmaktadır. Bu inhibitör etkiler, karsinogenezin anjiyogenez ve metastaz olarak adlandırılan son adımlarını baskılar. Güncel standart tedavilerle özellikle çoklu ilaç direnci olan veya sisplatine dirençli olan hastalardan tatmin edici sonuçlar alınamamıştır. Dahası, tedavinin yan etkilerinden dolayı hastaların yaşam kalitesinin düştüğü görülmüştür. Yeni stratejiler klinik yanıtı arttırmak ve kanser terapisinin toksisitesini azaltmak için bu kemopreventif ajanlar üzerine odaklanmıştır (Wang et al., 2014).

2.4.KERSETİN'İN ANTİKARSİNOJENİK VE KEMOTERAPÖTİK ÖZELLİKLERİ

Kersetin flavonoid yapısında önemli bir gıda bileşenidir. Molekül formülü $C_{15}H_{10}O_7$ ve kimyasal adı 2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksikromen-4-on'dur. Farklı sebzelerde, meyvelerde, tohumlarda, çay ve kırmızı şarapta bulunur.

Batı ülkelerinde günlük kersetin alımı 30 mg'a ulaşmaktadır ve biyoyararlanımı besinde bulunan metabolik formuna bağlıdır (Gibellini et al., 2011, Jacobs et al., 2010). Aslında kersetin bitkide kersetin-glukoz konjugatı şeklinde bulunur ve enterositlerden emilir. Emildikten sonra kersetin-glikona dönüşmek için glikolize olur ve sonrasında enterositik transferazlar ile metillenir, sülfonillenir ve glukonidatlarına metabolize olur (O'Leary et al., 2003). Metabolitler intestinal lümene ve sonrasında kersetin-3-glukronid ve kersetin-3-sülfata dönüştürülmek üzere karaciğere taşınır. Plazmada bu şekilde ana metabolit olarak dolaşır (O'Leary et al., 2003, Williamson et al., 2018, Docampo et al., 2017).

Kersetin bitkilerde büyümeyi düzenleyen polar oksin taşıma inhibitörüdür (Sharma et al., 2018, Srivastava et al., 2016). Kersetin serbest radikal süpürücü ve metal iyon dönüşümüne bağlanır (Costa et al., 2016, Sun et al., 2015). Bunun yanında pro-oksidan etkileri de vardır. Kersetin oksitlendiğinde ilk oksidasyon ürünü stabil olmayan ve ikinci bir kinon oksidasyon işlemine giden semikinon radikalidir. Bu ürün kinonun toksik etkilerinden korumak için glutatyona bağlanır; ancak çok miktarda kersetine maruz kalan hücreler glutasyon azaldığında kinonlar proteinlere, lipitlere ve DNA'ya bağlanır ve hücredeki DNA hasarını indükler (Metodiewa et al., 1999, Chang et al., 2006, Fonseca-Silva et al., 2013, Bishayee et al., 2013).

Kersetin kanser hücresinde oluşan kinazları inhibe eder. Kinaz inhibitörü olarak kersetin farklı evrelerdeki meme, özafagus, akciğer ve karaciğer kanser hücre hatlarındaki p21, siklin B, p27 ve siklin-bağımlı kinazları düzenleyerek hücre siklusunun durdurulmasını indükler (Srivastava et al., 2016, Atashpour et al., 2015). Buna ek olarak B lenfosit hücreleri tarafından aktive edilen $NF-\kappa B$ engeller. $NF-\kappa B$ hücre canlılığının ve farklılaşmasının temel düzenleyicisidir (Zhang et al., 2015, Friedmann-Morvinski et al., 2016, Zhou et al., 2003, Xiang et al., 2014). Kersetin ayrıca direkt olarak BCL-2 ve BAD gibi mitokondriyal proteinleri etkiler ve hücre bütünlüğünü bozar; kaspaz bağımlı apoptozu aktive eder (Liu et al., 2015).

Kersetin pro-apoptotik etkisini birçok farklı yoldan gerçekleştirebilir. Birincisi MDA-MB-231 hücrelerinde, kersetin tedavisiyle sitozolik Ca^{+2} seviyesi artar ve mitokondriyel membran potansiyelini azaltır ki bu da kaspaz-3, -8 ve -9 aktivasyonunu kolaylaştırır (Chien et al., 2009). U937 hücrelerinde mitokondriyal yolla apoptozu indüklediği doğrulandı. Bu hücrelerde sitokrom-c'nin sitoplazmada salımının tetiklenmesini durdurur ve birden fazla kaspazı sıralı aktive eder (Riccio et al., 2019, Lugli et al., 2005).

İkinci olarak kersetin hücre büyümesini ve apoptozu inhibe eder. Bunu siklin D1 ve survivini downregüle ederek ve β -katenin/Tcf sinyali aktivite transkripsiyonunu downregüle ederek yapar. Kersetin ile indüklenmiş apoptoz regülasyonunun survivin modülasyonu yoluyla olması akciğer hücre hatlarında olduğu gibi gliomalarda da gösterilmiş (Wei et al., 2008, Hashemzaei et al., 2017).

Yapılan bir çalışmada kersetinin U87 ve U251 glioblastoma hücrelerinde kullanılan TMZ'nin etkisini hsp27'i bloke ederek etkinliğini artırdığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada sadece TMZ kullanıldığında apoptoz normal seviyede olan dozda, kersetin ile beraber kullanıldığında daha fazla apoptozla gitmiş hücreler gösterilmiştir (Sang et al., 2014).

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.Kimyasallar

- DMEM F-12 besiyeri (Thermoscientific 12634010),
- Dimetilsülfoksit (DMSO, Applichem A1584),
- Fetal bovine serum (FBS, Sigma F2442),
- Penisilin/Streptomisin (Sigma P4333),
- Tripsin EDTA, (Merck T4049)
- L-glutamin (Sigma G7513)
- Temozolomid (Sigma T2577),
- Kersetin (Sigma Q4951),
- MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid)) (Sigma M2128)
- RealTime ready Cell Lysis Kit 50 reaksiyon, 06 366 821 001 ROCHE
- RealTime ready Katalog Assays 300 reaksiyon, 05 532 957 001 ROCHE
- LightCycler 480 Probes Master 500 reaksiyon, 04 707 494 001 ROCHE
- Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit 50 reaksiyon, 05 081 955 001 ROCHE
- LightCycler 480 Multiwell Plate 1 x 10 plate, 04 729 692 001 ROCHE

3.2.Cihazlar

- -20 ° C dondurucu ve +2/+8 ° C (Siemens)
- -80 ° C dondurucu (OPERON)
- DS-11 Spektrofotometre(DeNovix®)
- Etüv(EcoCell)
- Hassas Terazı (Adventurer, OHAUS)
- Isıtıcı ve Magnetik Karıştırıcı(Hei-Standart, Heidolph MR)
- Isıtıcı ve Soğutucu Blok(CHB-202,Bioer)
- İnkübatör (Biosan)
- Multifonksiyonel Mikroplaka Okuyucu (Biotek synergy HT)
- PCR cihazı (Lightcycler®480 Roche)
- Santrifüj (Nüve NF 1200R, Nüve Mikro200R)
- Spin Capsulefuge(GmClab,GILSON®)
- T100™Termal Döngüleyici (Bio-Rad)
- Vorteks (UM-10,Wisemix)
- xCELLigence cihazı RTCA (Acea)
- Işık mikroskopu (Optech Inverted Microscope)
- 1-10, 20-200, 100-1000 µL Mikropipetör ve uçları (Eppendorf)
- 200µl Multipipetör (Eppendorf)
- Laminar kabin (Safefast elite)
- Peolab perfect spin (GmClab,Gilson)
- Otoklav (Hirayama)
- Hücre sayıcı (Cedex innovatis XS)
- Light Cycler 480 (Roche)
- Pipet tabancası (Eppendorf)

- Flasklar, Steril 15mL ve 50mL santrifüj tüpleri
- 6'lık ve 96'lık hücre kültür plakaları
- Dondurma tüpleri, 0.22 µM'lik şırınga filtresi
- Enjektör (5-20cc)
- 1.5-2 ml'lik ependorf tüpleri

3.3.Hücre Kültürü

T98G (ATCC CRL-1690), U87 (ATCC HTB-14) hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler DMEM F12 tam besiyerinde 37 °C'de, %5 CO₂'li etüvde çoğaltılmıştır.

50 ml tam besiyeri hazırlamak için;

44 ml DMEM F-12'nin üzerine 5 ml FBS (%10), 0,5 ml Penisilin/streptomisin (%1) ve 0,5 ml L-glutamin (%1) eklendi ve +4 °C'de saklandı.

Hücreler flaskta yaklaşık %80 doluluğa ulaştığında sayılarak 96 lık plakalara hücre canlılık analizi, RT-PCR ile gen ekspresyonu ve akış sitometrisi için ekildi. Hücre canlılık analizi için gerçek zamanlı hücre analizi (xCelligence; GZHA) ve 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) metotları kullanıldı.

Hücreler DMEM tam besiyerinde çoğaltıldıktan sonra her bir deney grubu için plaklara farklı hücre sayısında ekilmiş ve uygulanan prosedürler ilgili deney grupları altında açıklanmıştır.

3.4.MTT

TMZ ve kersetinin T98G ve U87 hücrelerinde sitotoksik etkilerini saptamak amacıyla MTT yöntemi kullanılmıştır. Hücrenin mitokondriyal aktivitesi üzerinden canlılığı hakkında fikir veren bu yöntem; çözünür halde (sarı renkli) olan MTT molekülünün hücre canlılığıyla doğru orantılı olarak formazan tuzuna (mor renkli) dönüşmesi ve formazan kristalleri uygun çözücü (0,1 M HCl içersinde % 10 SDS) ile çözündükten sonra 570 nm de absorbans şiddetinin okunması olarak özetlenebilir.

Çalışmamızda TMZ ve kersetinin tek başına ve birlikte kullanımlarının kısa süreli (24 saat) ve kronik (ardışık doz uygulamalı (5 gün)) süre ile ardışık uygulaması sonucunda hücre canlılığı üzerine etkileri MTT yöntemi ile araştırılmıştır.

Her bir kuyucukta 10.000 hücre olacak şekilde 100 µl hücre DMEM tam besiyeri içerisinde ekim yapılmış ve kuyucuklara hücrelerin homojen bir biçimde dağılımı sağlanmıştır. Daha sonra bu hücreler 37 °C'de, %5 CO₂'li etüvde 24 saat bekletilerek kuyucuklara tutunmaları sağlanmıştır. Her uygulamanın kontrol grubunda, uygulanan maddelerin çözücüsü olan DMSO'nun kullanılan en yüksek konsantrasyon olan %0,5 DMSO kullanıldı.

U87 ve T98G hücre hatlarında kersetin ile 24 saatlik MTT için hücrelerin tutunmasını takiben kontrol, 25-50 ve 100 µM kersetin uygulandı ve 24 saat sonra 570 nm de absorbansı ölçüldü.

U87 ve T98G hücrelerinin TMZ ile 120 saatlik MTT için hücreler tutunduktan sonra kontrol grubu ile 25-50-100-200 ve 400 µM TMZ 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulandı ve son uygulamadan 24 saat sonra 570 nm de absorbansı ölçüldü.

Ayrıca U87 ve T98G hücre hatlarında TMZ 50 µM ve kersetin 25 µM tekli ve birlikte 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulaması sonrasında MTT gerçekleştirildi ve son uygulamadan 24 saat sonra 570 nm absorbansı ölçüldü.

3.5.Akış Sitometri Tekniğinde Anneksin V-PI Yöntemi ile Apoptoz Tayini

Membran fosfolipidlerinden biri olan fosfotidilserin, hücrenin plazma membranının sitoplazma kısmına bakan iç yüzünde olduğu halde, apoptotik sürecin başlaması ile hücrenin plazma membranının dış yüzüne çıkmaya başlar. Apoptozun bu fizyopatolojik özelliklerinden yararlanılarak, apoptotik hücreler tespit edilebilmektedir.

Anneksin V hücrenin dış yüzeyinde ortaya çıkan fosfotidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, hücre yüzeylerine Anneksin V bağlanma oranı, o hücre topluluğundaki apoptoza uğramış hücrelerin oranını vermektedir. Floresan bir madde olan FITC ile Anneksin kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfotidilserine bağlanma oranı akış sitometri yönetimi ile kantitatif olarak ölçülebilmektedir. Propidyum iyodür (PI) non-vital bir boya olduğundan PI ile boyanan hücreler nekrotik hücrelerin tespitinde kullanılır. Bu nedenle akış sitometrisinde ikinci bir boya olarak PI eklenmektedir. Boyalarla boyanan hücreler akış sitometri cihazından geçirilir. Sıvı içinde sıra ile akan hücrelere lazer ışını gönderilir ve floresan madde ile işaretlenmiş hücreler de ışık yayarlar. Yayıdıkları ışık farklılıkları nedeniyle canlı hücre, apoptoza veya nekroza giden hücreler tespit edilebilmektedir.

Apoptoz tespiti için 5×10^5 miktarında hücrelerine Annexin V-PI Detection kiti kullanıldı. MTT ve xCelligence ile çalışma için uygun TMZ ve kersetin konsantrasyonları kullanıldıktan sonra 72 saat sonra akış sitometri analizi gerçekleştirildi. Sonuçlar yapılmış olan diğer analizlerle birlikte canlı hücre oranı veya apoptoza giden hücre oranları bakımından değerlendirildi.

3.6.Gen Ekspresyonunun Gerçek zamanlı-PCR (RT-PCR) Sistemi ile Tespit Edilmesi

RNA İzolasyonu

Hücrelerden RNA izolasyonu Roche RNA izolasyon kiti kullanılarak protokolün öngördüğü metod ile yapılmıştır. Bu şekilde nükleaz enzimlerinin inhibe edildiği ortamda RNA'nın mümkün olan en saf haliyle DNA ve proteinlerden ayrılması sağlandı. Elde edilen RNA örneklerinin spektrofotometre (Nanodrop) ile miktar tayini yapılarak RNA konsantrasyonları belirlendi ve her örneğin eşit konsantrasyonlara getirilmesi sağlanmıştır. RNA izolasyonunda kullanılacak tüm materyaller % 0.1'lik DEPC (dietilpirokarbonat) ve RNAaz'ı uzaklaştıran çözeltiyle nükleazlardan arındırıldı.

cDNA Eldesi ve Saklanması

İzole edilen RNA örnekleri Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit - Roche cDNA reverse transkriptaz kiti kullanılarak cDNA'ya dönüştürüldü. Bu işlem için RNA örnekleri, oligo-dT primerler ile inkübe edildikten sonra, Thermal cycler'a yüklenerek cDNA kitinin protokolüne uygun olarak işleme tabi tutuldu. Bu teknik sayesinde tüm genomu ait cDNA'lar elde edilecek ve reaksiyon sonucunda örnek başına 20µl cDNA kullanıldı.

LRP, MGMT, ERCC2, EGFR ve Bcl-2 genlerinin gen ekspresyon seviyelerinin tespitinde uygun primerler ve taqman prob kullanılarak protokolün önerdiği metod ile Roche LightCycler 480 real-time PCR cihazı ile kantitatif değerlendirme yapıldı. Real-time PCR değerlendirmesi esnasında normalizasyon amacıyla GAPDH gen ekspresyonundan faydalanıldı. Negatif kontrol reaksiyonu, template hariç tüm bileşenleri içerecek şekilde hazırlandı. Ayrıca her bir örnek üç tekrarlı olarak test edildi.

PCR örnekleri için $2^{-\Delta\Delta CT}$ denkleminde göre örnek ve kontrol grupları arasında LRP, MGMT, ERCC2, EGFR ve Bcl-2 gen ekspresyon seviyelerinin kontrole değişimleri hesaplandı.

Hücre kültürü laboratuvarında T98G ve U87 hücre hatları çoğaltılarak Temozolomid 50 μ M, Kersetin 25 μ M ve Temozolomid 50 μ M+Kersetin 25 μ M konsantrasyonlarda 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulandı. 24 saat sonra RNA izolasyonu ve ardından RT-PCR ile ölçümler gerçekleştirildi.

3.7.Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (RTCA, Xcelligence)

xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi (Real time cell monitoring, RTCA, GZHA) cihazı özel elektrot kaplı plakası sayesinde impedans ölçerek hücrenin canlılığı, plakaya yapışma hız ve yetisi, proliferasyonu hakkında yazılımı sayesinde bilgisayara anlık bilgi aktarır.

Elektronik plakaya hücreler ekildikten sonra plaka cihaza yerleştirildi. Deney başlatılır cihaz yazılımı sayesinde her 15 dakikada bir impedans ölçerek hücre indeksi (CI) hesaplar ve bilgisayara verileri anlık aktarır. Elektrotlar arasına yerleşen her hücre alternatif akım direncini artırarak hücre indeksini artırır.

Bu test ile uygulanan maddelerin hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, hücrelerin plaka tabanına tutunma yetisi ve üzerine yaptıkları etki gerçek zamanlı olarak izlendi.

3.8.İstatistiksel Analiz

Tüm hücrelerin MTT canlılık analizi ve RT-PCR gen ekspresyonu seviyesi analizi verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi için Graphpad Prism 6.01 programı kullanılmıştır. Değerler ortalama $\pm$ standart hata olarak sunuldu.

Kontrol grupları ile karşılaştırmalar tek yönlü ANOVA ile değerlendirildi. Post-hoc testler Dunnett's testi ile yapılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalarda ise Tukey's çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Gerçek zamanlı hücre analizi testi ve akış sitometrisi analizi grafikleri için analiz cihazlarının dahili programından faydalanılmıştır. Tüm grafikler ve şekiller Graphpad Prism programı aracılığı ile çizilmiştir.

4.BULGULAR

4.1.MTT

Deneyin temel amacı TMZ'nin tek başına ve kersetin ile birlikte uygulandığında glioblastoma hücre hatları üzerine sitotoksik etkilerinin incelenmesidir. TMZ'ye duyarlı U87 ve TMZ'ye dirençli T98G hücre hatları tercih edilmiştir. U87 ve T98G hücre hatlarında kersetinin aynı konsantrasyonlarında hücre ölüm oranlarının incelenmesi ve kullanılacak kersetin konsantrasyonunun belirlenmesinde MTT testi kullanıldı. Ayrıca hücre canlılık testi ile yüksek oranda hücre ölümüne neden olmayan kersetin konsantrasyonunun bulunması için de yine aynı testten faydalanıldı.

TMZ'nin ve kersetinin tekli ve birlikte uygulanmasıyla gerçekleştirilen hücre canlılık testinde 120 saatlik (5 gün çoklu uygulamalı) MTT testi tercih edildi. Çünkü onkoloji klinik pratiğinde TMZ'nin etkili kullanımı 5 gün süreyle günde bir defa uygulaması şeklindedir.

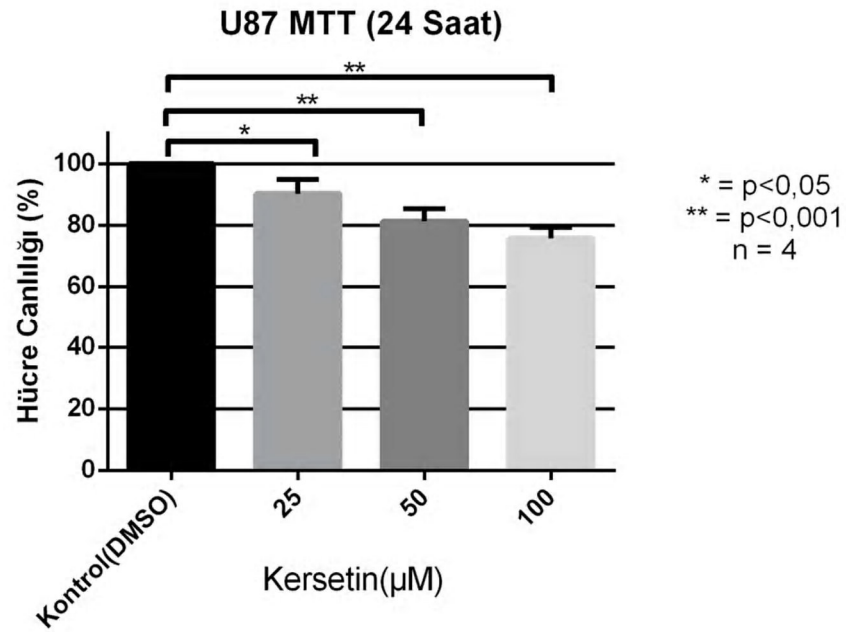
Hücre canlılık testinde sadece canlı hücre oranı ölçüldü. Hücrelerin morfolojik görünümleri değerlendirilmedi.

U87 ve T98G hücre hatlarına kersetin uygulanarak 24 saatlik inkübasyona bırakıldı ve hücre canlılıkları değerlendirildi. Kontrol grubu olarak besiyeri ve %0,5'lik DMSO kullanıldı. Kersetinin ise 25 µM, 50 µM, 100 µM konsantrasyonları kullanıldı. Kontrol grubu için hücre canlılığı %100 kabul edilerek kontrol grubuna göre hücre canlılığı değerlendirildi.

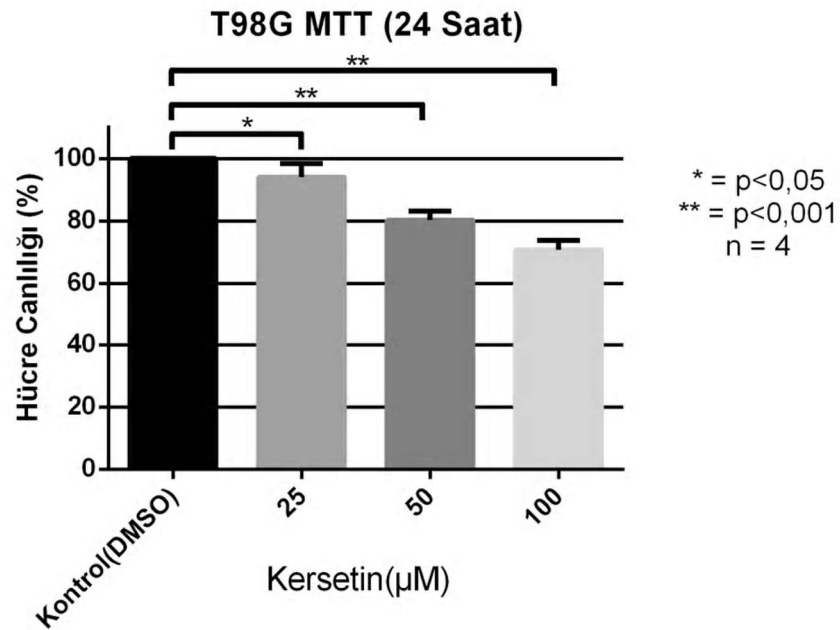
U87 hücre hattında kersetin ile yapılan 24 saatlik hücre canlılık testinde 25 µM, 50 µM, 100 µM konsantrasyonları karşısında sırayla %90,6±4,57 - %81,7±4,03 - %76,2±3,59 hücre canlılığı ölçüldü. Tüm gruplarda 24 saatlik hücre canlılığı DMSO içeren kontrol grubuna karşı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Konsantrasyona bağlı olarak azalan hücre canlılığı gözlemlendi (Şekil 6).

T98G hücre hattında kersetinin 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M konsantrasyonlarıyla yapılan 24 saatlik hücre canlılık testinde DMSO içeren kontrol grubuna karşı hücre canlılık oranları sırayla %94,4 $\pm$ 4,32 - %81,1 $\pm$ 2,87 - %71 $\pm$ 3,09 olarak bulundu. Konsantrasyona bağımlı olarak canlılık azalırken 50 μ M ve 100 μ M gruplarında sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 7)(p<0,05).

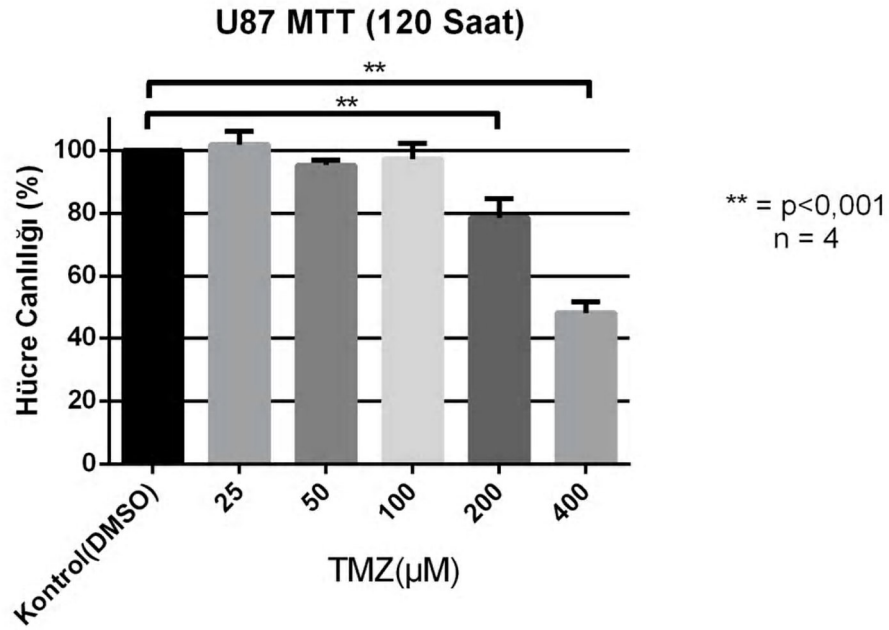
U87 ve T98G hücre hatlarına 24 saat aralıklar ile 120 saat boyunca TMZ uygulandı ve %0,5 DMSO içeren kontrol grubuna karşı hücre canlılığı değerlendirildi. Her iki hücre hattında 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M konsantrasyonlarda TMZ kullanıldı. 120 saat sonra kontrol grubuna karşı hücre canlılığı U87 hücre hattında 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M TMZ konsantrasyonlarında sırasıyla %102,3 $\pm$ 4,35 - %95,8 $\pm$ 1,71 - %97,8 $\pm$ 4,99 - %78,8 $\pm$ 6,02 - %48,7 $\pm$ 3,5 bulundu. 200 μ M ve 400 μ M grupları istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 8)(p<0,001). T98G hücre hattında ise hücre canlılığı sırasıyla %79,3 $\pm$ 3,86 - %78,1 $\pm$ 6,22 - %76,8 $\pm$ 5,91 - %66 $\pm$ 4,20 - %51,8 $\pm$ 4,03 olarak bulundu. Tüm gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 9)(p<0,001).



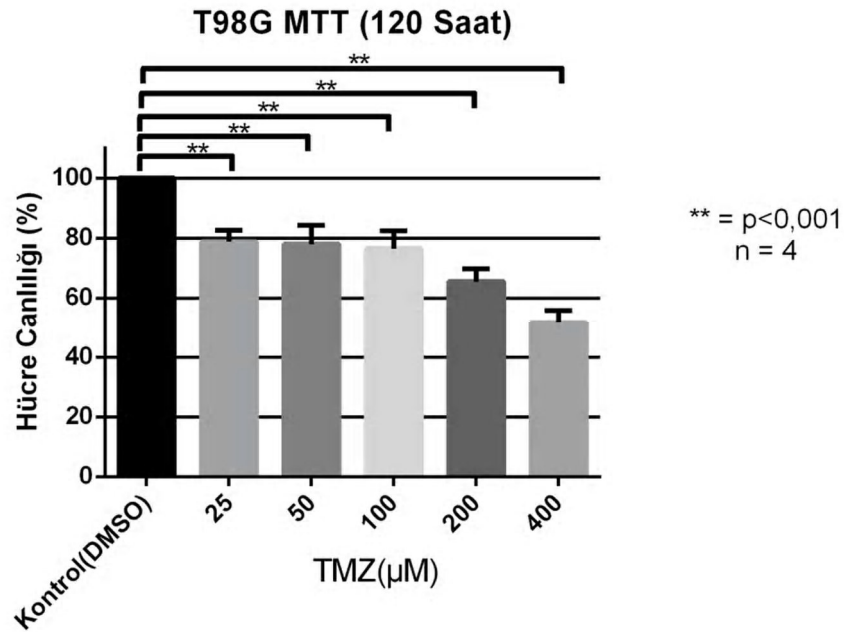
Şekil 6: U87 hücrelerinin kersetin (25,50 ve 100 μM) ile 24 saatlik inkübasyonu sonrası MTT ile ölçülen hücre canlılığı oranı. DMSO içeren kontrol grubuna karşı artan kersetin konsantrasyonunun hücre canlılığına etkisi ölçüldü. Konsantrasyona bağımlı olarak hücre canlılığı azaldı. En az hücre canlılığı 100 μM grubunda gözlemlendi (n=4).



Şekil 7: T98G hücrelerinin kersetin (25,50 ve 100 μM) ile 24 saatlik inkübasyonu sonrası MTT ile ölçülen hücre canlılığı oranı. DMSO içeren kontrol grubuna karşı artan kersetin konsantrasyonunun hücre canlılığına etkisi ölçüldü. Konsantrasyona bağımlı olarak hücre canlılığı azaldı. En az hücre canlılığı 100 μM kersetin grubunda gözlemlendi (n=4).



Şekil 8: U87 hücrelerine 120 saat boyunca 24 saat aralıklarla TMZ (25,50,100,200 ve 400 µM) uygulanması ve inkübasyonu sonrası MTT ile ölçülen hücre canlılığı oranı. DMSO içeren kontrol grubuna karşı artan TMZ konsantrasyonunun hücre canlılığına etkisi ölçüldü. En az hücre canlılığı 400 µM grubunda gözlemlendi (n=4).



Şekil 9: T98G hücrelerine 120 saat boyunca 24 saat aralıklarla TMZ (25,50,100,200 ve 400 µM) uygulanması ve inkübasyonu sonrası MTT ile ölçülen hücre canlılığı oranı. DMSO içeren kontrol grubuna karşı artan TMZ konsantrasyonunun hücre canlılığına etkisi ölçüldü. Konsantrasyona bağımlı olarak hücre canlılığı azaldı. En az hücre canlılığı 400 µM grubunda gözlemlendi (n=4).

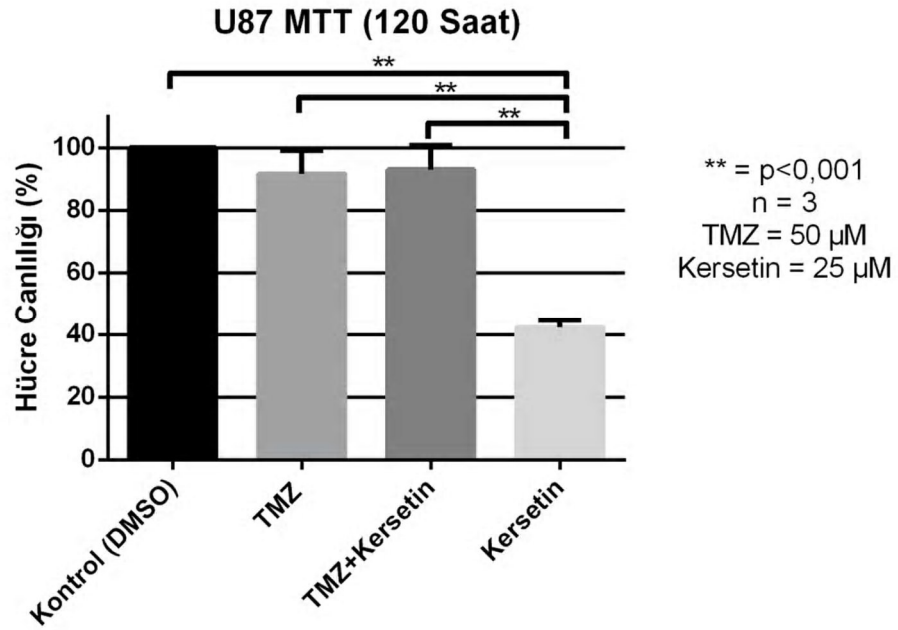
U87 ve T98G hücre hatlarına TMZ 50 μ M ve Kersetin 25 μ M tek başına ve birlikte 120 saat boyunca 24 saat aralıklarla uygulandı ve hücre canlılıkları DMSO içeren kontrol grubuna karşı değerlendirildi.

120 saat sonrasında U87 hücre hattında hücre canlılıkları TMZ 50 μ M için %91,87 $\pm$ 7,51, TMZ 50 μ M+Kersetin 25 μ M kombinasyonu için %93,33 $\pm$ 7,81, Kersetin 25 μ M için ise %43,30 $\pm$ 2,31 olarak bulundu. Kersetin grubu diğer tüm gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 10).

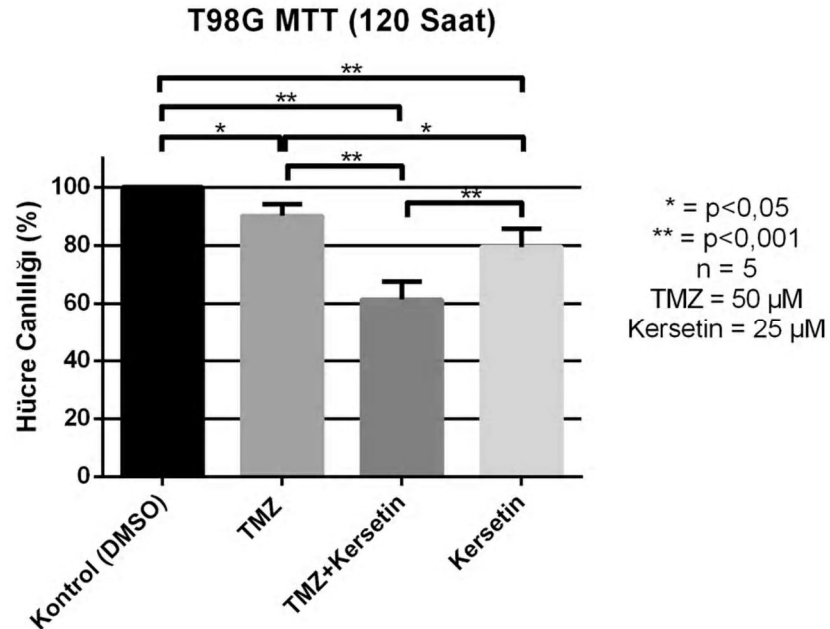
T98G hücre hattında 120 saat sonunda kontrol grubuna karşı hücre canlılığı TMZ 50 μ M için %90,43 $\pm$ 4,5, TMZ 50 μ M+Kersetin 25 μ M kombinasyonu için %61,67 $\pm$ 6,60, Kersetin 25 μ M için ise %79,53 $\pm$ 4,03 olarak bulundu (Şekil 11). Tüm gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır.

Sonuç olarak kersetinin MTT canlılık testinde hücre canlılığını azaltan ve kaynaklarda da yakın konsantrasyonda uygulaması bulunan 25 μ M, TMZ için ise 50 μ M konsantrasyonları tercih edildi.

Son hücre canlılığı deneyi TMZ 50 μ M ve kersetin 25 μ M konsantrasyonları kullanılarak 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulama ile gerçekleştirildi. Bu deneyin amacı onkoloji kliniği rutin uygulaması benzeri uygulama yapılması ve hücre canlılığını azaltan ancak toksik olmayan konsantrasyonun doğrulanmasıdır. Bu testin sonucunda T98G hücre hattında TMZ, kersetin ile birlikte kullanıldığında daha fazla hücre ölümü sağlamıştır.



Şekil 10: U87 hücrelerine 120 saat boyunca 24 saatte bir TMZ $50 \mu\text{M}$ ve kersetin $25 \mu\text{M}$ 24 uygulanması ve inkübasyonu sonrası MTT ile ölçülen hücre canlılığı oranı. DMSO içeren kontrol grubuna karşı TMZ, TMZ+kersetin ve kersetin gruplarının hücre canlılığına etkisi ölçüldü. En az hücre canlılığı kersetin grubunda gözlemlendi ($n=3$).



Şekil 11: T98G hücrelerine 120 saat boyunca 24 saatte bir TMZ $50 \mu\text{M}$ ve kersetin $25 \mu\text{M}$ 24 uygulanması ve inkübasyonu sonrası MTT ile ölçülen hücre canlılığı oranı. DMSO içeren kontrol grubuna karşı TMZ, TMZ+kersetin ve kersetin gruplarının hücre canlılığına etkisi ölçüldü. En az hücre canlılığı TMZ+kersetin grubunda gözlemlendi ($n=5$).

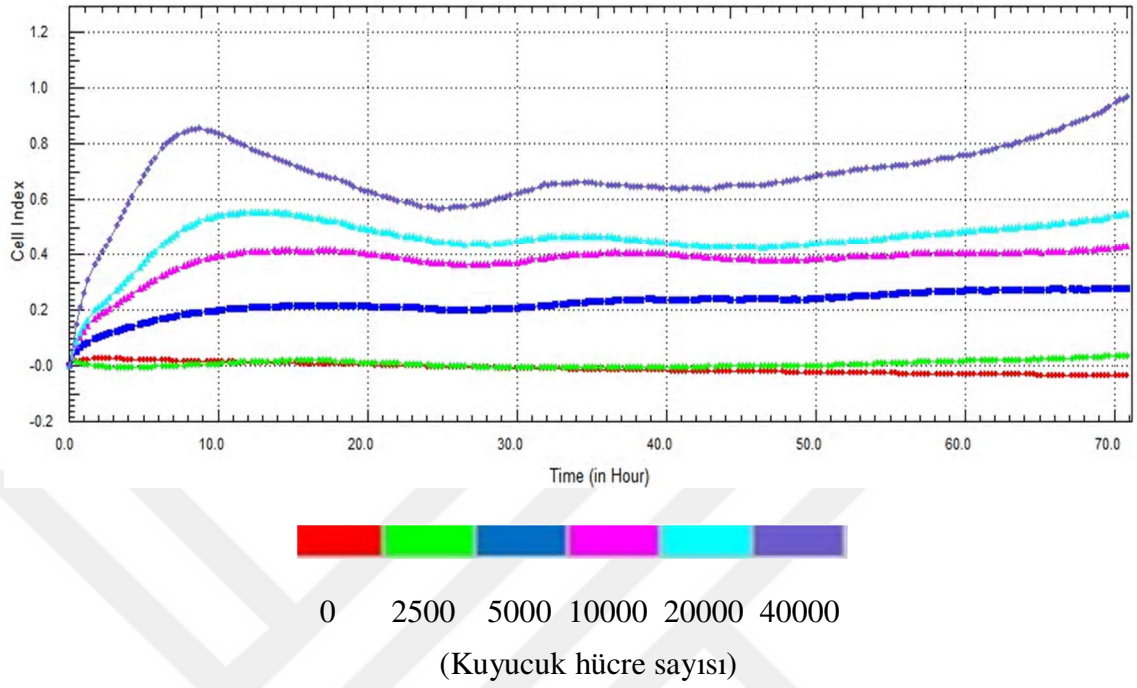
4.2.GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZİ (XCELLIGENCE)

Gerçek zamanlı hücre analizi T98G ve U87 hücre hatlarında kersetinin ve TMZ'nin hücre canlılığı üzerine etkilerinin daha hassas değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirildi. Kersetinin veya TMZ'nin T98G ve U87 hücre hatları için IC50 değerleri farklı kaynaklarda farklı yer almaktadır. Bu analiz ile hücre indeksi eğrileri farklı TMZ ve kersetin konsantrasyonlarında hücre sayılarındaki değişim daha net izlenebilecektir.

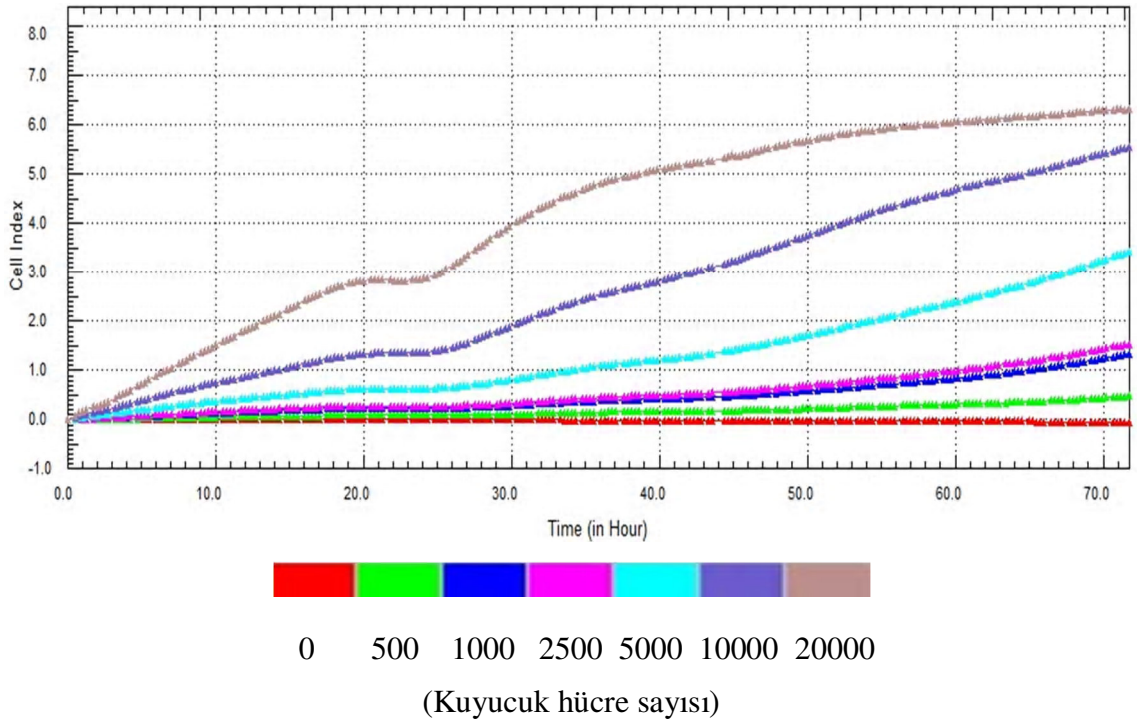
Ayrıca TMZ ve kersetin uygulanan T98G ve U87 hücrelerinin çoğalma eğrilerini gerçek zamanlı hücre analizi ile gösteren ilk çalışmadır.

T98G ve U87 hücre hatları, kuyucuklara 500-40000 arasında değişen sayıda ekildi. Hücre çoğalma eğrileri platoya ulaşana kadar izlendi. İzleme T98G ve U87 hücre hattı için yaklaşık 70 saat gerçekleştirildi.

Her iki hücre hattı düşünüldüğünde kullanılacak en uygun hücre sayısı 10000 hücre/kuyucuk olarak bulundu. T98G ve U87 hücre hatları üzerinde TMZ ve kersetin ile gerçekleştirilen gerçek zamanlı hücre analizlerinde bu hücre sayıları kullanıldı (Şekil 12-13).



Şekil 12: xCelligence ile U87 hücre profillemesi (n=8). Bu deney ile U87 hücre hattı ile kuyucuklara 0-40000 arasında değişen farklı hücre sayıları ekim yapıldı ve 70 saat boyunca hücre çoğalması incelendi.



Şekil 13: xCelligence ile T98G hücre profillemesi (n=8). Bu deney ile T98G hücre hattı ile kuyucuklara 0-20000 arasında değişen farklı hücre sayıları ekim yapıldı ve 70 saat boyunca hücre çoğalması incelendi.

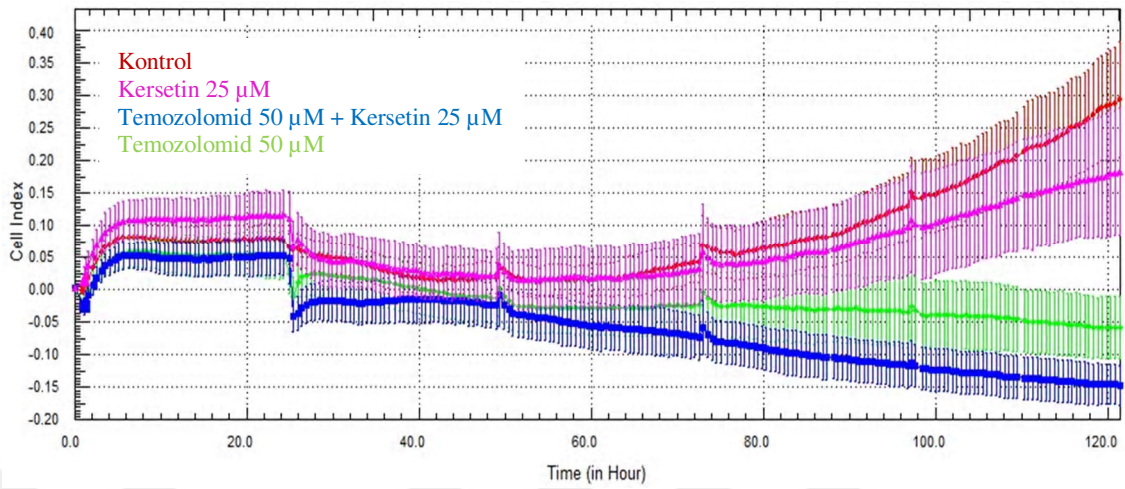
En uygun konsantrasyon olarak bulunan TMZ 50 μ M, kersetin 25 μ M ve TMZ 50 μ M + kersetin 25 μ M kombine uygulaması ile 72 saat boyunca 24 saatte bir uygulama yapıldı ve toplamda 120 saat takip edildi.

Gerçek zamanlı hücre analizlerinde T98G ve U87 hücre hatlarında kontrol gruplarının çoğalmaya devam ettiği görüldü. T98G hücrelerinde TMZ ve TMZ'nin kersetin ile birlikte uygulaması hücrelerin çoğalmalarını engelledi. Kersetin tek uygulanması ise TMZ grubuna göre daha az olmak üzere T98G hücre çoğalmalarını kontrol grubuna göre azalttığı gözlemlendi (Şekil 14).

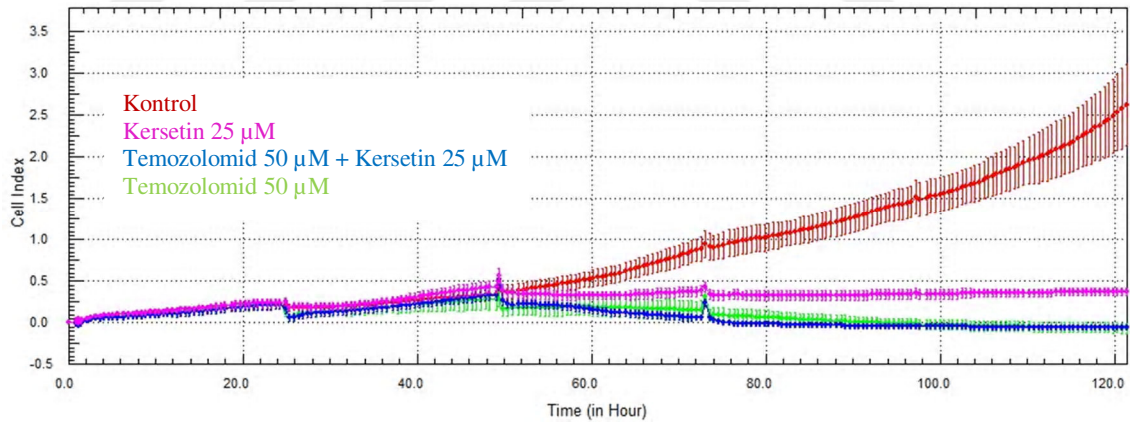
U87 hücre hatlarında TMZ'nin tek başına ve kersetin ile birlikte uygulanan grupta hücre ölümünün arttığı görüldü. TMZ ve kersetinin birlikte kullanılması ile diğer gruplardan daha fazla hücre ölümüne neden olması U87 hücre hattı üzerinde sitotoksik etki göstermesini düşündürdü. Kersetinin tekli uygulandığı grupta kontrol grubuna benzer hücre indeksi eğrisinin olduğu gözlemlendi (Şekil 15).

Sonuç olarak xCelligence ile gerçek zamanlı hücre analizi, TMZ ve kersetin uygulanan T98G ve U87 hücre hatlarının 120 saat takip edilmesiyle hücre çoğalma eğrilerinin incelenmesini sağlamıştır. Amacımız hücre çoğalmalarını azaltan ancak yüksek oranda hücre ölümüne neden olmayan konsantrasyonun doğrulanması ve akış sitometrisi ve RT-PCR yöntemi ile gen ekspresyonu sonuçlarının canlılık ve apoptoz yönünden yorumlanmasına katkı sağlamasıdır.

TMZ ve kersetinin birlikte uygulanması TMZ'ye duyarlı U87 hücre hattında, TMZ'ye dirençli T98G hücre hattına göre daha fazla hücre ölümü sağlamıştır (Şekil 14-15).



Şekil 14: U87 hücre hattında TMZ'nin tekli ve kersetin ile birlikte uygulanması ile elde edilen hücre indeks eğrileri (n=8). Hücre hatlarına TMZ 50 μ M ve kersetin 25 μ M ile 24 saatte bir olmak üzere üç uygulama yapıldı ve toplam 120 saat takip edildi. TMZ uygulanan gruplarda hücre çoğalmasının önemli derecede inhibe edildiği gözlemlendi. En fazla hücre ölümü TMZ+kersetin grubunda görüldü.



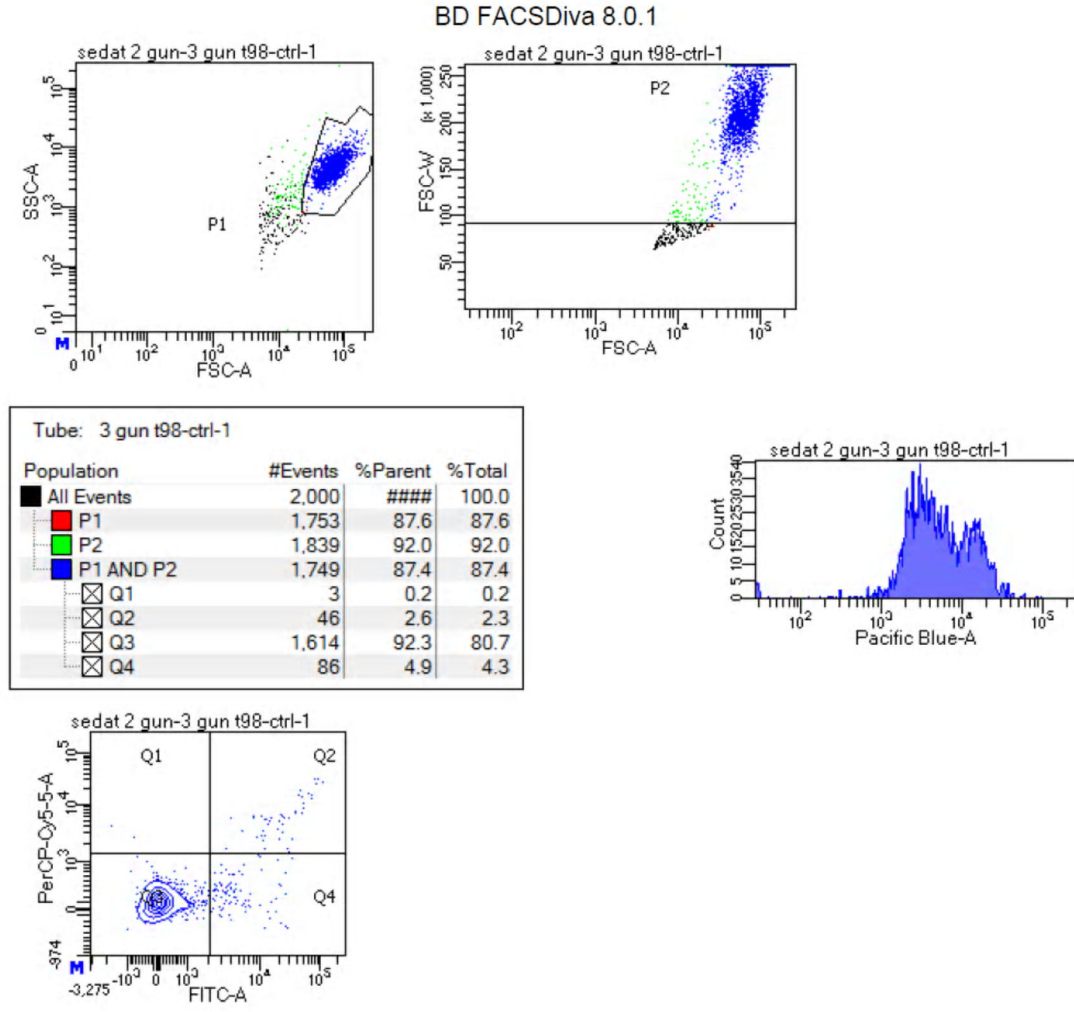
Şekil 15: T98G hücre hattında TMZ'nin tekli ve kersetin ile birlikte uygulanması ile elde edilen hücre indeks eğrileri (n=8). Hücre hatlarına TMZ 50 μ M ve kersetin 25 μ M ile 24 saatte bir olmak üzere üç uygulama yapıldı ve toplam 120 saat takip edildi. TMZ uygulanan gruplarda hücre çoğalmasının önemli derecede inhibe edildiği gözlemlendi.

4.3.AKIŞ SİTOMETRİSİ

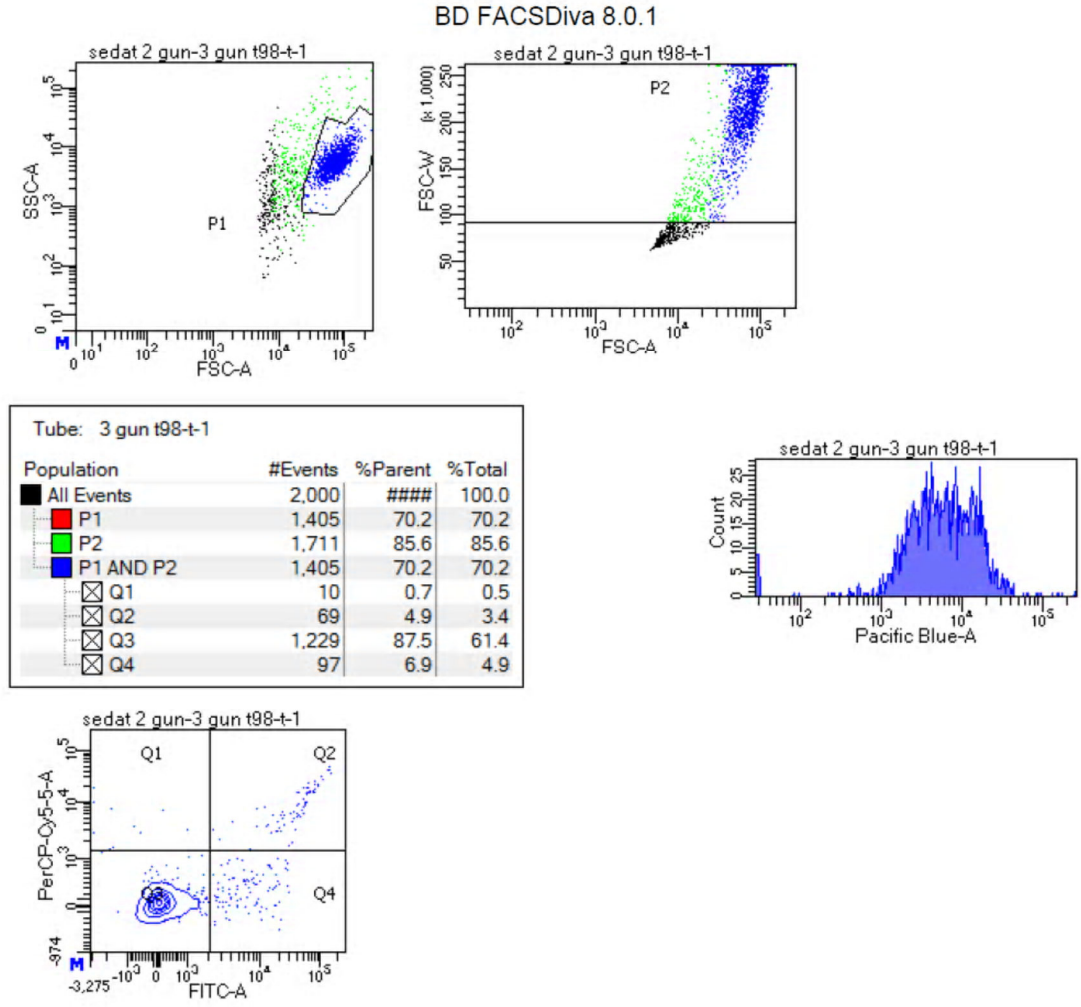
U87 ve T98G hücre hatları 3 gün boyunca TMZ ve Kersetin ile tek başına ve birlikte uygulandıktan sonra hücreler üzerinde akış sitometri analizi gerçekleştirildi. Amaç T98G ve U87 hücre hatlarına ait erken ve geç apoptoza giden hücre oranlarının kantitatif tespit edilmesidir. Akış sitometri analizi, RT-PCR yöntemi ile elde edilen gen ekspresyon seviyeleri ve apoptoz yolağı üzerinden gerçekleşen grupların yorumlanmasına katkı sağlamıştır.

TMZ etki mekanizmasının apoptoz yolağı üzerinden olması sebebiyle, erken ve geç apoptoza giden hücreler kantitatif olarak değerlendirilmiş ancak nekroza giden hücreler değerlendirilmemiştir. Şekillerde yer alan bölgeler Q1-nekroza uğrayan, Q2 geç apoptoz, Q3-canlı ve Q4-erken apoptoz durumunu temsil etmektedir.

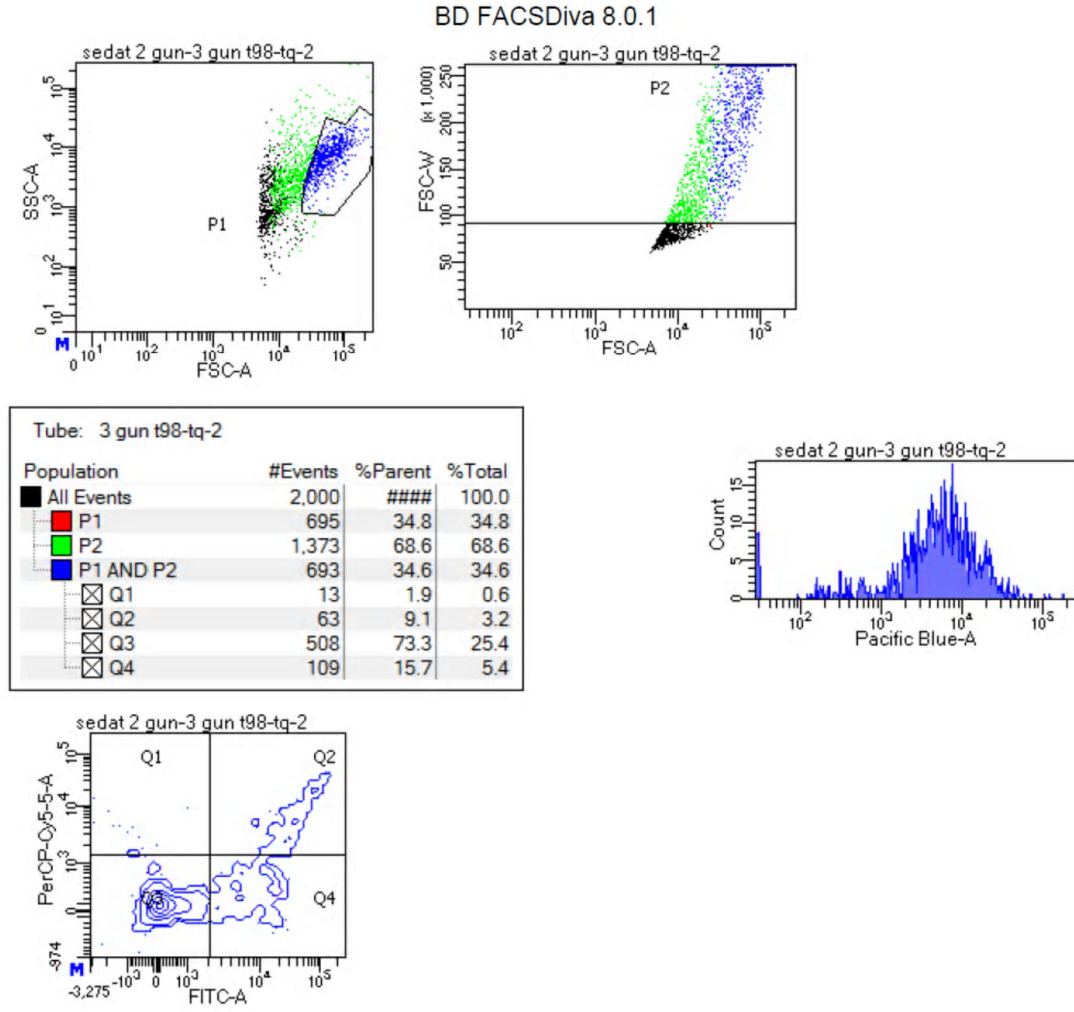
72 saat boyunca TMZ ve/veya kersetin uygulanan T98G hücre hattında kontrol, TMZ, kersetin, TMZ+kersetin uygulanmış grupların erken ve geç apoptoz oranları arasında farklılık gözlenmedi. T98G geç ve erken apoptoz oranları kontrol grubunda %2,3 - %4,3; TMZ grubunda %3,4 - %4,9; kersetin grubunda %3,9 - %5,8; TMZ+kersetin grubunda %3,2 - %5,4 olarak bulundu. Kontrol grubunda hücre canlılığı %80,7 iken, TMZ, TMZ+kersetin ve kersetin grubunda hücre canlılıkları sırayla %61,4 - %25,4 - %49,2 olarak ölçüldü. TMZ ve kersetinin birlikte kullanımının daha fazla hücre ölümüne neden olduğu gözlemlendi (Şekil 16-19).



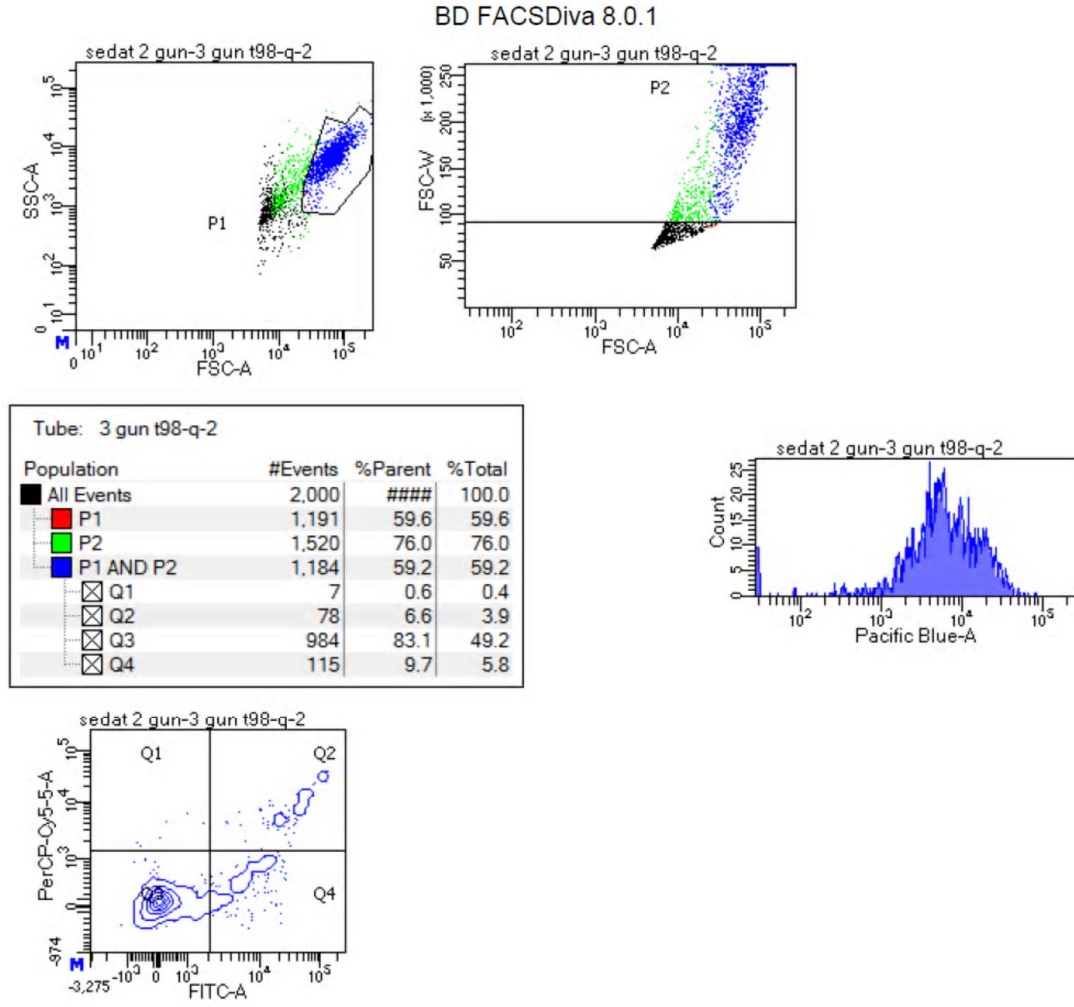
Şekil 16: T98G hücre hattında DMSO içeren kontrol grubu ile 72 saat sonra gerçekleştirilen akış sitometri analizi. Hücreler TMZ ve kersetin uygulaması olmadan inkübe edildi ve 72 saat sonunda hücre canlılığı %80,7 olarak gözlemlendi.



Şekil 17: T98G hücre hattına 72 saat boyunca 24 saatte bir TMZ 50 μ M uygulandıktan sonra gerçekleştirilen akış sitometri analizi. Erken (%4.9) ve geç (%3.4) apoptoz oranları birbirine yakın, hücre canlılığı ise %61,4 oranında bulundu.



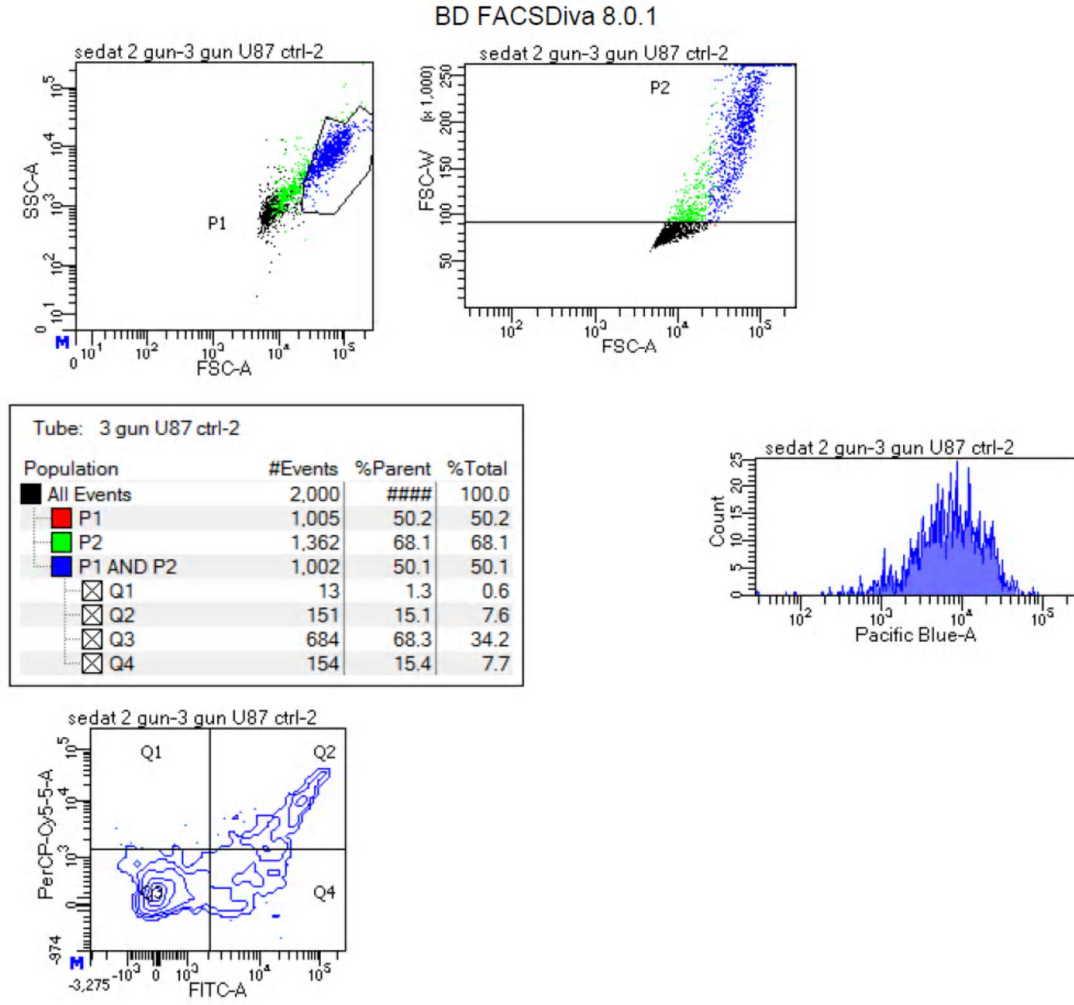
Şekil 18: T98G hücre hattına 72 saat boyunca 24 saatte bir TMZ 50 μ M ve kersetin 25 μ M birlikte uygulandıktan sonra gerçekleştirilen akış sitometri analizi. Erken (%5.4) ve geç apoptoz (%3.2) oranları birbirine yakın bulundu. Hücre canlılığı %25,4 olarak gözlemlendi.



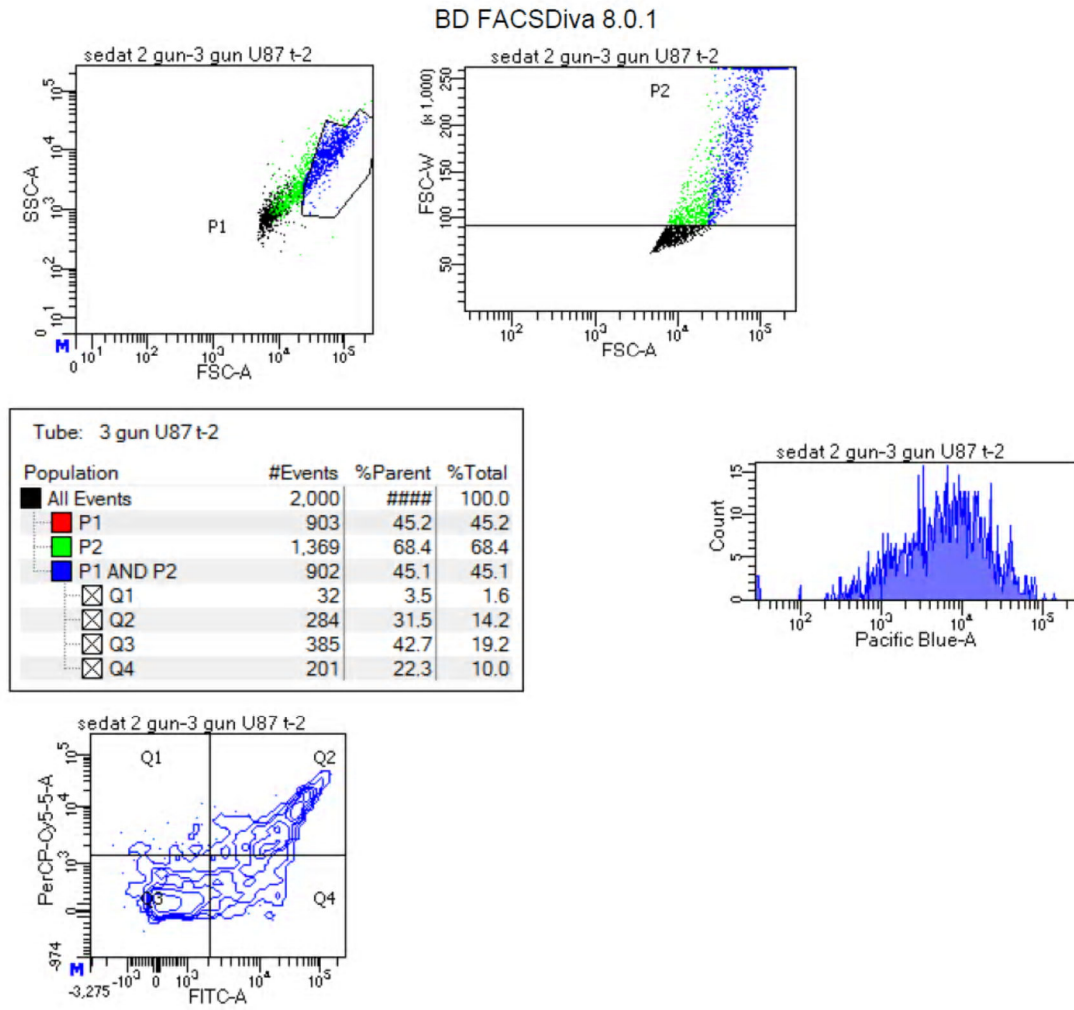
Şekil 19: T98G hücre hattına 72 saat boyunca 24 saatte bir kersetin 25 μ M uygulandıktan sonra gerçekleştirilen akış sitometri analizi. Erken (%5.8) ve geç apoptoz (3.9) oranları birbirine yakın bulundu. Toplam hücre canlılığı %49,2 olarak gözlemlendi.

U87 hücre hattına TMZ ve kersetin tek başına ve birlikte 72 saat boyunca 24 saatte bir uygulandı ve üçüncü günün sonunda kontrol grubunda hücre canlılığı oranı (%34,2) diğer gruplardan daha yüksek bulundu. Hücre canlılıkları TMZ, TMZ+kersetin ve kersetin gruplarında sırasıyla %19,2 - %12,2 - %14,4 olarak gözlendi (Şekil 20-23).

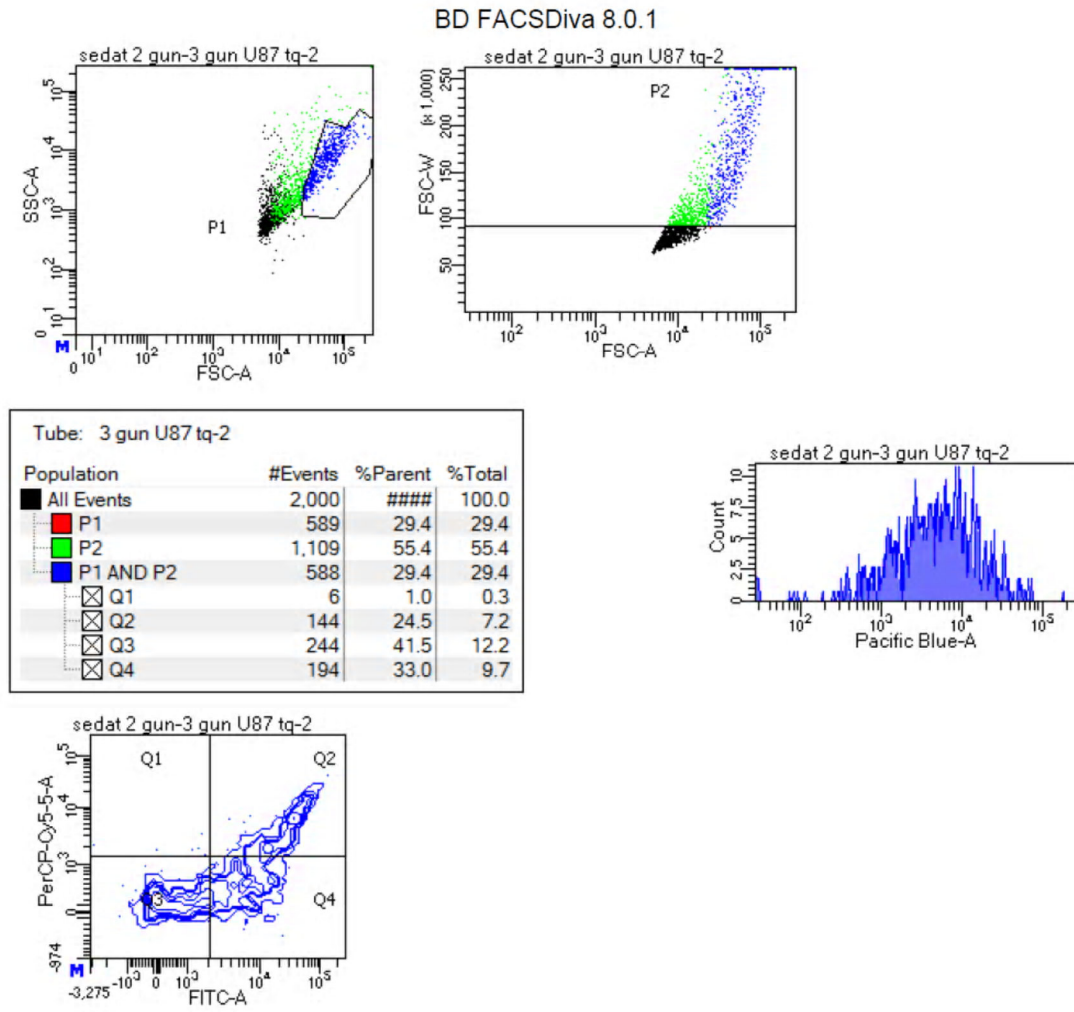
U87 hücre hattı ile gerçekleştirilen akış sitometrisi analizinde 72 saat sonrasında DMSO içeren kontrol grubunda geç ve erken apoptoz oranları %7,6 - %7,7 bulundu. 24 saatte bir uygulanan TMZ 50 μ M ve/veya kersetin 25 μ M sonrasında geç ve erken apoptoz oranları TMZ grubunda %14,2 - %10, TMZ+kersetin grubunda %7,2 - %9,7, kersetin grubunda %5,1 – %9,6 bulundu. TMZ grubunda erken ve geç apoptoz oranlarının diğer gruplara göre yüksek olduğu gözlendi (Şekil 20-23). Kersetin içeren gruplarda geç apoptoza giden hücre oranları kontrol grubuna göre düşük, erken apoptoza giden hücre oranları ise kontrol grubuna göre yüksek bulundu (Şekil 23).



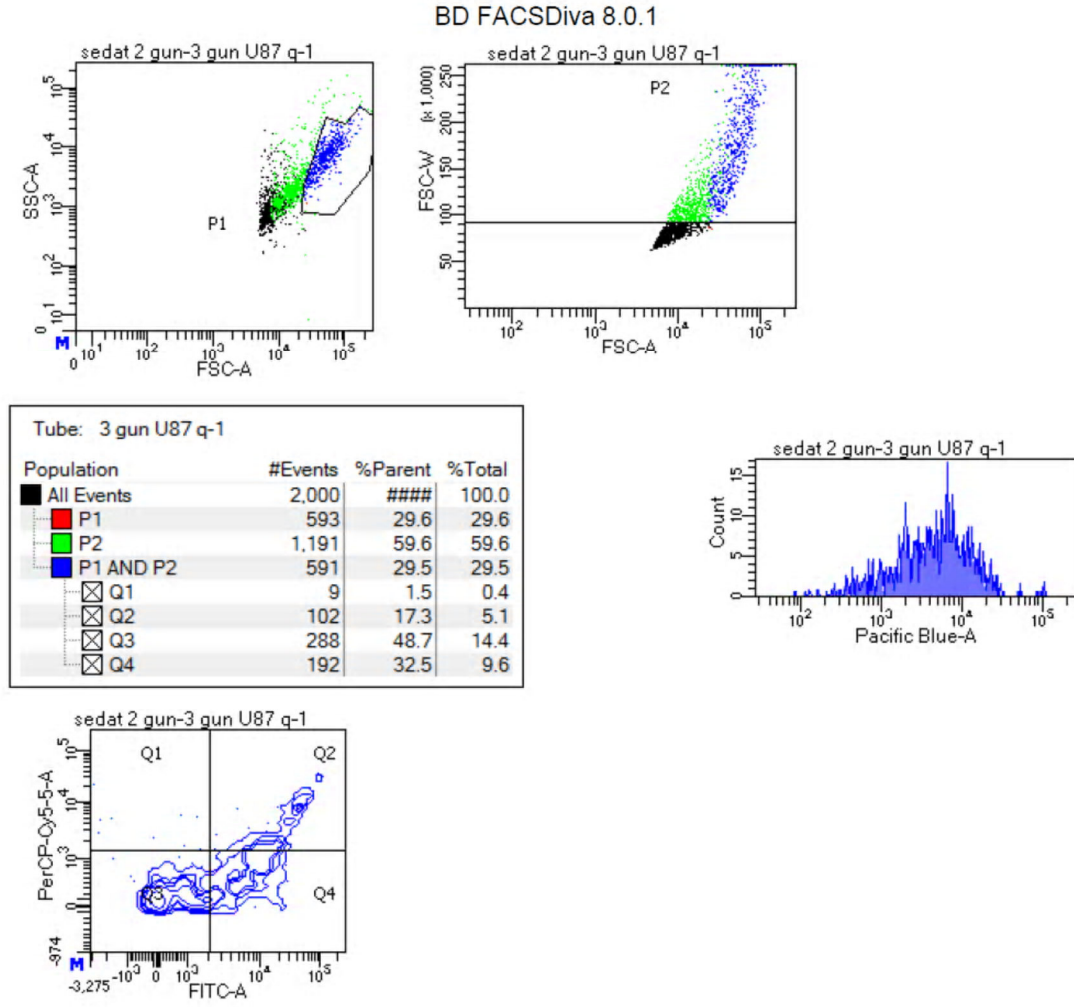
Şekil 20: U87 hücre hattı DMSO içeren kontrol grubu ile 72 saat sonra gerçekleştirilen akış sitometri analizi. Erken ve geç apoptoz oranları birbirine yakın ve toplam hücre canlılığı oranı %34,2 olarak bulundu.



Şekil 21: U87 hücre hattına 72 saat boyunca 24 saatte bir TMZ 50 μ M uygulandıktan sonra gerçekleştirilen akış sitometri analizi. Erken ve geç apoptoz oranları %10 - %14,2 ve toplam hücre canlılığı %19,2 olarak gözlemlendi.



Şekil 22: U87 hücre hattına 72 saat boyunca 24 saatte bir TMZ 50 μ M ve kersetin 25 μ M birlikte uygulandıktan sonra gerçekleştirilen akış sitometri analizi. Erken ve geç apoptoz oranları %9,7 – %7,2 ve hücre canlılığı oranı %12,2 olarak bulundu.



Şekil 23: U87 hücre hattına 72 saat boyunca 24 saatte bir kersetin $25 \mu\text{M}$ uygulandıktan sonra gerçekleştirilen akış sitometri analizi. Erken apoptoz oranı %9,6 geç apoptoz oranı %5,1 ve toplam hücre canlılığı oranı ise %14,4 olarak bulundu.

4.4.RT-PCR

U87 ve T98G hücre hatlarına 120 saat boyunca 24 saatte bir TMZ ve kersetinin tek başına ve birlikte uygulamaları gerçekleştirildi. 120 saat sonunda hücrelerin RNA'ları izole edilerek MGMT, Bcl-2, ERCC2, EGFR ve LRP-1 gen ekspresyon seviyeleri ölçüldü. Kontrol olarak GAPDH kullanıldı ve GAPDH ekspresyonuna göre artmış veya azalmış ekspresyon seviyeleri değerlendirildi.

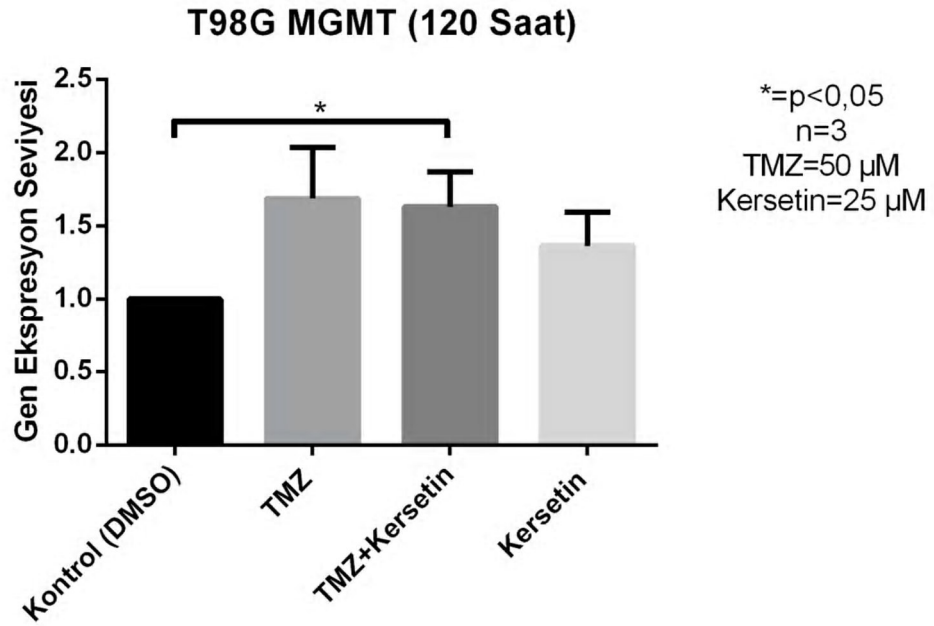
T98G hücre hattına 120 saat boyunca 24 saatte bir TMZ 50 μ M ve kersetin 25 μ M tek başına ve birlikte uygulamaları gerçekleştirildi. Sonrasında her grubun gen ekspresyon seviyeleri ölçüldü ve kontrole göre hesaplandı.

MGMT için, TMZ-1,68, TQ-1,63, Q-1,36; Bcl-2 için, TMZ-4,71, TQ-3,67, Q-1,54; ERCC2 için, TMZ-2,30 TQ-1,87, Q-1,30; EGFR için, TMZ-2,16, TQ-1,97, Q-1,43; LRP-1 için, TMZ-3,48, TQ-2,77, Q-2,48 olarak bulundu (Şekil 24-28). ERCC2 ekspresyon seviyesi ölçümünde TMZ ve kersetin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur.

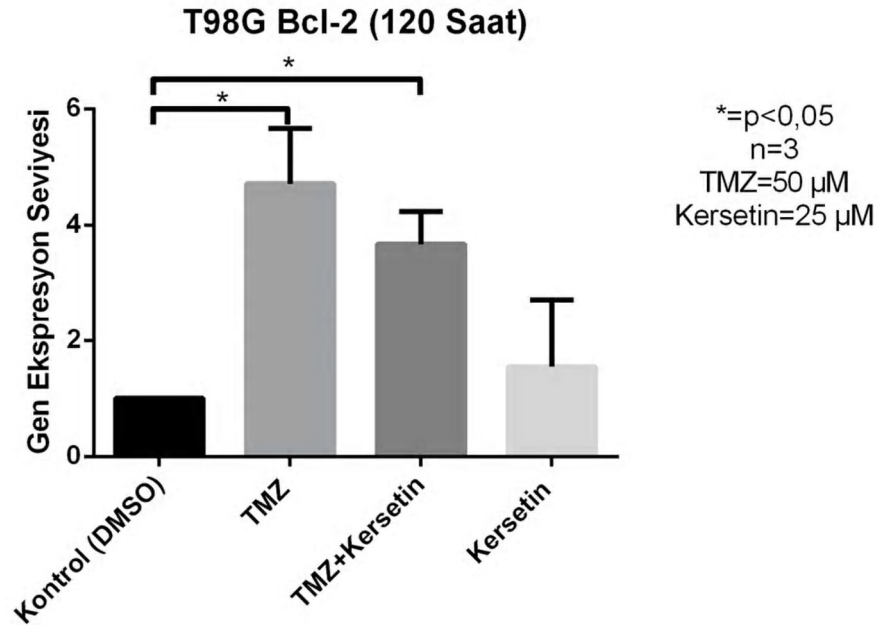
U87 hücre hattına 120 saat boyunca 24 saatte bir TMZ 50 μ M ve kersetin 25 μ M tek başına ve birlikte uygulamaları gerçekleştirildi. Sonrasında gen ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre ölçüldü ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

Bcl-2 için, TMZ-1,13, TQ-2,75, Q-1,73; ERCC2 için, TMZ-1,88, TQ-1,36, Q-0,11; EGFR için, TMZ-1,28, TQ-2,52, Q-1,51; LRP-1 için, TMZ-1,40, TQ-2,73, Q-2,17 kat gen ekspresyon seviyesi bulunmuştur (Şekil 29-32). TMZ+Kersetin grubu, EGFR ekspresyon seviyesi için hem TMZ hem de kersetin grubuna, LRP-1 ekspresyon seviyesi için ise TMZ grubuna karşı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca TMZ+Kersetin grubu Bcl-2 ekspresyon seviyesi ölçümünde TMZ grubuna, ERCC2 ekspresyon seviyesi için ise kersetin grubuna karşı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

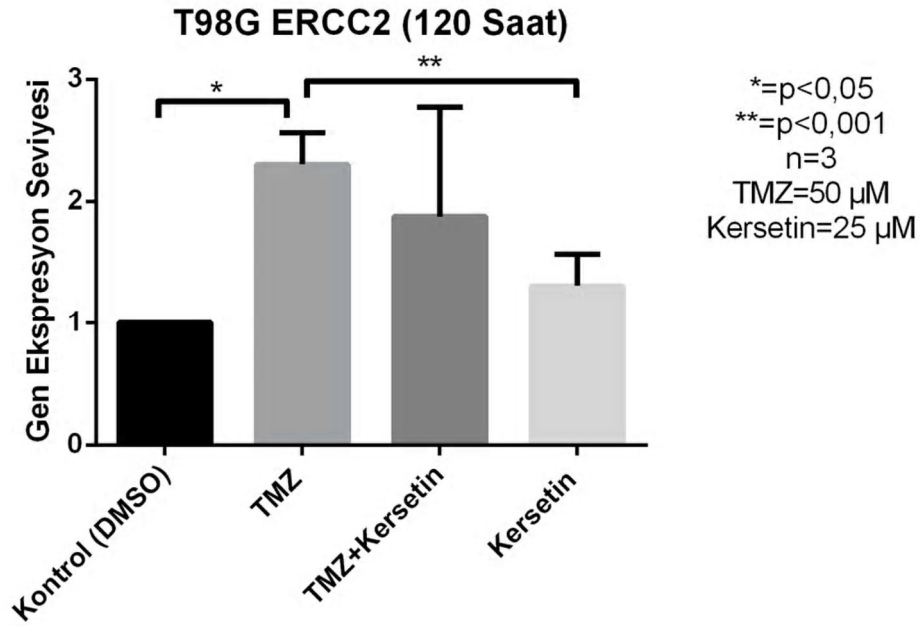
U87 hücre hattında MGMT ekspresyonu belirlenemedi ancak dirençli olan T98G hücre hattında MGMT ekspresyonu gözlemlendi.



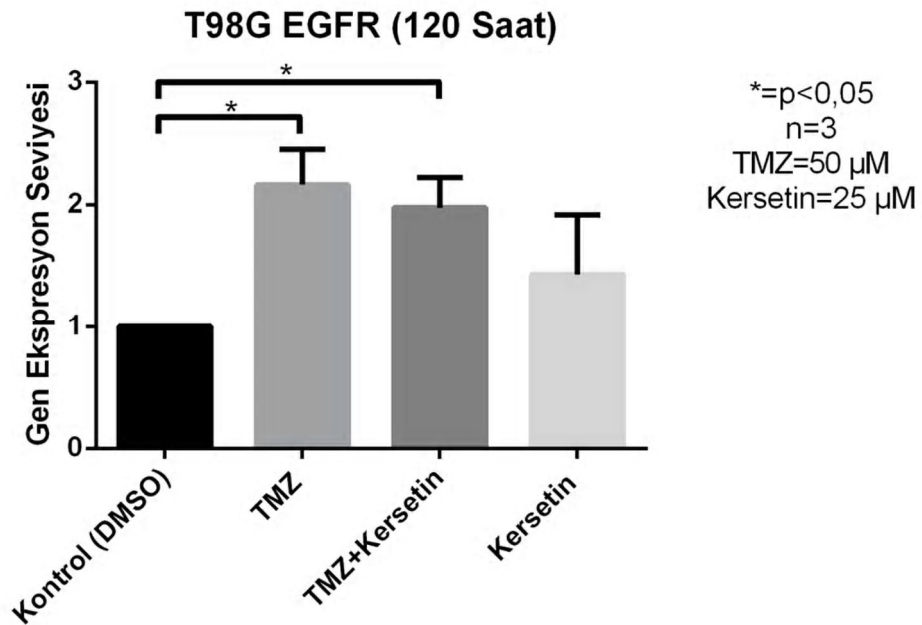
Şekil 24: T98G dirençli glioblastoma hücre hattında 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulanan TMZ 50 μ M ve/veya kerstin 25 μ M sonrası elde edilen MGMT ekspresyon seviyeleri (n=3).



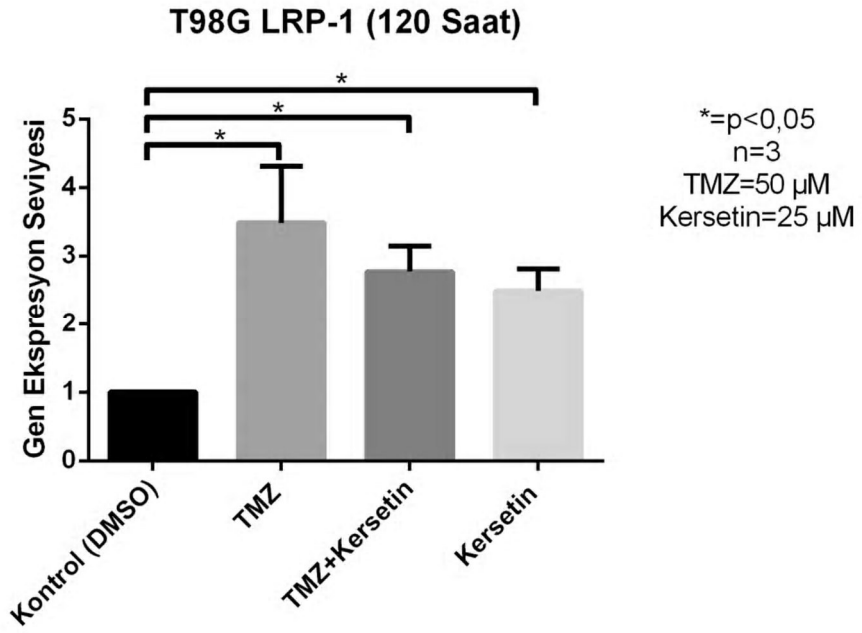
Şekil 25: T98G dirençli glioblastoma hücre hattında 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulanan TMZ 50 μ M ve/veya kerstin 25 μ M sonrası elde edilen Bcl-2 ekspresyon seviyeleri (n=3).



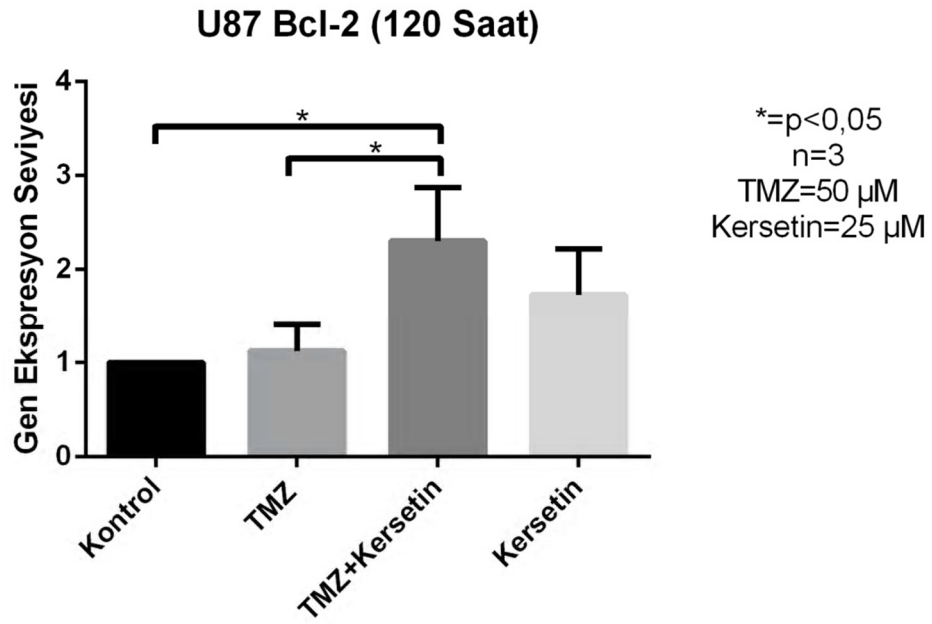
Şekil 26: T98G dirençli glioblastoma hücre hattında 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulanan TMZ 50 µM ve/veya kerisetin 25 µM sonrası elde edilen ERCC2 ekspresyon seviyeleri (n=3).



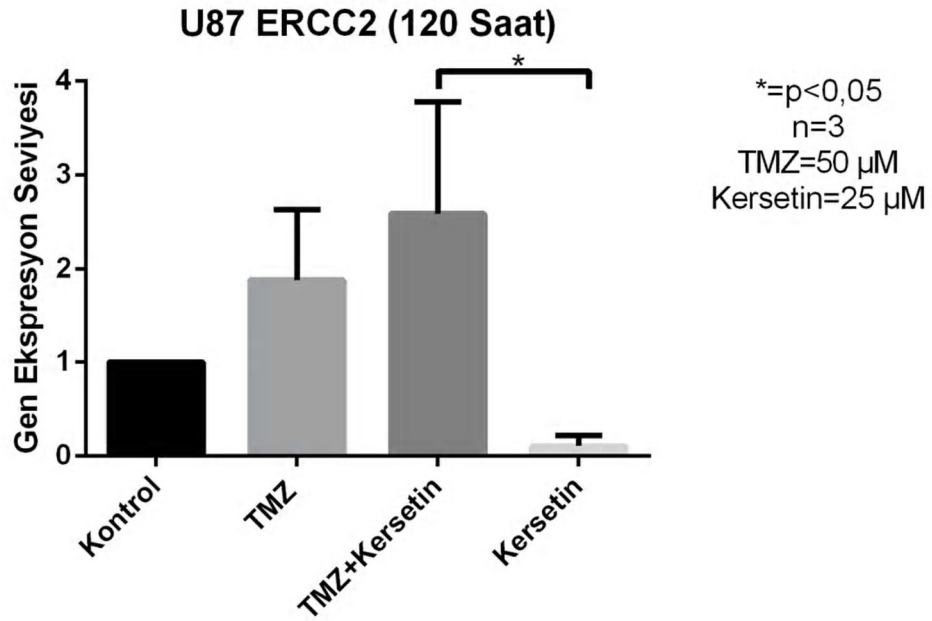
Şekil 27: T98G dirençli glioblastoma hücre hattında 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulanan TMZ 50 µM ve/veya kerisetin 25 µM sonrası elde edilen EGFR ekspresyon seviyeleri (n=3).



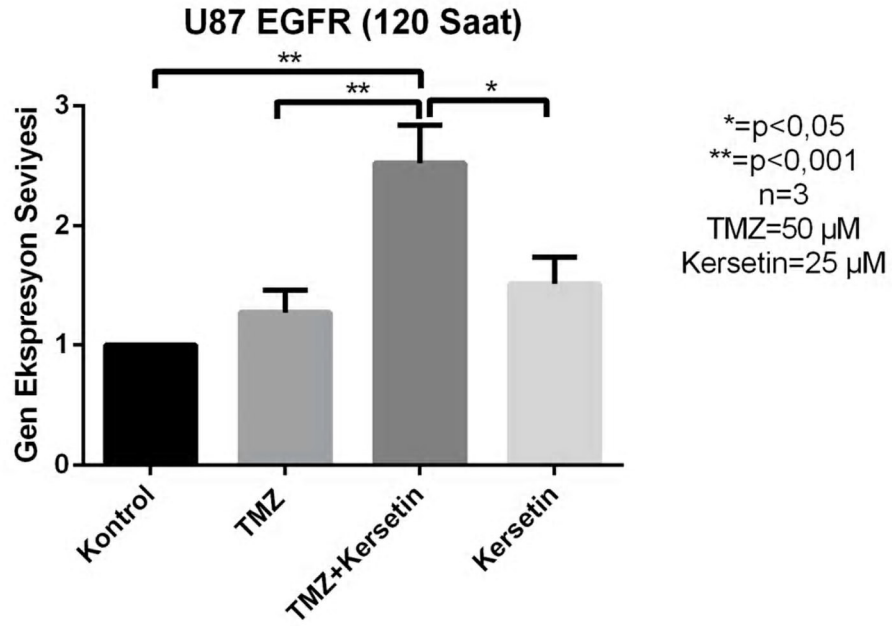
Şekil 28: T98G dirençli glioblastoma hücre hattında 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulanan TMZ 50 µM ve/veya kerisetin 25 µM sonrası elde edilen LRP-1 ekspresyon seviyeleri (n=3).



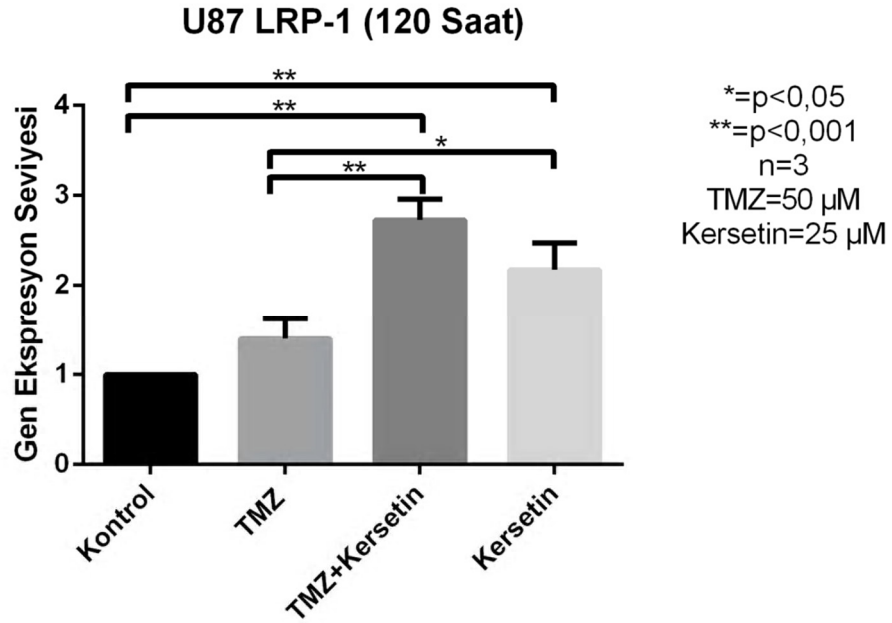
Şekil 29: U87 duyarlı glioblastoma hücre hattında 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulanan TMZ 50 µM ve/veya kersetin 25 µM sonrası elde edilen Bcl-2 ekspresyon seviyeleri (n=3).



Şekil 30: U87 duyarlı glioblastoma hücre hattında 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulanan TMZ 50 µM ve/veya kersetin 25 µM sonrası elde edilen ERCC2 ekspresyon seviyeleri (n=3).



Şekil 31: U87 duyarlı glioblastoma hücre hattında 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulanan TMZ 50 µM ve/veya kersetin 25 µM sonrası elde edilen EGFR ekspresyon seviyeleri (n=3).



Şekil 32: U87 duyarlı glioblastoma hücre hattında 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulanan TMZ 50 µM ve/veya kersetin 25 µM sonrası elde edilen LRP-1 ekspresyon seviyeleri (n=3).

Sonuç olarak TMZ duyarlı U87 hücre hattında temel direnç mekanizmalarında aktif olan MGMT gen ekspresyonu gözlenmemiştir. Dirençli T98G hücre hattında ise MGMT ekspresyon saptanmış ve gen ekspresyonu seviyesi TMZ içeren gruplarda daha yüksek bulunmuştur. MGMT gen ekspresyonu dirençli hücrelerde yüksek bulunması beklenmekte idi ve bu doğrultuda T98G hücre hattında yüksek bulunup U87 hücre hattında bulunamamıştır. Diğer ölçülen tüm direnç genlerinin ekspresyon seviyeleri her iki hücre hattında TMZ ve TMZ+kersetin gruplarında kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu.

TMZ'ye duyarlı U87 hücre hattında ölçülen direnç genleri, TMZ grubunda daha düşük ekspresyon seviyesine sahip bulundu. Ancak TMZ'nin kersetin ile birlikte kullanıldığı gruplarda daha yüksek gen ekspresyon seviyesi ölçüldü.

RT-PCR analizinin bu çalışmadaki amacı dirençli T98G hücre hattında kersetinin direnç genlerinin ekspresyon seviyesindeki neden olacağı değişikliğin incelenmesidir. Analizlerde kersetin tek başına uygulandığında direnç genlerinde kontrol grubuna göre daha yüksek ekspresyon seviyesi gözlemlendi. TMZ'nin tek başına uygulandığı T98G hücre hattında artmış olan direnç genlerindeki ekspresyon seviyeleri kersetin eklendiğinde daha düşük bulundu.

5.TARTIşMA VE SONUÇ

Günümüzde kansere yakalanma sıklığı ve buna bağlı olarak da kanser araştırmaları ve önemi giderek artmaktadır. Kanser türü ve evresine göre yeni ilaçlar geliştirilmekte ve ilaç direncini kırmak veya azaltmak çalışmaların odak noktası halindedir. Bu çalışmaların başarıya ulaşması moleküler düzeyde iyi çözümlemeye ve hedef moleküllerin belirlenmesi ile alakalıdır (Bozkurt, 2013). Bu zamana kadar GBM tedavisi için asıl problem TMZ direncidir ve bu da DNA alkilasyon proteinleri ve DNA tamir enzimlerinin seviyelerinin farklılığından kaynaklanır (Lee, 2016). İlaç etkinliklerini artırmak ve ilaca karşı direncin azaltılması için doğal ürünler ile kombine kullanılmaya başlanmıştır (Wang et al., 2014, Terlikowska et al., 2014). Kersetin de antikanserojenik etkinliğini çok farklı mekanizmalar üzerinden gerçekleştirmektedir (Liu et al., 2015, Chien et al., 2009, Riccio et al., 2019, Lugli et al., 2005, Wei et al., 2008, Hashemzaei et al., 2017). Bu çalışmamızda da TMZ ile kersetinin birlikte kullanımlarının ilaç direncine etkisi incelenmiştir.

İlaç direncine etki eden çok sayıda mekanizma bulunmaktadır. p53 gen mutasyonuna duyarsız veya MGMT üretmeden TMZ'ye karşı direnci olan GBM hücreleri veya hücre hatları olduğu gösterilmiştir (Bocangel et al., 2002, Lee et al., 2011). Dirençli GBM hücrelerinde olan ve en fazla görülen ilaç direnç mekanizmalarına ait protein veya enzimlerin gen ifadeleri tercih edilmiştir. LRP, MGMT, ERCC2, EGFR ve Bcl-2 genleri tercih edilip dirençli hücre davranışı ile ilgili genlerin yanında GBM'nin en temel direnç mekanizması olan MGMT ile TMZ'nin tümör hücresi DNA'sında yaptığı alkilemeyi tamir ederek dirence yol açan MGMT geni de dahil edilmiştir (Lu and Shervington, 2008, Sasaki et al., 2002).

T98G ve U87 hücre hatlarında kersetin ile yapılan 24 saatlik MTT hücre canlılık testinde tek başına ve özellikle de TMZ ile birlikte kullanım için en uygun konsantrasyonun bulunması amaçlanmıştır. Bu testte dirençli T98G ve duyarlı U87 hücre hatlarının ikisinde de 25 μ M, 50 μ M ve 100 μ M kersetin ile konsantrasyona bağımlı olarak hücre ölümünün arttığı gözlemlendi (Şekil 6-7). Benzer hücre ölümü oranı, kersetin uygulaması sonrası hücre ölümünün dirençli T98G ve duyarlı U87 hücre hatlarının benzer mekanizma ve direnç mekanizmalarından farklı bir mekanizma üzerinden yürüdüğünü göstermiştir. Kaynaklarda kersetinin etkisini, Hsp27 proteini inhibisyonu yaparak, JAK/STAT yoluyla inhibisyonu yaparak, siklin B seviyesini artırarak hücre siklusunu G2/M fazında durdurarak, hücre içi sitozolik kalsiyumu artırarak ve mitokondriyal membran potansiyelini artırarak, kaspaz 3 enzimini aktive ederek, siklin D1 ve survivin seviyesini azaltarak, p38 aktivasyonu yaparak, selüler mikrotübülleri bağlayarak, TNF ile ilişkili apoptozu tetikleyici ligand aracılığıyla gösterdiği belirtilmektedir (Senggunprai et al., 2014, Chien et al., 2009, Lee et al., 2010, Gupta and Panda, 2002, Jung et al., 2010). Bu farklı yollar üzerinden gerçekleşen hücre öldürücü etkiye T98G ve U87 hücrelerinin ölümünde aditif etki sağlayabileceği muhtemeldir.

Kersetin ile yapılan 24 saatlik MTT canlılık testi sonrasında deneylerde 25 μ M konsantrasyonun seçilmesindeki dayanak, sitotoksik etkinin en az görüldüğü konsantrasyon olması ve klinikteki rutin GBM tedavisinde TMZ'nin 120 saat boyunca 24 saatte bir uygulama ile yapılıyor olması ve bizim çalışmamızın protokolünde de bu şekilde uygulanacak olmasıdır (Middleton et al., 2000). Çünkü 120 saat boyunca seri TMZ ve kersetin uygulaması ile hücre canlılığının tamamen sonlanması istenmemiştir. Kalan hücrelerde ilaç direnç mekanizmalarında rol oynayan belirlediğimiz genlerin ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi amaçlanmıştır.

T98G ve U87 hücre hatlarında kersetin ile 0-100 μ M'a kadar değişen 4 farklı grupta yapılan 24 saatlik MTT hücre canlılığı testinde konsantrasyona bağımlı olarak azalma gözlemlenmiştir. Kersetin TMZ'in aksine dengeli profil göstermiştir. Kersetinin antikanserojenik özelliğinin olduğu bilinmekte ve çalışmalarımızda kersetinin 25 μ M konsantrasyonunun çok fazla sitotoksik etkisinin olmadığı görülmüştür. Bu konsantrasyonda TMZ'in antikanserojenik etkisini güçlendirip güçlendirmedikini görmeyen ve dirençli olan T98G hücre hattında direnci kırıcı etkilerinin araştırılmasının

uygun olduğunu düşündüğümüz için bu konsantrasyon uygun bulunmuştur. Benzer TMZ ve kersetin kombinasyon uygulama deneyinde TMZ ile aditif etkisi için 30 μ M kersetin kullanılmıştır (Sang et al., 2014).

Bununla birlikte U87 ile yapılan MTT hücre canlılık testinde TMZ'nin varlığında konsantrasyona bağımlı olarak canlılığın azaldığını söylemek güç olsa da T98G hücre hattında olduğu gibi canlılıkta 25 μ M'da azalma gözlenmiştir. Yayımlanan daha önceki çalışmalar da tutarlı IC₅₀ sonucu alınamadığını göstermiştir. 7-204 μ M'a kadar değişen konsantrasyonlarda olan U87 için IC₅₀ değeri, gerek TMZ dirençli, gerekse duyarlı GBM hücre hatlarının ne kadar değişken davranış ve cevaplara sahip olduğunu göstermektedir (Auger et al., 2006, Zhang et al., 2010).

TMZ 50 μ M, Kersetin 25 μ M ve TMZ 50 μ M+Kersetin 25 μ M konsantrasyonları ile yapılan ve 5 günlük MTT testinde U87 ve T98G hücre hatları TMZ ve kersetin monoterapilerinde sınırlı hücre ölümü sağlamışlardır. Ancak kombine tedavilerde her iki hücre hattında da daha fazla hücre ölümü gerçekleşmiştir. U87'de TMZ ile %91 olan hücre canlılığı TMZ+kersetin ile %43'e; T98G için ise %90'dan %61'e inmiştir. Kombine uygulamada hücre ölümünün artması kersetinin farklı mekanizmalar üzerinden hücre ölümüne ve TMZ'nin antikanserojenik etkisine katkı sağladığı muhtemeldir. Çünkü kersetinin JAK/STAT kaskadını baskıladığını, G2/M fazını durdurarak hücre ölümüne neden olduğunu, Hsp27 üzerinden apoptozu tetiklediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Sang et al., 2014, Senggunprai et al., 2014, Wang et al., 2013). T98G dirençli hücre olması sebebiyle TMZ ve kersetin ile U87'e göre daha düşük hücre ölümü oranına sahiptir denilebilir.

120 saatlik TMZ ile yapılan hücre canlılık testinde yine hücre canlılığını her iki hücre hattında da kısmi olarak azaltan ortak konsantrasyonun 50 μ M olduğuna karar verildi (Şekil 8-9). Bu canlılık testinde dirençli T98G hücre hattındaki gruplarda daha fazla hücre ölümü beklenirken U87 hücre hattında daha fazla görüldü. Xcelligence ile gerçek zamanlı hücre analizinde 24 saatte bir olmak üzere 3 defa 50 μ M konsantrasyonda TMZ uygulaması yapıldı ve 120 saat takip edildi ancak duyarlı U87 hücre hattı beklenildiği gibi TMZ'e daha iyi yanıt vererek hücre ölümü daha fazla olduğu görüldü (Şekil 14-15). Hücre ölümünün U87 hücre hattında daha az olması TMZ'ye karşı direnç geliştiğini düşündürdü. Çünkü adapte TMZ direnci hem oluşturulmuş GBM hücreleri hem de insan beyin primer tümörleri için TMZ ile 72 saatten 6 aya kadar farklı zamanlarda

oluşabilmektedir (Ujifuku et al., 2010, Happold et al., 2012, Kohsaka et al., 2012, St-Coeur et al., 2015). GBM hücre yada hücre hatlarında TMZ kullanım zamanının uzamasıyla direnç gelişme olasılığının artışı düşünülebilir.

5 günlük TMZ ile T98G ve U87 hücre hatlarında yapılan MTT’de konsantrasyona tam bağımlılık gözlenmemiştir ancak konsantrasyon arttıkça değişen oranlarda hücre canlılığında azalma olmuştur. Geometrik artış ile yapılan konsantrasyon artırımında beklenildiği gibi 400 μ M’da en fazla hücre ölümü gerçekleşmiştir. Duyarlı olan U87 hücre hattında hücre ölümünün daha fazla olması beklenirken daha az gerçekleşmiştir. Bu çalışmanın xCelligence bölümünde de benzer şekilde kersetin tekli uygulamada hücre ölümünü artırmadığı da gözlenmiştir. Klinik uygulamalarda 72 saatten sonra direncin oluşabileceğini, ortalama üçüncü kürden sonra TMZ’e karşı direncin olduğu çalışmalarda bulunmuştur (Ujifuku et al., 2010, Happold et al., 2012, Kohsaka et al., 2012, St-Coeur et al., 2015). 5 günlük uygulama ile hücrelerin dirençli hale gelerek hücre ölümünün azaldığı düşünülmüştür. Çalışmamıza benzer bir çalışmada da gerçek zamanlı hücre canlılığı takibi ile U87 hücre hattı izlenirken 50 μ M’a kadar hücre ölümü yerine canlılığın arttığı ve 50 μ M’dan sonra ise hücre ölümünün konsantrasyona bağlı arttığı bulunmuştur (Dikmen, 2017).

xCelligence ile gerçek zamanlı hücre analizinde T98G için kontrolden 20.000 hücre/kuyucuğa kadar ve U87 için ise kontrolden 40.000 hücre/kuyucuğa kadar değişen hücre sayısında hücre hatlarından ekilerek zaman içinde (70 saat) çoğalma eğrileri incelendi. Bu hücrelerde gerçek zamanlı hücre analizi ile elde edilen hücre çoğalma eğrileri ilk kez bu çalışma ile gösterilmiş olup, tezin özgün yönlerinden birini oluşturmaktadır. T98G daha stabil çoğalan ve hücre indeksi grafiği doğrusal eğriye yakın iken U87 ekimin ilk saatlerinde hızlı çoğalan ve sonra platoya benzer eğri ile çoğalmaya devam eden hücre indeks eğrisi çizdiği görülmektedir (Şekil 12-13). U87 hücre hattı daha kararsız çoğalan ve hücre sayılarıyla değişen çoğalma hızına sahiptir. Bu da deneylerde beklenmeyen sonuçlar ortaya çıkarabilir. Kontrol grubu için kullanılan çalışmalarda zorluklar oluşturabilir. Bu şekilde dizayn edilen çalışmalarda başka U87 yerine U251 gibi başka hücre hatları tercih edilebilir.

xCelligence ile hücre canlılığı takibinde U87 ve T98G hücre hatlarına uygulanan kersetinden 24 saat sonra başlanan ve 3 gün süreyle günlük TMZ ve kersetin mono ve kombine tedavilerinde kontrol grupları çoğalmaya devam ettiği görülmüştür.

TMZ+kersetin kombine tedavisi 120 saat sonunda T98G’de sitostatik, U87’de ise sitotoksik etki göstermiştir. U87’nin TMZ’ye duyarlılığının artması ve aynı zamanda kersetinin antikanserojen etkisi sebebiyle hücre ölümü daha fazla olmuş olabilir. Bir çalışmada kersetin ile Hsp27 etkinliğinin arttığı ve kersetinin U87 duyarlılığını da artırdığı gösterilmiştir (Sang et al., 2014). Yapılan 3 günlük akış sitometri analizinde de duyarlı olan U87 hücre hattı daha kısa zamanda erken ve geç apoptoz oranlarında yüksek sonuçlar vermiştir (Şekil 11). Bu sonuçla kersetinin U87 hücrelerindeki duyarlılığını artırdığını göstermektedir. Dirençli T98G hücre hattında ise daha uzun sürede programlı hücre ölümüne gitmesi de beklendiği gibi gerçekleşmiştir. Ancak TMZ ve kersetin kombine uygulaması TMZ tekli uygulamaya göre daha yüksek erken ve geç apoptoz oranlarını vermiştir. Kersetinin dirençli T98G hücre hattında apoptozu artırdığını ve TMZ’nin etkisini duyarlı U87’de olduğu kadar olmasa da artırdığını söylemek mümkündür (Şekil 33-34).

T98G ve U87 hücre hatlarına 72 saat boyunca 24 saatte bir TMZ 50 μ M, kersetin 25 μ M ve TMZ 50 μ M+kersetin 25 μ M uygulanarak akış sitometrisi analizi yapıldı. T98G hücre hattında erken ve geç apoptoz oranları kontrol grubuna yakın bulundu. Ancak gruplar arasındaki hücre canlılığı farkı bariz bulundu. Hücre canlılığı kontrol grubunda %80,7 iken TMZ grubunda %61,4 düzeylerinde idi (Şekil 16-17). T98G dirençli hücre hattı olmasına rağmen TMZ’ye kısmi yanıt vererek hücrelerde ölümüne neden oldu. Kersetin grubunda %49,2 ve TMZ+kersetin grubunda %25,4 hücre canlılığı bulundu (Şekil 18-19) ve bu sonuçlar da tek başına TMZ uygulamasının kısmi yanıt oluşturduğu kanaatini doğurdu. Kersetinin TMZ ile birlikte kullanımı daha fazla hücre ölümüne neden olurken TMZ’nin sitotoksik etkisine kersetinin aditif etki ile (proapoptotik ve antiproliferatif etkisi) katkı sağladığı söylenebilir (Gibellini et al., 2011). Kersetinin antikanserojenik etkinliği ve muhtemelen hücre hatlarının TMZ’ye duyarlılığını artırması sonucu T98G hücre hattında TMZ tekli uygulamaya göre daha fazla apoptoza giden hücre olmuştur (Gibellini et al., 2011, Hashemzaei et al., 2017). Xcelligence ile gerçek zamanlı hücre analizinde T98G hücre hattında yapılan TMZ 50 μ M+kersetin 25 μ M uygulaması hücrelerin ölümüne neden oldu. 3. uygulamadan sonra hücre ölümleri benzer ve bu yüzden TMZ+kersetin uygulamasının TMZ uygulamasından daha üstün olduğu bu analizde söylenemedi. Akış sitometri analizinde apoptoza giden hücre sayısı çok artması ve analiz edilebilecek sınırların altına inmesi nedeni ile 72 saatten sonra deneye devam edilemedi. Özellikle bu ölüm TMZ duyarlı U87 hücrelerinde daha

belirgindi. TMZ ve kersetin uygulamaları 120 saat olarak devam edilebilseydi hücre ölümlerinin artışı ve kersetin ile TMZ+kersetin gruplarının grafikte ayrışması görülebilirdi.

U87 hücre hattında yapılan akış sitometrisi analizinde erken ve geç apoptoz oranları sırayla TMZ grubunda %10 - %14,2 ve kersetin grubunda %9,6 - %5,1 olarak bulundu. 24 saatte bir 3 uygulama sonrası TMZ grubunda geç apoptozun, kersetin grubunda ise erken apoptozun etkin olduğu söylenebilir. TMZ+kersetin grubunda %9,7 - %7,2 olan erken ve geç apoptoz oranları olmasına rağmen en düşük hücre canlılığına (%12,2) sahip bulundu. U87 hücre hattında yapılan akış sitometrisi analizinde tüm gruplarda (kontrol, TMZ, TMZ+kersetin, kersetin grupları) hücre canlılığı oranları T98G hücre hattı gruplarına göre ciddi oranda düşük bulundu (Şekil 20-23). Bunun muhtemel sebebi U87 hücre hattının dirençli olmamasıdır. U87 hücre hattında da kersetin hücre ölümlerine katkı sağladı ve TMZ'nin tek başına uygulandığı gruptan daha fazla hücre ölümüne neden oldu. Kersetinin antikanserojenik etkinliği ve muhtemelen hücre hatlarının TMZ'ye duyarlılığını artırdığı için T98G hücre hattında TMZ tekli uygulamaya göre daha fazla apoptoza giden hücre olmuştur (Gibellini et al., 2011, Hashemzaei et al., 2017). En fazla hücre ölümü TMZ ile kersetinin birlikte uygulandığı grupta görüldü. Gerçek zamanlı hücre analizinde de uyumlu sonuçlar görüldü. Bu sonuçlar, farklı mekanizmalar ile etki gösteren iki ayrı molekülün apoptoz ve hücre ölümü üzerine etkilerinin aditif olduğunu göstermektedir.

120 saatlik 24 saatte bir TMZ 50 μ M, kersetin 25 μ M ve birlikte uygulamaları sonrası gen ekspresyon seviyeleri değerlendirildi. MGMT geni sadece T98G hücre hattında bulundu ki sadece dirençli hücre hatlarında olması beklenmekte idi. TMZ ve TMZ+kersetin grubunda yaklaşık 1,5 kat daha fazla bulundu (Şekil 24). MGMT gen ekspresyonunun artması, dirençli GBM hücreleri için en temel direnç mekanizmalarından biri olarak kabul edilmektedir (Lee, 2016). TMZ ile MGMT gen ifadesinin artması da olağan ancak kersetin grubunda da kontrol grubundan daha fazla artış bulundu. Kersetin etki mekanizmasını DNA'da metilleme ile yapmadığı halde MGMT geninin artışı anlamlı bulunmadı. Konu ile ilgili kaynaklarda herhangi bir bilgiye de rastlanamadı. TMZ+kersetin grubu kontrol grubuna göre anlamlı ancak MGMT ekspresyon seviyesi TMZ grubuna yakın bulundu. MGMT ekspresyon seviyesindeki azalma çok cüzi kalsa da hücre ölümünün hem MTT hücre canlılığı

analizinde hem de akış sitometrisinde artışının gösterilmesi MGMT üzerinden direnç kırılmasa bile hücre ölümünün başka yollarla gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 11 ve Şekil 18). Zaten kersetinin etki mekanizmasını farklı yollardan gerçekleştirdiği bilinmektedir (Gibellini et al., 2011).

Bcl-2, ERCC2, EGFR, LRP-1 ekspresyon seviyeleri birlikte değerlendirildiğinde tüm bu gen analizlerinde TMZ+kersetin grubu her durumda TMZ grubuna göre daha az gen ekspresyonu seviyesine sahiptir (Şekil 25-28). Ancak U87 hücre hattı, bunun tam tersine TMZ+kersetin ve kersetin gruplarında TMZ grubuna göre daha fazla Bcl-2, ERCC2, EGFR, LRP-1 ekspresyon seviyesine sahiptir (Şekil 29-32). Bu sonuç da duyarlı U87 hücre hattında bu direnç genlerinin kersetin ile aktivasyonunu düşündürdü. Bu sebeple T98G hücre hattında mevcut olan TMZ direncinin farklı mekanizmalar ile desteklenerek kırılması mümkün olabilir (Lee, 2016). Birçok antikanserojenik etkisi olan ilaç ile birlikte kullanıldığında kersetin sinerjik etki göstererek ilaçların etkisini artırabilmektedir (Kashyap et al., 2019). T98G PCR analizinde anlamlı bulunan genlerin yanı sıra bu çalışmada ölçemediğimiz başka mekanizmalar üzerinden de kersetin etki göstermiş olabilir. p53 geni inhibisyonu, protein kinaz C aktivasyonu, VEGF downregülasyonu gibi etkileri ile de TMZ'nin etkisine katkı sağlamış olabilir (Sahpazidou et al., 2014, Stagos et al., 2014, Hsu and Yen, 2008). Kersetinin EGFR üzerinden etkisi de bilinmektedir (Bommu et al., 2017). Ayrıca Hsp, p53, protein kinaz C gibi farklı yollar üzerinden etki göstererek apoptoza götürdüğü çalışmalarda gösterilmiştir (Sang et al., 2014, Gibellini et al., 2011).

5 günlük PCR sonuçlarına göre T98G hücre hattında MGMT gen ekspresyonunda TMZ gruplarında belirgin artış olmuştur. TMZ ile TMZ+Kersetin arasında anlamlı fark yoktur. TMZ'nin kersetin ile tüm kombinasyonlarının, TMZ tekli uygulamaya göre daha fazla hücre ölümüne neden olduğu sonucu altında değerlendirildiğinde; kersetinin T98G'nin TMZ direncine neden olan temel mekanizmadan farklı olarak etki gösterdiğini ve TMZ'ye duyarlılığını artırdığını doğrular niteliktedir. Yapılan çalışmalar kersetinin p53, kaspaz 3, Hsp27, protein kinaz C, JAK/STAT yolağı gibi farklı yollara yönlendirmektedir (Senggunprai et al., 2014, Bishayee et al., 2013, Badziul et al., 2014) TMZ'nin GBM için tek ajan olarak kullanımında MGMT çok önemli yere sahiptir; ancak tedavi başka yollarla desteklendiğinde daha iyi sonuçlar elde edilmektedir (Hashemzaei et al., 2017). Bcl-2 ve EGFR gen ölçümlerinde TMZ'ye göre

azalma gösteren TMZ+kersetin bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da numerik olarak farklılık oluşturmuşlardır. Hücre ölümü ile ilgili Bcl-2 ve EGFR/VEGFR2 azaltarak apoptozun tetiklendiği bilinmektedir (Kashyap et al., 2019). Kersetin tekli ve TMZ ile kombine uygulaması ile azalan Bcl-2 ve yine büyüme faktör reseptörü EGFR apoptoza ve dolayısıyla da TMZ'nin antikanserojenik özelliğine destek olduğu söylenebilir.

Kersetin kolon ve meme kanserinde PI3K/Akt/mTOR yolağını bloke ederek hücre yaşamını sonlanmasını sağlar. NF- κ B yolağını bloke ederek karaciğer ve kolon kanserinde proliferatif etkisini gösteren çalışmalar mevcuttur. JAK/STAT yolağının aktivasyonu ve IL6/STAT yolağının inhibisyonu gösterilmiştir (Kashyap et al., 2019).

Son zamanlarda bitkisel kaynaklı ürünler için farklı formülasyonlar artmakta ve nano kapsüller, lipozomlar, prolipozomlar, katı lipid nanopartiküller, nanoemülsiyonlar gibi formülasyonlar kullanılmaktadır. Bu farklı formülasyonlar ilacın farmakolojik etkiliğini artırmak, toksisitesini azaltmak, stabilitesini iyileştirmek, çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını artırmak, fiziksel ve kimyasal etkilerden korumak için tercih edilmektedir. Özellikle de hedeflenen bölgeye yüksek konsatrasyonda ilaç ulaşmasının istendiği durumlarda kullanılabilir (Yadav et al., 2011). Doğal bileşik olan kersetin ve/veya TMZ nanoformülasyonlara dahil edilerek tekli ya da kombine olarak uygulanarak istenilen etki veya yan etkilerin azaltılması sağlanabilir.

Sonuç olarak kersetin antikanserojenik özelliğini çok farklı mekanizmalar üzerinden göstermektedir. GBM'de TMZ'ye karşı çok hızlı gelişen ilaç direncine rağmen kersetin TMZ ile birlikte uygulandığında kanser için faydalı olabilir. Bunun için daha fazla preklinik ve klinik çalışma ile desteklenmesine ihtiyaç vardır.

6.KAYNAKLAR

- McLendon, R., Friedman, A., Bigner, D., Van Meir, EG., Brat DJ. 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455, 1061-8.
- Agnihotri, S., Burrell, K. E., Wolf, A., Jalali, S., Hawkins, C., Rutka, J. T. & Zadeh, G. 2013. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 61, 25-41.
- Agnihotri, S., Gajadhar, A. S., Ternamian, C., Gorlia, T., Diefes, K. L., Mischel, P. S., Kelly, J., McGown, G., Thorncroft, M., Carlson, B. L., Sarkaria, J. N., Margison, G. P., Aldape, K., Hawkins, C., Hegi, M. & Guha, A. 2012. Alkylpurine-DNA-N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients. *J Clin Invest*, 122, 253-66.
- Aldape, K., Zadeh, G., Mansouri, S., Reifenberger, G. & Von Deimling, A. 2015. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol*, 129, 829-48.
- Alonso, M. M., Gomez-Manzano, C., Bekele, B. N., Yung, W. K. & Fueyo, J. 2007. Adenovirus-based strategies overcome temozolomide resistance by silencing the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter. *Cancer Res*, 67, 11499-504.
- Aronica, E., Gorter, J. A., Van Vliet, E. A., Spliet, W. G., Van Veelen, C. W., Van Rijen, P. C., Leenstra, S., Ramkema, M. D., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Sisodiya, S. M. & Troost, D. 2003. Overexpression of the human major vault protein in gangliogliomas. *Epilepsia*, 44, 1166-75.

- Atashpour, S., Fouladdel, S., Movahhed, T. K., Barzegar, E., Ghahremani, M. H., Ostad, S. N. & Azizi, E. 2015. Quercetin induces cell cycle arrest and apoptosis in CD133(+) cancer stem cells of human colorectal HT29 cancer cell line and enhances anticancer effects of doxorubicin. *Iranian journal of basic medical sciences*, 18, 635-643.
- Auger, N., Thillet, J., Wanherdrick, K., Idbaih, A., Legrier, M. E., Dutrillaux, B., Sanson, M. & Poupon, M. F. 2006. Genetic alterations associated with acquired temozolomide resistance in SNB-19, a human glioma cell line. *Mol Cancer Ther*, 5, 2182-92.
- Badziul, D., Jakubowicz-Gil, J., Langner, E., Rzeski, W., Glowinski, K. & Gawron, A. 2014. The effect of quercetin and imperatorin on programmed cell death induction in T98G cells in vitro. *Pharmacol Rep*, 66, 292-300.
- Berger, W., Spiegl-Kreinecker, S., Buchroithner, J., Elbling, L., Pirker, C., Fischer, J. & Micksche, M. 2001. Overexpression of the human major vault protein in astrocytic brain tumor cells. *Int J Cancer*, 94, 377-82.
- Bishayee, K., Ghosh, S., Mukherjee, A., Sadhukhan, R., Mondal, J. & Khuda-Bukhs, A. R. 2013. Quercetin induces cytochrome-c release and ROS accumulation to promote apoptosis and arrest the cell cycle in G2/M, in cervical carcinoma: signal cascade and drug-DNA interaction. *Cell Prolif*, 46, 153-63.
- Bocangel, D. B., Finkelstein, S., Schold, S. C., Bhakat, K. K., Mitra, S. & Kokkinnakis, D. M. 2002. Multifaceted resistance of gliomas to temozolomide. *Clin Cancer Res*, 8, 2725-34.
- Bommu, U. D., Konidala, K. K., Pabbaraju, N. & Yeguvapalli, S. 2017. Ligand-based virtual screening, molecular docking, QSAR and pharmacophore analysis of quercetin-associated potential novel analogs against epidermal growth factor receptor. *J Recept Signal Transduct Res*, 37, 600-610.
- Bondy, M. L., Scheurer, M. E., Malmer, B., Barnholtz-Sloan, J. S., Davis, F. G., Il'yasova, D., Kruchko, C., McCarthy, B. J., Rajaraman, P., Schwartzbaum, J. A., Sadetzki, S., Schlehofer, B., Tihan, T., Wiemels, J. L., Wrensch, M. & Buffler, P. A. 2008. Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer*, 113, 1953-68.

- Bozkurt, E. E. A. 2013. Glioblastoma tümörlerinde çoklu ilaç direnci. Genel Tıp Dergisi, 133-143.
- Bredel, M. & Zentner, J. 2002. Brain-tumour drug resistance: the bare essentials. Lancet Oncol, 3, 397-406.
- Butowski, N. A. 2015. Epidemiology and diagnosis of brain tumors. Continuum (Minneapolis), 21, 301-13.
- Chang, Y. F., Chi, C. W. & Wang, J. J. 2006. Reactive oxygen species production is involved in quercetin-induced apoptosis in human hepatoma cells. Nutr Cancer, 55, 201-9.
- Chen, Y. & Liu, L. 2012. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. Adv Drug Deliv Rev, 64, 640-65.
- Chen, Z. P., Malapetsa, A., Mcquillan, A., Marcantonio, D., Bello, V., Mohr, G., Remack, J., Brent, T. P. & Panasci, L. C. 1997. Evidence for nucleotide excision repair as a modifying factor of O6-methylguanine-DNA methyltransferase-mediated innate chloroethylnitrosourea resistance in human tumor cell lines. Mol Pharmacol, 52, 815-20.
- Chen, Z. P., Mcquillan, A., Mohr, G. & Panasci, L. C. 1998. Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency gene 2 expression and chloroethylnitrosourea resistance in human glioma cell lines. Neurosurgery, 42, 1112-9.
- Chien, S. Y., Wu, Y. C., Chung, J. G., Yang, J. S., Lu, H. F., Tsou, M. F., Wood, W. G., Kuo, S. J. & Chen, D. R. 2009. Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells. Hum Exp Toxicol, 28, 493-503.
- Cloughesy, T. F., Cavenee, W. K. & Mischel, P. S. 2014. Glioblastoma: from molecular pathology to targeted treatment. Annu Rev Pathol, 9, 1-25.
- Cohen, M. H., Johnson, J. R. & Pazdur, R. 2005. Food and Drug Administration Drug approval summary: temozolomide plus radiation therapy for the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme. Clin Cancer Res, 11, 6767-71.

- Costa, L. G., Garrick, J. M., Roque, P. J. & Pellacani, C. 2016. Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2986796.
- Dikmen, M. 2017. Aprepitantin İnsan Glioblastoma U87MG Hücreleri üzerinde Antiproliferatif ve Apoptotik Etkileri. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 156-164.
- Docampo, M., Olubu, A., Wang, X., Pasinetti, G. & Dixon, R. A. 2017. Glucuronidated Flavonoids in Neurological Protection: Structural Analysis and Approaches for Chemical and Biological Synthesis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65, 7607-7623.
- Dora, T. & Aggarwal, B. B. 2004. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett*, 215, 129-40.
- Stevens, M., Hickman, J., Langdon, S., Chubb, D., Vickers, L., Stone, R., Baig, G., Goddard, C., Gibson, N. & A. SLACK, J. 1987. Stevens MF, Hickman JA, Langdon SP, Chubb D, Vickers L, Stone R, Baig G, Goddard C, Gibson NW, Slack JA, Newton C, Lunt E, Fizames C, Lavelle F Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methyl-imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. *Cancer Res* 47: 5846-5852.
- Fink, D., Aebi, S. & Howell, S. B. 1998. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res*, 4, 1-6.
- Fisher, J. L., Schwartzbaum, J. A., Wrensch, M. & Wiemels, J. L. 2007. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin*, 25, 867-90, vii.
- Fonseca-Silva, F., Inacio, J. D., Canto-Cavalheiro, M. M. & Almeida-Amaral, E. E. 2013. Reactive oxygen species production by quercetin causes the death of *Leishmania amazonensis* intracellular amastigotes. *J Nat Prod*, 76, 1505-8.
- Friedman, H. S., Kerby, T. & Calvert, H. 2000. Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res*, 6, 2585-97.
- Friedman, H. S., McLendon, R. E., Kerby, T., Dugan, M., Bigner, S. H., Henry, A. J., Ashley, D. M., Krischer, J., Lovell, S., Rasheed, K., Marchev, F., Seman, A. J.,

- Cokgor, I., Rich, J., Stewart, E., Colvin, O. M., Provenzale, J. M., Bigner, D. D., Haglund, M. M., Friedman, A. H. & Modrich, P. L. 1998. DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *J Clin Oncol*, 16, 3851-7.
- Friedmann-Morvinski, D., Narasimamurthy, R., Xia, Y., Myskiw, C., Soda, Y. & VERMA, I. M. 2016. Targeting NF- κ B in glioblastoma: A therapeutic approach. *Science advances*, 2, e1501292-e1501292.
- George, J., Banik, N. L. & Ray, S. K. 2009a. Bcl-2 Sirna Augments Taxol mediated apoptotic death in human glioblastoma U138MG and U251MG cells. *Neurochem Res*, 34, 66-78.
- George, J., Banik, N. L. & Ray, S. K. 2009b. Combination of taxol and Bcl-2 siRNA induces apoptosis in human glioblastoma cells and inhibits invasion, angiogenesis and tumour growth. *J Cell Mol Med*, 13, 4205-18.
- Gibellini, L., Pinti, M., Nasì, M., Montagna, J. P., De Biasi, S., Roat, E., Bertoncelli, L., Cooper, E. L. & Cossarizza, A. 2011. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2011, 591356-591356.
- Goellner, E. M., Grimme, B., Brown, A. R., Lin, Y. C., Wang, X. H., Sugrue, K. F., Mitchell, L., Trivedi, R. N., Tang, J. B. & Sobol, R. W. 2011. Overcoming temozolomide resistance in glioblastoma via dual inhibition of NAD⁺ biosynthesis and base excision repair. *Cancer Res*, 71, 2308-17.
- Goodenberger, M. L. & Jenkins, R. B. 2012. Genetics of adult glioma. *Cancer Genet*, 205, 613-21.
- Gupta, K. & PANDA, D. 2002. Perturbation of Microtubule Polymerization by Quercetin through Tubulin Binding: A Novel Mechanism of Its Antiproliferative Activity. *Biochemistry*, 41, 13029-13038.
- Haar, C. P., Hebbar, P., Wallace, G. C. T., Das, A., Vandergrift, W. A., 3rd, Smith, J. A., Giglio, P., Patel, S. J., Ray, S. K. & Banik, N. L. 2012. Drug resistance in glioblastoma: a mini review. *Neurochem Res*, 37, 1192-200.

- Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S. M. & Simjee Sh, U. 2017. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*, 18, 3-9.
- Happold, C., Roth, P., Wick, W., Schmidt, N., Florea, A. M., SILGINER, M., Reifemberger, G. & Weller, M. 2012. Distinct molecular mechanisms of acquired resistance to temozolomide in glioblastoma cells. *J Neurochem*, 122, 444-55.
- Hart, M. G., Grant, R., GARSIDE, R., ROGERS, G., SOMERVILLE, M. & STEIN, K. 2008. Temozolomide for high grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev*, CD007415.
- Hashemzaei, M., Delarami Far, A., Yari, A., Heravi, R. E., Tabrizian, K., Taghdisi, S. M., Sadegh, S. E., Tsarouhas, K., Kouretas, D., Tzanakakis, G., Nikitovic, D., Anisimov, N. Y., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M. & Rezaee, R. 2017. Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. *Oncology reports*, 38, 819-828.
- Hayat, M. A. 2011. Tumors of the Central Nervous system, Volume 3. In: HAYAT, M. A. (ed.).
- Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., De Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E., Hau, P., Mirmanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C. & Stupp, R. 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, 352, 997-1003.
- Hegi, M. E., Liu, L., Herman, J. G., Stupp, R., Wick, W., Weller, M., Mehta, M. P. & Gilbert, M. R. 2008. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol*, 26, 4189-99.
- Hermisson, M., Klumpp, A., Wick, W., Wischhusen, J., Nagel, G., Roos, W., Kaina, B. & Weller, M. 2006. O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human Malignant Glioma Cells. *J Neurochem*, 96, 766-76.

- Holland, E. C. 2000. Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 6242-4.
- Hou, X., Zhao, Y., Zheng, Y. R., Wang, J. J., Wu, Z. C. & Sun, J. H. 2011. [Comparison of MGMT and ERCC(2) expression in temozolomide for the treatment of malignant glioma drug resistance and their genetic relationship]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 91, 56-8.
- Hsu, C. L. & Yen, G. C. 2008. Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mol Nutr Food Res*, 52, 53-61.
- Iacob, G. & Dinca, E. B. 2009. Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *J Med Life*, 2, 386-93.
- Inskip, P. D., Tarone, R. E., Hatch, E. E., Wilcosky, T. C., Shapiro, W. R., Selker, R. G., Fine, H. A., Black, P. M., Loeffler, J. S. & Linet, M. S. 2001. Cellular-telephone use and brain tumors. *N Engl J Med*, 344, 79-86.
- Jacobs, H., Moalin, M., Bast, A., Van Der Vijgh, W. J. F. & Haenen, G. R. M. M. 2010. An essential difference between the flavonoids monoHER and quercetin in their interplay with the endogenous antioxidant network. *PloS one*, 5, e13880-e13880.
- Jung, Y. H., Heo, J., Lee, Y. J., Kwon, T. K. & Kim, Y. H. 2010. Quercetin enhances TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells via increased protein stability of death receptor 5. *Life Sci*, 86, 351-7.
- Kabat, G. C., Etgen, A. M. & Rohan, T. E. 2010. Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19, 2421-7.
- Kanu, O. O., Mehta, A., Di, C., Lin, N., Bortoff, K., Bigner, D. D., Yan, H. & Adamson, D. C. 2009. Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets*, 13, 701-18.
- Kasala, E. R., Bodduluru, L. N., Barua, C. C. & Gogoi, R. 2015. Chrysin and its emerging role in cancer drug resistance. *Chem Biol Interact*, 236, 7-8.
- Kashyap, D., Garg, V. K., Tuli, H. S., Yerer, M. B., Sak, K., Sharma, A. K., Kumar, M., Aggarwal, V. & Sandhu, S. S. 2019. Fisetin and Quercetin: Promising Flavonoids with Chemopreventive Potential. *Biomolecules*, 9.

- Kesari, S. 2011. Understanding glioblastoma tumor biology: the potential to improve current diagnosis and treatments. *Semin Oncol*, 38 Suppl 4, S2-10.
- Kohsaka, S., Wang, L., Yachi, K., Mahabir, R., Narita, T., Itoh, T., Tanino, M., Kimura, T., Nishihara, H. & Tanaka, S. 2012. STAT3 inhibition overcomes temozolomide resistance in glioblastoma by downregulating MGMT expression. *Mol Cancer Ther*, 11, 1289-99.
- Krex, D., Klink, B., Hartmann, C., Von Deimling, A., Pietsch, T., Simon, M., Sabel, M., Steinbach, J. P., Heese, O., Reifenberger, G., Weller, M. & Schackert, G. 2007. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain*, 130, 2596-606.
- Lapointe, S., Perry, A. & Butowski, N. A. 2018. Primary Brain Tumours In adults. *Lancet*, 392, 432-446.
- Lee, S. Y. 2016. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & Diseases*, 3, 198-210.
- Lee, S. Y., Liu, S., Mitchell, R. M., Slagle-Webb, B., Hong, Y. S., Sheehan, J. M. & Connor, J. R. 2011. HFE polymorphisms influence the response to chemotherapeutic agents via induction of p16INK4A. *Int J Cancer*, 129, 2104-14.
- Lee, Y. K., Hwang, J. T., Kwon, D. Y., Surh, Y. J. & Park, O. J. 2010. Induction of apoptosis by quercetin is mediated through AMPK α 1/ASK1/p38 pathway. *Cancer Lett*, 292, 228-36.
- Linos, E., Rame, T., Alonso, A. & Michaud, D. 2007. Atopy And Risk Of Brain tumors: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, 99, 1544-50.
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I. R., Lu, L., Irvin, D., Black, K. L. & Yu, J. S. 2006. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*, 5, 67.
- Liu, Z., Zhao, J., Li, W., Wang, X., Xu, J., Xie, J., Tao, K., Shen, L. & Zhang, R. 2015. Molecular docking of potential inhibitors for influenza H7N9. *Computational and mathematical methods in medicine*, 2015, 480764-480764.
- Lo, H. W. 2010. EGFR-targeted therapy in malignant glioma: novel aspects and mechanisms of drug resistance. *Curr Mol Pharmacol*, 3, 37-52.

- Loiseau, H., Huchet, A., Rue, M., Cowppli-Bony, A. & Baldi, I. 2009. [Epidemiology of primary brain tumor]. *Rev Neurol (Paris)*, 165, 650-70.
- Long, H., Liang, C., Zhang, X., Fang, L., Wang, G., Qi, S., Huo, H. & Song, Y. 2017. Prediction and Analysis of Key Genes in Glioblastoma Based on Bioinformatics. *Biomed Res Int*, 2017, 7653101.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W. & Kleihues, P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 114, 97-109.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P. & Ellison, D. W. 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, 131, 803-20.
- Lu, C. & Shervington, A. 2008. Chemoresistance in gliomas. *Mol Cell Biochem*, 312, 71-80.
- Lugli, E., Ferraresi, R., Roat, E., Troiano, L., Pintì, M., Nasi, M., Nemes, E., Bertoncelli, L., Gibellini, L., Salomoni, P., Cooper, E. L. & Cossarizza, A. 2009. Quercetin inhibits lymphocyte activation and proliferation without inducing apoptosis in peripheral mononuclear cells. *Leukemia Research*, 33, 140-150.
- Lugli, E., Troiano, L., Ferraresi, R., Roat, E., Prada, N., Nasi, M., Pintì, M., Cooper, E. L. & Cossarizza, A. 2005. Characterization of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis. *Cytometry A*, 68, 28-35.
- Mcneill, K. A. 2016. Epidemiology of Brain Tumors. *Neurol Clin*, 34, 981-998.
- Metodiewa, D., Jaiswal, A. K., Cenas, N., Dickanaitė, E. & Segura-Aguilar, J. 1999. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic Biol Med*, 26, 107-16.
- Middleton, M. R., Grob, J. J., Aaronson, N., Fierlbeck, G., Tilgen, W., Seiter, S., Gore, M., Aamdal, S., Cebon, J., Coates, A., Dreno, B., Henz, M., Schadendorf, D., Kapp, A., Weiss, J., Fraass, U., Statkevich, P., Muller, M. & Thatcher, N. 2000. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the

- treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol*, 18, 158-66.
- Moody, C. L. & Wheelhouse, R. T. 2014. The medicinal chemistry of imidazotetrazine prodrugs. *Pharmaceuticals (Basel)*, 7, 797-838.
- Mrugala, M. M. 2013. Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. *Discov Med*, 15, 221-30.
- Munoz, J. L., Bliss, S. A., Greco, S. J., Ramkisson, S. H., Ligon, K. L. & Rameshwar, P. 2013. Delivery of Functional Anti-miR-9 by Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes to Glioblastoma Multiforme Cells Conferred Chemosensitivity. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2, e126.
- Munoz, J. L., Rodriguez-Cruz, V., Greco, S. J., Ramkisson, S. H., Ligon, K. L. & Rameshwar, P. 2014. Temozolomide resistance in glioblastoma cells occurs partly through epidermal growth factor receptor-mediated induction of connexin 43. *Cell Death Dis*, 5, e1145.
- Nagane, M., Huang, H. J. & Cavenee, W. K. 1999. Causes of drug resistance and novel therapeutic opportunities for the treatment of glioblastoma. *Drug Resist Updat*, 2, 30-37.
- Nakada, M., Kita, D., Watanabe, T., Hayashi, Y., Teng, L., Pyko, I. V. & Hamada, J. 2011. Aberrant signaling pathways in glioma. *Cancers (Basel)*, 3, 3242-78.
- Natsume, A., Ishii, D., Wakabayashi, T., Tsuno, T., Hatano, H., Mizuno, M. & Yoshida, J. 2005. IFN-beta down-regulates the expression of DNA repair gene MGMT and sensitizes resistant glioma cells to temozolomide. *Cancer Res*, 65, 7573-9.
- Newlands, E. S., Blackledge, G. R., Slack, J. A., Rustin, G. J., Smith, D. B., Stuart, N. S., Quarterman, C. P., Hoffman, R., Stevens, M. F., Brampton, M. H. & Et Al. 1992. Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045: M&B 39831: NSC 362856). *Br J Cancer*, 65, 287-91.
- Norden, A. D. & Wen, P. Y. 2006. Glioma therapy in adults. *Neurologist*, 12, 279-92.
- O'leary, K. A., Day, A. J., Needs, P. W., Mellon, F. A., O'brien, N. M. & Williamson, G. 2003. Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-

O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochem Pharmacol*, 65, 479-91.

Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P. L., Burkhard, C., Schuler, D., Probst-Hensch, N. M., Maiorka, P. C., Baeza, N., Pisanı, P., Yonekawa, Y., Yasargil, M. G., Lutolf, U. M. & Kleihues, P. 2004. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*, 64, 6892-9.

Ohka, F., Natsume, A. & Wakabayashi, T. 2012. Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme. *Neurol Res Int*, 2012, 878425.

Olar, A. & Aldape, K. D. 2014. Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *J Pathol*, 232, 165-77.

Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C. & Barnholtz-Sloan, J. S. 2015. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol*, 17 Suppl 4, iv1-iv62.

Paz, M. F., Yaya-Tur, R., Rojas-Marcos, I., Reynes, G., Pollan, M., Aguirre-Cruz, L., García-Lopez, J. L., Piquer, J., Safont, M. J., Balana, C., Sanchez-Cespedes, M., García-Villanueva, M., Arribas, L. & Esteller, M. 2004. CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res*, 10, 4933-8.

Potschka, H. 2010. Targeting regulation of ABC efflux transporters in brain diseases: a novel therapeutic approach. *Pharmacol Ther*, 125, 118-27.

Prasad, G. & Haas-Kogan, D. A. 2009. Radiation-induced gliomas. *Expert Rev Neurother*, 9, 1511-7.

Qurbt, I., Verma, S., Petrella, T., Bak, K. & Charette, M. 2007. Temozolomide for the treatment of metastatic melanoma. *Curr Oncol*, 14, 27-33.

Ramirez, Y. P., Weatherbee, J. L., Wheelhouse, R. T. & ROSS, A. H. 2013. Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 6, 1475-1506.

- Reardon, D. A. & Wen, P. Y. 2006. Therapeutic advances in the treatment of glioblastoma: rationale and potential role of targeted agents. *Oncologist*, 11, 152-64.
- Reid, J. M., Stevens, D. C., Rubin, J. & Ames, M. M. 1997. Pharmacokinetics of 3-methyl-(triazene-1-yl)imidazole-4-carboximide following administration of temozolomide to patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res*, 3, 2393-8.
- Riccio, P., Sessa, R., De Nicola, S., Petruzzello, F., Trombetti, S., Menna, G., Pepe, G., Maddalena, P., Izzo, P. & Grosso, M. 2019. GATA-1 isoforms differently contribute to the production and compartmentation of reactive oxygen species in the myeloid leukemia cell line K562. *J Cell Physiol*.
- Rock, K., Mcardle, O., Forde, P., Dunne, M., Fitzpatrick, D., O'Neill, B. & Faul, C. 2012. A clinical review of treatment outcomes in glioblastoma multiforme--the validation in a non-trial population of the results of a randomised Phase III clinical trial: has a more radical approach improved survival? *Br J Radiol*, 85, e729-33.
- Ronellenfitsch, M. W., Steinbach, J. P. & Wick, W. 2010. Epidermal growth factor receptor and mammalian target of rapamycin as therapeutic targets in malignant glioma: current clinical status and perspectives. *Target Oncol*, 5, 183-91.
- Sahpazidou, D., Geromichalos, G. D., Stagos, D., Apostolou, A., Haroutounian, S. A., Tsatsakis, A. M., Tzanakakis, G. N., Hayes, A. W. & Kouretas, D. 2014. Anticarcinogenic activity of polyphenolic extracts from grape stems against breast, colon, renal and thyroid cancer cells. *Toxicol Lett*, 230, 218-24.
- Salvati, M., Frati, A., Russo, N., Caroli, E., Polli, F. M., Minniti, G. & Delfini, R. 2003. Radiation-induced gliomas: report of 10 cases and review of the literature. *Surg Neurol*, 60, 60-7; discussion 67.
- Sang, D. P., Li, R. J. & Lan, Q. 2014. Quercetin sensitizes human glioblastoma cells to temozolomide in vitro via inhibition of Hsp27. *Acta Pharmacol Sin*, 35, 832-8.
- Sasaki, T., Hankins, G. R. & Helm, G. A. 2002. Major vault protein/lung resistance-related protein (MVP/LRP) expression in nervous system tumors. *Brain Tumor Pathol*, 19, 59-62.

- Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D. & Wrensch, M. 2006. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol*, 2, 494-503; quiz 1 p following 516.
- Scott, J., Tsai, Y. Y., Chinnaiyan, P. & Yu, H. H. 2011. Effectiveness of radiotherapy for elderly patients with glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 81, 206-10.
- Senggunprai, L., Kukongviriyapan, V., Prawan, A. & Kukongviriyapan, U. 2014. Quercetin and EGCG exhibit chemopreventive effects in cholangiocarcinoma cells via suppression of JAK/STAT signaling pathway. *Phytother Res*, 28, 841-8.
- Sevc, J., Daxnerova, Z., Hanova, V. & Koval, J. 2011. Novel observations on the origin of ependymal cells in the ventricular zone of the rat spinal cord. *Acta Histochem*, 113, 156-62.
- Sharma, A., Kashyap, D., Sak, K., Tuli, H. S. & Sharma, A. K. 2018. Therapeutic charm of quercetin and its derivatives: a review of research and patents. *Pharm Pat Anal*, 7, 15-32.
- Silber, J. R., Bobola, M. S., Blank, A. & Chamberlain, M. C. 2012. O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: promise and problems. *Biochim Biophys Acta*, 1826, 71-82.
- Srivastava, S., Somasagara, R. R., Hegde, M., Nishana, M., Tadi, S. K., Srivastava, M., Choudhary, B. & Raghavan, S. C. 2016. Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Scientific Reports*, 6, 24049.
- Stenberg, SS. 1997. Central Nervous System. *Histology for Pathologists*,. Second Edition ed. Philadelphia: : Lippincott Williams & Wilkins;.
- St-Coeur, P. D., Poitras, J. J., Cuperlovic-Culf, M., Touaibia, M. & Morin, P., JR. 2015. Investigating a signature of temozolomide resistance in GBM cell lines using metabolomics. *J Neurooncol*, 125, 91-102.
- Stagos, D., Apostolou, A., Poullos, E., Kermeliotou, E., Mpatzilioti, A., Kreatsoulis, K., Koulocheri, S. D., Haroutounian, S. A. & Kouretas, D. 2014. Antiangiogenic

potential of grape stem extract through inhibition of vascular endothelial growth factor expression. *J Physiol Pharmacol*, 65, 843-52.

Streffer, J. R., Rimmer, A., Rieger, J., Naumann, U., Rodemann, H. P. & Weller, M. 2002. BCL-2 family proteins modulate radiosensitivity in human malignant glioma cells. *J Neurooncol*, 56, 43-9.

Stupp, R., Mason, W. P., Van Den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E. & Mirimanoff, R. O. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352, 987-96.

Sun, G. Y., Chen, Z., Jasmer, K. J., Chuang, D. Y., Gu, Z., Hannink, M. & Simonyi, A. 2015. Quercetin Attenuates Inflammatory Responses in BV-2 Microglial Cells: Role of MAPKs on the Nrf2 Pathway and Induction of Heme Oxygenase-1. *PloS one*, 10, e0141509-e0141509.

Terlikowska, K. M., Witkowska, A. M., Zujko, M. E., Dobrzycka, B. & Terlikowski, S. J. 2014. Potential application of curcumin and its analogues in the treatment strategy of patients with primary epithelial ovarian cancer. *International journal of molecular sciences*, 15, 21703-21722.

Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S. & Villano, J. L. 2014. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 23, 1985-96.

Ujifuku, K., Mitsutake, N., Takakura, S., Matsuse, M., Saenko, V., Suzuki, K., Hayashi, K., Matsuo, T., Kamada, K., Nagata, I. & Yamashita, S. 2010. miR-195, miR-455-3p and miR-10a(*) are implicated in acquired temozolomide resistance in glioblastoma multiforme cells. *Cancer Lett*, 296, 241-8.

Uno, M., Oba-Shinjo, S. M., Camargo, A. A., Moura, R. P., Aguiar, P. H. D., Cabrera, H. N., Begnami, M., Rosemberg, S., Teixeira, M. J. & Marie, S. K. N. 2011. Correlation of MGMT promoter methylation status with gene and protein expression levels in glioblastoma. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 66, 1747-1755.

Van Nifterik, K. A., Van Den Berg, J., Van Der Meide, W. F., Ameziame, N., Wedekind, L. E., Steenbergen, R. D., Leenstra, S., Lafleur, M. V., Slotman, B.

- J., Stalpers, L. J. & Sminia, P. 2010. Absence of the MGMT protein as well as methylation of the MGMT promoter predict the sensitivity for temozolomide. *Br J Cancer*, 103, 29-35.
- Wang, G., Song, L., Wang, H. & Xing, N. 2013. Quercetin synergizes with 2-methoxyestradiol inhibiting cell growth and inducing apoptosis in human prostate cancer cells. *Oncol Rep*, 30, 357-63.
- Wang, X., Ouyang, Y., Liu, J., Zhu, M., Zhao, G., Bao, W. & Hu, F. B. 2014. Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ*, 349, g4490.
- Wei, L., Jamonnak, N., Choy, J., Wang, Z. & Zheng, W. 2008. Differential binding modes of the bromodomains of CREB-binding protein (CBP) and p300 with acetylated MyoD. *Biochemical and biophysical research communications*, 368, 279-284.
- Weller, M., Felsberg, J., Hartmann, C., Berger, H., Steinbach, J. P., Schramm, J., Westphal, M., Schackert, G., Simon, M., Tonn, J. C., Heese, O., Krex, D., Nikkhah, G., Pietsch, T., Wiestler, O., Reifenberger, G., Von Deimling, A. & Loeffler, M. 2009. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol*, 27, 5743-50.
- Weller, M., Malipiero, U., Aguzzi, A., Reed, J. C. & Fontana, A. 1995. Protooncogene bcl-2 gene transfer abrogates Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of human malignant glioma cells and confers resistance to chemotherapeutic drugs and therapeutic irradiation. *J Clin Invest*, 95, 2633-43.
- Williamson, G., Kay, C. D. & Crozier, A. 2018. The Bioavailability, Transport, and Bioactivity of Dietary Flavonoids: A Review from a Historical Perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, 1054-1112.
- Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M. & Berger, M. S. 2002. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol*, 4, 278-99.

- Xiang, T., Fang, Y. & Wang, S. X. 2014. Quercetin suppresses HeLa cells by blocking PI3K/Akt pathway. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 34, 740-744.
- Yadav, D. D., Suri, S., Chaudhary, A., Sikander, M., Kardam, H., Nadeem Beg, M., Garg, V., Ahmad, A. & Asif, M. 2011. A Novel Approach: Herbal Remedies and Natural Products in Pharmaceutical Science as Nano Drug Delivery Systems.
- Yung, W. K., Prados, M. D., Yaya-Tur, R., Rosenfeld, S. S., Brada, M., Friedman, H. S., Albright, R., Olson, J., Chang, S. M., O'Neill, A. M., Friedman, A. H., Bruner, J., Yue, N., Dugan, M., Zaknoen, S. & Levin, V. A. 1999. Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. Temodal Brain Tumor Group. *J Clin Oncol*, 17, 2762-71.
- Zhang, J., Stevens, M. F., Laughton, C. A., Madhusudan, S. & Bradshaw, T. D. 2010. Acquired resistance to temozolomide in glioma cell lines: molecular mechanisms and potential translational applications. *Oncology*, 78, 103-14.
- Zhang, X. A., Zhang, S., Yin, Q. & Zhang, J. 2015. Quercetin induces human colon cancer cells apoptosis by inhibiting the nuclear factor-kappa B Pathway. *Pharmacogn Mag*, 11, 404-9.
- Zhou, A., Scoggin, S., Gaynor, R. B. & Williams, N. S. 2003. Identification of NF-kappa B-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference. *Oncogene*, 22, 2054-64.

Sedat GÜLAY Tez

ORJINALLIK RAPORU

%**9**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**8**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**0**

YAYINLAR

%**1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

www.geneltip.org

İnternet Kaynağı

%**7**

2

www.istanbulsaglik.gov.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

3

Submitted to Selçuk Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%**1**

4

Submitted to Beykent Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%**1**

5

Submitted to University of Leeds

Öğrenci Ödevi

<%**1**

6

dspace.cuni.cz

İnternet Kaynağı

<%**1**

7

lekarstwo.ru

İnternet Kaynağı

<%**1**

8

academic.oup.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

9

Submitted to Eskişehir Osmangazi University

Öğrenci Ödevi

<%**1**

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Sedat GÜLAY

Uyruğu: Türk (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 1982 KAYSERİ

Medeni Durumu: Evli

Mesleği: Eczacı

e-Mail:

Cep Telefon: 05425457263

Adres: Atakent Mah. 231. Sok. Soyak Olimpiakent Sit. Küçükçekmece/İSTANBUL

EĞİTİM BİLGİLERİ

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

2005

Erciyes Üniversitesi - Farmakoloji (Yüksek Lisans)

2013

Erciyes Üniversitesi - Farmakoloji (Doktora)

Devam