

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLİOBLASTOMA VE NÖROBLASTOMA TİP BEYİN TÜMÖR HÜCRE SERİLERİ
ÜZERİNDE TEMOZOLOMİD İLE PAKLİTAKSEL, MELATONİN VE
ERGOSTEROL İLE OLUŞTURULAN KOMBİNE TERAPİLERİNİN ETKİSİ

AYTEN BOSTANCI

DOKTORA TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR

EDİRNE-2021

AYTEN BOSTANCI'nın hazırladığı “Glioblastoma ve Nöroblastoma Tip Beyin Tümör Hücre Serileri Üzerinde Temozolomid ile Paklitaksel, Melatonin ve Ergosterol ile Oluşturulan Kombine Terapilerinin Etkisi” başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):

İmza

Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR

.....

Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT

.....

Doç. Dr. Jülide TOZKIR

.....

Doç. Dr. Bahadır BATAR

.....

Doç. Dr. Hüseyin Avni EROĞLU

.....

Tez Savunma Tarihi: 21/04/2021

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR

Tez Danışmanı

.....

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

.....

Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

21/04/2021

Ayten BOSTANCI

İmza

Doktora Tezi

Glioblastoma ve Nöroblastoma Tıp Beyin Tümör Hücre Serileri Üzerinde Temozolomid ile Paklitaksel, Melatonin ve Ergosterol ile Oluşturulan Kombine Terapilerinin Etkisi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Glioblastoma multiforme (GBM) ve Nöroblastoma (NB), merkezi sinir sisteminin (MSS) en ölümcül habis tümör türleridir ve heterojenik özellikleri tedaviyi zorlaştırmaktadır. Kanserlerin heterojenliği ve karmaşıklığı nedeniyle, kombinasyon terapi rejimleri, ölümcül beyin tümörlerine karşı standart tedaviler haline gelmiştir. Temozolomid ve paklitaksel kombinasyonu, Glioblastoma için en yaygın kullanılan kemoterapi rejimidir. Ancak, tedavi edilen hastaların yaklaşık yarısında temozolomid direnci ve ciddi yan etkiler gelişir ve hastaların büyük bir kısmında sonuç olarak tedavi başarısız olur. Her ikisi de uzun süredir antitümör etkileri ile bilinen çok işlevli bir hormon melatonin ve doğal ürün olan ergosterol, tümörleri normal hücrelerden seçici şekilde etkileme yeteneği ile kombinasyon kanser tedavisinde büyük bir avantaja sahiptir. Bu tezde, kemoterapi ajanlarının tek başına IC_{50} dozlarını belirledikten sonra, temozolomid (TMZ) ile birlikte paklitaksel (PTX), melatonin (MLT) ve ergosterol (ERG) kombinasyonlarının, oksidatif stres, DNA hasarı, ısı şoku proteinleri, Nf-kb, P13k / Akt / mTOR ve apoptoz sinyal yolları üzerinden Glioblastoma (C6) ve Nöroblastoma (N1E-115) hücre serilerinin in vitro progresyonu üzerinde inhibisyon etkileri araştırıldı. Hem C6 hem de N1E-115 hücre hatlarında sitotoksiteyi indüklemek için tek başına ve PXT, MLT veya ERG (tümü IC_{50}) ile kombinasyon halinde iki TMZ konsantrasyonu (IC_{50} ve $1/2 IC_{50}$) kullanıldı. Canlı, ölü ve apoptotik hücreler, Anneksin V:PI boyama ile belirlendi. Sinyal yollarına ait gen ifadeleri, kantitatif ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile değerlendirildi ve ana proteinler western blot analizi ile belirlendi.

IC₅₀ seviyelerindeki tüm tedaviler, taşıt madde ile tedavi edilen kontrollere kıyasla hem Glioma hem de Nöroblastoma hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azalttı. TMZ'nin 1/2 IC₅₀ konsantrasyonunda, özellikle melatonin kombinasyonu, kontrol ve diğer kombinasyon gruplarına kıyasla sinerjik etki ile önemli hücre ölümü gösterdi. Her iki hücre hattında da TMZ-MLT kombinasyonu oksidatif stres, DNA hasarı ve katlanmamış protein yanıtını indükledi. Nf-kb ve P13k / Akt eksenine ilişkili proteinler önemli ölçüde azaldı. TMZ (1/2 IC₅₀) ile MLT ve ERG kombinasyon tedavileri, hücre döngüsü tutuklanması ve P53 ekspresyonlarının yanı sıra pro-apoptotik gen ve proteinleri (Bax, Kaspaz 3 ve 8) artırırken, Bcl-2 proteini önemli ölçüde azalttı. Bu moleküler sinyaller, C6 ve N1E-115 hücrelerinde hem apoptotik hem de nekrotik hücre ölümünü önemli ölçüde tetikledi. Ayrıca, bu etki seçiciydi ve tek başına TMZ tedavisi ile karşılaştırıldığında C8 sağlıklı astrosit hücre serilerinde önemli ölçüde yüksek hücre canlılığı belirlendi. Sonuçlarımız, özellikle MLT ve ikincil olarak ERG'ün, düşük doz TMZ ile kombinasyonunun, oksidatif stres ile ilişkili DNA-protein hasarı ve apoptoz arasında ortak bir hücre ölümü yukarı akış sinyalleri olarak hareket edebildiğini, bu sayede, hem Glioma hem de Nöroblastoma için TMZ-PXT tedavisine alternatif olan yeni seçici terapötik stratejilerin geliştirilmesinde kullanabileceğini önermektedir.

Yıl : 2021

Sayfa Sayısı : 212

Anahtar Kelimeler : Beyin tümörü, Glioblastom, Nöroblastom, Temozolomid, Melatonin, Ergosterol, Paklitaksel

Thesis

The Effect of Combined Therapies Induced by Temozolomide and Paclitaxel, Melatonin and Ergosterol on Glioblastoma and Neuroblastoma Type Brain Tumor Cell Lines

Trakya University Institute of Natural Sciences

Biotechnologies and Genetic

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) and Neuroblastoma (NB) is the deadliest malignant tumour types of the central nervous system (CNS) and their heterogenic properties make treatment difficult. Due to heterogeneity and complexity of cancers, combination regimens have become standard treatments against fatal brain tumours. Temozolomide and paclitaxel combination is the most widely used chemotherapy regime for Glioblastoma, however, approximately half of treated patients have temozolomide resistance and serious side effect and most of patients finally fail therapy. A multifunctional hormone, melatonin, and natural product, ergosterol, that both have long been known for its antitumor effects have a great advantage in combination cancer therapy with ability to differentially influence tumours from normal cells. In this thesis, after determining IC_{50} doses of chemotherapy agents alone, we investigated the effectiveness of a combination of temozolomide (TMZ) plus paclitaxel (PTX), melatonin (MLT) or ergosterol (ERG) on the inhibition of Glioma (C6) and Neuroblastoma (N1E-115) progress in vitro, via impact on oxidative stress, DNA damage, heat shock proteins, Nf-kb, P13k /Akt /mTOR and apoptosis signaling pathway. Two concentrations of TMZ (ie. IC_{50} and $1/2 IC_{50}$) alone, and in combination with PXT, MLT or ERG (all of IC_{50}) were used to induce cytotoxicity in the both C6 and N1E-115 cell lines. Live, death and apoptotic cells were visualised by annexin V:PI staining. Relative gen expressions belong to signaling pathways were assessed by quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR), and key proteins determined by western blot assay. All treatments at IC_{50} levels significantly decreased the viability of both Glioma and Neuroblastoma cells compared to vehicle treated controls. At $1/2 IC_{50}$

concentration of TMZ, especially melatonin combination showed significant cell death with synergistic effect compared to control and other combination groups. In both cell lines, TMZ-MLT combination induce oxidative stress, DNA damage and unfolded protein response. Nf-kb and P13k / Akt axis-related proteins were significantly decreased. MLT and ERG in combination with TMZ (1/2 IC₅₀) increased cell cycle arrest, P53 expressions as well as pro-apoptotic gene and proteins (Bax, Caspase 3 and 8), while Bcl-2 protein was significantly decreased. This molecular signals significantly triggered both apoptotic and necrotic cell death in C6 and N1E-115 cells. Furthermore, this effect was selective, and significantly high cell viability determined in C8 healthy astrocyte cell lines compared to TMZ alone. Our result suggests that, especially MLT and secondarily ERG in combination with low dose TMZ may act as a common cell death upstream signals among oxidative stress related DNA-protein damage and apoptosis, which may lead to the development of new selective therapeutic strategies that alternative for TMZ-PXT treatment for both Glioma and Neuroblastoma.

Year : 2021

Number of Pages : 212

Keywords : Brain tumour, Glioblastoma, Neuroblastoma, Temozolomide, Melatonin, Ergosterol, Paclitaxel

TEŞEKKÜR

Çalışma hayatıma başladığım günden bu yana desteğini her zaman hissettiren, Doktora danışmanım olarak, benim için en iyisini planlayan, bunu gerçekleştirmek için maddi manevi tüm imkanlarını bana sunan çok kıymetli hocam Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR'a,

Tezime olan katkılarından dolayı ve her zaman pozitif çözüm odaklı değerli hocalarım, Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT ve Doç. Dr. Jülide TOZKIR'a, Motivasyonumu her zaman yüksek tutmamı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR'a,

Deneylerim süresince her an, her konuda yardımlarını sunan, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı değerli ekibi, Ayşe Kardelen KURTDERE, Tourkan CHASAN, Esra TURGUT ve Nazlı BEŞİRİK'e, Desteklerinden dolayı Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje numarası: TÜBAP 2018/292)'ne,

Hayattaki en büyük şansım canım annem Müzeyyen KURT'a, değerli zamanından çaldığım minik kızım Aymila BOSTANCI'ya ve her koşulda beni destekleyen sevgili eşim ve en yakın arkadaşım Burak BOSTANCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi “Şimdi sen Doktor mu olacaksın?” diyen ama mezun olduğumu göremeden aramızdan ayrılan (07.03.2020), canım anneannem Fatma KURT'a ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER DİZİNİ.....	xiv
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xxi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxvii
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2	6
GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Kanser	6
2.2. Sınıflandırma	7
2.3. Gliomaların Teşhis Yöntemleri	11
2.4. Beyin Tümörü Tedavileri.....	12
2.4.1. Radyasyon.....	12
2.4.2. Kemoterapi.....	13
2.4.3. İmmünoterapi.....	15
2.4.4. Gen Terapi	17
2.4.5. Cerrahi	17
2.5. Beyin Tümörü Tedavisinde Başlıca Engeller	18

2.5.1. Kan Beyin Bariyeri	18
2.5.2. Kemoterapi Direnci.....	18
2.5.3. O6-Metilguanin-DNA Metiltransferaz İle Onarım.....	19
2.6. Glioblastoma Multiforme	20
2.7. Nöroblastoma.....	24
2.8. Astrosit.....	26
2.9. Kullanılan İlaçlar	28
2.9.1. Temozolomid.....	28
2.9.2. Paklitaksel.....	30
2.9.3. Melatonin	31
2.9.4. Ergosterol.....	32
2.10. Sinyal Yolakları	33
2.10.1. Antioksidan Sinyal Yolağı.....	34
2.10.2. DNA Tamir Sinyal Yolağı.....	36
2.10.3. Isı Şok Proteinleri Sinyal Yolağı	39
2.10.4. Hücre Döngüsü Sinyal Yolağı	42
2.10.5. Yaşam Sinyal Yolağı: Nf-kb-P13k-Akt	44
2.10.6. Apoptoz Sinyal Yolağı.....	47
2.10.6.1 İçsel Yol.....	48
2.10.6.2. Dışsal Yol	49
3.1. GEREÇ VE YÖNTEMLER	52
3.1.1. Gereçler.....	52
3.1.1.1. Kullanılan Cihazlar	52
3.1.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	53
3.1.2. Yöntemler	54
3.1.2.1. Hücre Kültürü	54

3.1.2.1.1. Hücre Hatlarının Temini	54
3.1.2.1.2. Hücrelerin Üretilmesi	55
3.1.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması	55
3.1.2.1.4. Hücrelerin Dondurulması	56
3.2. Moleküllerin Uygulanması Ve Doz Tespiti (Mtt Testi)	57
3.3. Stok ve Uygulama Solüsyonlarının Hazırlanması	57
3.3.1. Temozolomid Stok ve Uygulama Solüsyonunun Hazırlanması	57
3.3.2. Paklitaksel Stok ve Uygulama Solüsyonlarının Hazırlanması	58
3.3.3. Melatonin Stok ve Uygulama Solüsyonlarının Hazırlanması	59
3.3.4. Ergosterol Stok ve Uygulama Solüsyonlarının Hazırlanması	60
3.4. IC ₅₀ Dozlarının Belirlenmesi (MTT testi)	61
3.5. IC ₅₀ Değerleri Belirlenen Kombine İlaç gruplarının Uygulanması	62
3.6 TALİ Görüntü Tabanlı Sitometre Analizi	64
3.7. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	66
3.7.1. RNA İzolasyon Deney Protokolü	66
3.7.2. cDNA Sentezi	68
3.7.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	69
3.8. Protein Çalışmaları	74
3.8.1. Western Blot Analizi	74
3.8.1.1. Protein İzolasyon Protokolü	75
4.1. Moleküllerin IC ₅₀ Dozlarının Belirlenmesi (MTT Testi)	79
4.1.1. Temozolomid	79
4.1.2. Paklitaksel	83
4.1.3. Melatonin	87
4.1.4. Ergosterol	91
4.2. Kombinasyon İlaç Uygulamaları	95

4.2.1. Temozolomid, Paklitaksel, Melatonin Ve Ergosterol İle Oluşturulan Kombinasyon Tedavilerinin Kansere Ve Sağlıklı Hücrelerde Etkinliği	95
4.2.1.1. C6 Hücre Hattına Temozolomid IC ₅₀ Dozu Uygulanması	96
4.2.1.2. C6 Hücre Hattına Temozolomid ½ IC ₅₀ Dozu Uygulanması	96
N1E-115 Hücre Hattına IC ₅₀ VE ½ IC ₅₀ Dozlarının Uygulanması	99
4.2.1.3. Temozolomid IC ₅₀ Dozu.....	99
4.2.1.4. Temozolomid ½ IC ₅₀	101
4.2.1.5. Astrosit TMZ1 IC ₅₀	102
4.2.1.6. Temozolomid ½ IC ₅₀	104
4.3. TALİ Görüntü Tabanlı Sitometri Analizi	105
4.3.1. Temozolomid'in Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	105
4.4.1.1. Antioksidan Sinyal Yolu.....	114
4.4.1.2. Dna Tamir Sinyal Yolu.....	115
4.4.1.3. Isı Şok Sinyal Yolu.....	116
4.4.1.4. Nf-kb, P13k, Akt, mTOR Sinyal Yolu.....	118
4.4.1.5. Hücre Döngüsü Düzenleyici Sinyal Yolu.....	120
4.4.1.5. Apoptoz Sinyal Yolu.....	121
4.4.2.1. Antioksidan Sinyal Yolu.....	125
4.4.2.2. Dna Tamir Sinyal Yolu.....	125
4.4.2.3. Isı Şok Sinyal Yolu.....	127
4.4.2.4. Nf-kb, P13k, Akt, mTOR Sinyal Yolu.....	128
4.4.2.5. Hücre Döngüsü Düzenleyici Sinyal Yolu.....	130
4.4.2.6. Apoptoz Sinyal Yolu.....	131
4.4.3. İlaç Kombinasyon Uygulamasının Astrosit (C8) Hücre Hattı Hücre Serisine Etkisi	133
4.4.3.1. Antioksidan Sinyal Yolu.....	135

4.4.3.2. Dna Tamir Sinyal Yolağı	135
4.4.3.3. Isı Şok Sinyal Yolağı	137
4.4.3.4. Nf-kb, P13k, Akt, mTOR Sinyal Yolağı	139
4.4.3.5. Hücre Döngüsü Düzenleyici Sinyal Yolağı.....	141
4.4.3.6. Apoptoz Sinyal Yolağı.....	141
TARTIŞMA	143
SONUÇ VE ÖNERİLER	162
ÖZGEÇMİŞ	164
KAYNAKLAR	165

SİMGELER DİZİNİ

°C	:	Santigrat Derece
µl	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar
Ca ⁺²	:	Kalsiyum
cm ²	:	Santimetre kare
CO ₂	:	Karbondioksit
dH ₂ O	:	Saf su
dk	:	Dakika
g/rcf	:	Relatif Santrifüj Kuvveti
Gy	:	Gray
kDa	:	Kilodalton
mg/L	:	Miligram/Litre
mg/m ²	:	Miligram/metrekare
mg	:	Miligram
ml	:	Mili Litre
mM	:	Mili Molar
nM	:	Nano Molar
nm	:	Nanometre
p	:	Olasılık değeri
rpm	:	Dakikadaki devir sayısı
sn	:	Saniye
w/w	:	Ağırlıkça yüzde
µl	:	Mikro Litre
µM	:	Mikro Molar

KISALTMALAR DİZİNİ

ABB	:	Annexin Bağlama Tamponu
AD	:	Alzheimer's disease
aHGG	:	Yetişkin HGG
AIF	:	Apoptozu başlatan faktör
AKT	:	AKT Serine/Threonine Kinase 1
ALL	:	Lenfoid lösemi
ALS	:	Amyotrofik Lateral Skleroz
AP	:	Abazik (apirimidinik ya da apürinik) bölge
APAF	:	Apoptotic Peptidase Activating Factor 1
ATP	:	Adenozin trifosfat
A172	:	İnsan glioblastoma hücre hattı
A549	:	Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells
BAX	:	bcl-2-associated X protein
BBB	:	Kan beyin bariyeri
BER	:	Baz eksizyon onarımı
BCL2	:	B hücreli lenfoma 2
BCL-2	:	Bcell lösemi/lenfoma 2
BCL-XL	:	B-cell lymphoma-extra large
BCNU	:	Carmustine
BOS-CFS	:	Beyin omurilik sıvısı
CAD	:	Kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz
C6	:	Rat glioblastoma hücre hattı
CAT	:	Katalaz
CBF	:	Serebral kan akışı
CCNU	:	Lomustine
CDI	:	Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri

CDK	:	Sikline bağlı kinaz
cDNA	:	Komplementer DNA
CNS	:	Merkezi sinir sistemi
COX	:	Siklooksijenaz
COX2	:	Cyclooxygenase-2
CpG	:	Sitozin-Guanin adası
C8	:	Astrosit hücre hattı
CSC	:	Kanser kök hücreleri
Cys	:	Sistein
CYTC-C	:	Cytochrome C
DAC	:	Decitabine
DBTRG	:	İnsan glioma hücre hattı
DED	:	Ölüm efektör alanı
DISC	:	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DMEM	:	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
dNTP Mix	:	Deoksi-Nükleotit trifosfat
DU145	:	İnsan prostat kanseri
DR	:	Ölüm reseptörü
DSB	:	Çift Zincir Kırığı
E1	:	Ubikitin aktive edici enzim
EBRT	:	Harici ışın radyo terapi
EDTA	:	Etilendiamin tetraasetik asit
EGF	:	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	:	Epidermal büyüme faktörü reseptörünü
ERG	:	Ergosterol
EXO1	:	Ekzonükleaz 1
E3	:	Ubukutin Ligaz
FADD	:	FAS ile ilişkili ölüm alanı
FBS	:	Fetal Bovin Serum
FSRT	:	Fraksiyone stereotaktik radyo terapi
GBM	:	Glioblastoma multiform

GFAP	:	Glial fibriller asidik protein
GSH	:	Glutasyon Peroksidaz enzimi
HAM's F-12	:	F-12 Besin Karışımı
HD	:	Huntington Hastalığı
HepG2	:	İnsan karaciğer hepatoselüler karsinom hücre hattı
Hep3B	:	İnsan Hepatoselüler Karsinom Hücre hattı
H ₂ O ₂	:	Hidrojen Peroksit
HR	:	Homolog uç birleştirme
HSP27	:	Heat shock protein 27
HSP60	:	Heat shock protein 60
HSP70	:	Heat shock protein 70
HSP90	:	Heat shock protein 90
IC ₅₀	:	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
İÇB	:	İplikler arası çapraz bağ
IDH	:	İzositrat dehidrojenaz
IKBA	:	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer
TNF-alpha	:	Tümör nekroz faktör- α
IKK	:	I κ B kinaz
IL	:	İnterlökin
KASPAZ	:	Apoptosis Related Cysteine Peptidase
LNCaP	:	İnsan prostat karsinomu
LN229	:	Human brain cancer hücre hattı
MCF-7	:	İnsan meme kanseri hücre hattı
MDM2	:	Mouse double minute 2 homolog
MGMT	:	O ⁶ -metilguanin DNA metiltransferaz
MGMTp	:	MGMT promotörü
MiRNA	:	MikroRNA
ML	:	Melatonin
MLH1	:	MutL Homolog 1
MMR	:	Yanlış eşleşme (Uyumsuzluk) onarımı
MPT	:	Mitokondriyal geçirgenlik geçişi
MRI	:	Manyetik rezonans görüntüleme

MRS	:	Rezonans spektroskopisi
MSH	:	Melanosit uyarıcı hormon
MTIC	:	5- (3-metiltriazin-1-il) imidazol-4-karboksamit
Mtor	:	Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase
Mtt	:	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromit
MU1454	:	Birincil glioblastoma hücre hattı
MYCN	:	Temel sarmal döngü sarmal proteini 37
NA	:	Noradrenalin
NAD ⁺	:	Nikotinamid adenin dinükleotit
NB	:	Nöroblastoma
N1E-115	:	Fare Nöroblastoma hücre hattı
NCAM	:	Nöral hücre yapışma molekülü
NCCN	:	Ulusal kapsamlı kanser ağı
NEIL2	:	Nei Like DNA Glycosylase2
NER	:	Nükleotit eksizyon tamiri homolog rekombinasyon
Nf-kb	:	Nuclear Factor kappa B
NHEJ	:	Homolog olmayan uç birleştirme
NN	:	Sinir ağları
O ⁶ -MGMT	:	O ⁶ Metil Guanin Metil transferaz
36B10	:	Fare Monoklonal Anti-CPOX Antikoru
P21	:	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1
P27	:	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü p27 kip1
P53	:	Tümör baskılayıcı protein
PBS	:	Fosfat tamponlu salin
PC3	:	İnsan prostat
PCNA	:	Proliferatif hücre nükleer antijeninin
PD	:	Parkinson hastalığı
PD-1	:	Programlı ölüm <u>reseptörü</u> -1
PD-L1	:	Programlı ölüm ligandı-1
PEGDA	:	Poli dimetil akrilat
Phgg	:	Pediyatrik yüksek dereceli glioma
PI	:	Propidyum iyodür

PI3K	:	Phosphoinositide 3-kinases
PRb	:	Retinoblastoma proteini
PTX	:	Paklitaksel
qRT-PCR	:	Gerçek Zamanlı Kantitatif Ters Transkripsiyon PCR
R	:	Kısıtlama noktası
RAD18	:	E3 Ubiquitin Protein Ligase
RHEB	:	Beyinde zenginleştirilmiş Ras homologu
RING	:	Gerçekten ilginç yeni gen
RNS	:	Reaktif azot türlerinin
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
RT Buffer	:	Ters transkriptaz tamponu
RT	:	Reverse Transkriptaz
RT-PCR	:	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizi
SCN	:	Kiyazmatik çekirdek
Ser	:	Serin
SF268	:	İnsan glioblastoma hücre hattı
sHSP	:	Küçük Hsp
SMUG1	:	Strand-Selective Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase 1
SOD1-[Cu-Zn]	:	Bakır ve çinko içeren enzim Superoksit dismutaz enzimi
SOD2-[MnSOD]	:	Mangan içeren Superoksit dismutaz enzimi
SPSS	:	Sosyal Bilimler İçin İstatistik Programı
SRS	:	Stereotaktik radyo cerrahi
SVM	:	Destek vektör makinesi
t-AML	:	Akut miyeloid lösemiler
Thr	:	Treonin
TLS	:	Translezyon sentezi
TME	:	Tümör mikro ortamı
TMZ	:	Temozolomid
TNF- α	:	Tumor necrosis factor-alpha
TRADD	:	TNF reseptörü (TNFR) ile ilişkili ölüm alanı
U251	:	İnsan glioblastoma astrositoma hücre hattı

U87	:	İnsan U87 glioblastoma hücreleri
U937	:	İnsan histiyositik lenfoma
UDG	:	Urasil-DNA glikosilaz
WHO	:	Dünya sağlık örgütü
XRCC3	:	X-Ray Repair Cross Complementing 3



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. C6 Rat Glioblastoma Multiform Floresan mikroskop görüntüsü (10X).....	23
Şekil 2.2. Yaşa göre gliomların insidansı	23
Şekil 2.3. N1E-115 fare Nöroblastoma hücreleri floresan mikroskop görüntüsü (10X)	26
Şekil 2.4. Rat astrositlerinin floresan mikroskop görüntüsü (10X)	28
Şekil 2.5. Temozolomid mekanizmasının şematik gösterimi	30
Şekil 2.6. Paklitaksel'in anti-kanser etkileri	31
Şekil 2.7. Melatonin sentez basamakları.....	32
Şekil 2.8. Sterol biyosentez yolları	33
Şekil 2.9. Mitokondriyal SOD2'nin işlevi.....	35
Şekil 2.10. DNA onarım yolunun moleküler mekanizmaları, yol efektörleri ve biyolojik işlevleri.....	39
Şekil 2.11. (a)-Protein triyajı mekanizmasının hücre ölümü yollarına etkisi. (b)-Hem HSP'leri içeren renatürasyon yolu hem de ubiquitin-proteazom sistemini (UPS) içeren yıkım yolu	41
Şekil 2.12. Hücre döngüsü ve apoptoz.....	44
Şekil 2.13. Sitoplazma ve mitokondride Nükleer faktör κ B (Nf-kb) sinyalizasyon yolları	46
Şekil 2.14 Apoptozda ölüm reseptörü ve mitokondriyal yollar	49
Şekil 2.15. Kaspaz bağımlı ve Kaspaz bağımsız proapoptik faktörlerin çeşitli sinyallere yanıt olarak mitokondrilerden salınması.	51
Şekil 3.1. 37°C sıcaklıkta % 5 CO ₂ içeren inkübatör.....	56
Şekil 3.2. Kryotip viallerde hücre dondurma işlemi	57
Şekil 3.3. Temozolomid'in Kimyasal Yapısı.....	58
Şekil 3.4. Paklitaksel'in kimyasal yapısı	59
Şekil 3.5. Melatonin'in Kimyasal Yapısı.....	60
Şekil 3.6. Ergosterol Kimyasal Yapısı	61

Şekil 3.7. Kombinasyon ilaç uygulama plaka dizaynı	64
Şekil 3.8. QuantStudio™ 5 qRT-PCR cihazında kontrol ve uygulama gruplarının amplifikasyon görüntüsü	74
Şekil 4.1. C6 hücre serisinde 72 saat süreyle 15,625-2000 μ M doz aralıklarında Temozolomid uygulamasının hücre canlılığına etkisi	80
Şekil 4.2. C6 hücre serisi 15,625-2000 μ M doz aralıklarında Temozolomid uygulamasına ait MTT test görüntüsü	80
Şekil 4.3. C6 hücre serisinde 72 saat süre boyunca Temozolomid uygulaması sonrasında MTT test verileri kullanılarak yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değeri.....	81
Şekil 4.4. N1E-115 hücre serisinde 72 saat süreyle 15,625-2000 μ M doz aralıklarında Temozolomid uygulamasının hücre canlılığına etkisi	82
Şekil 4.5. N1E-115 hücre serisi 15,625-2000 μ M doz aralıklarında Temozolomid uygulamasına ait MTT test görüntüsü	82
Şekil 4.6. N1E-115 hücre serisinde 72 saat süre boyunca Temozolomid uygulaması sonrasında MTT test verileri kullanılarak yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değeri.....	83
Şekil 4.7. C6 hücre serisinde 72 saat süreyle 0,78 nM-25 nM doz aralıklarında Paklitaksel uygulamasının hücre canlılığına etkisi	84
Şekil 4.8. C6 hücre serisi 0,78 nM -25 nM doz aralıklarında Paklitaksel uygulamasına ait MTT test görüntüsü.....	84
Şekil 4.9. C6 hücre serisinde 72 saat süre boyunca Paklitaksel uygulaması sonrasında MTT test verileri kullanılarak yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değeri.....	85
Şekil 4.10. N1E-115 hücre serisinde 72 saat süreyle 0,78 nM-25 nM doz aralıklarında paklitaksel uygulamasının hücre canlılığına etkisi	86
Şekil 4.11. N1E-115 hücre serisi 0,78 nM -25 nM doz aralıklarında Paklitaksel uygulamasına ait MTT test görüntüsü	86
Şekil 4.12. N1E-115 hücre serisinde 72 saat süre boyunca Paklitaksel uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değeri	87
Şekil 4.13. C6 hücre serisinde 72 saat süreyle 31,25 μ M-4000 μ M doz aralıklarında Melatonin uygulamasının hücre canlılığına etkisi	88
Şekil 4.14. C6 hücre serisi 31,25 μ M-4000 μ M doz aralıklarında Melatonin uygulamasına ait MTT test görüntüsü	88

Şekil 4.15. C6 hücre serisinde 72 saat sonunda Melatonin molekülünün MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değeri	89
Şekil 4.16. N1E-115 hücre serisinde 72 saat süreyle 31,25 µM-4000 µM doz aralıklarında Melatonin uygulamasının hücre canlılığına etkisi	90
Şekil 4.17. N1E-115 hücre serisi 31,25 µM-4000 µM doz aralıklarında Melatonin uygulamasına ait MTT test görüntüsü	90
Şekil 4.18. N1E-115 hücre serisinde 72 saat sonunda Melatonin molekülünün MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değeri	91
Şekil 4.19. C6 hücre serisinde 72 saat süreyle 3,125 µM-400 µM doz aralıklarında Ergosterol uygulamasının hücre canlılığına etkisi	92
Şekil 4.20. C6 hücre serisi 3,125 µM-400 µM doz aralıklarında Ergosterol uygulamasına ait MTT test görüntüsü	92
Şekil 4.21. C6 hücre serisinde 72 saat süre sonunda Ergosterol molekülünün MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değeri	93
Şekil 4.22. N1E-115 hücre serisinde 72 saat süreyle 3,125 µM-400 µM doz aralıklarında Ergosterol uygulamasının hücre canlılığına etkisi	94
Şekil 4.23. N1E-115 hücre serisi 3,125 µM-400 µM doz aralıklarında Ergosterol uygulamasına ait MTT test görüntüsü	94
Şekil 4.24. Ergosterol molekülünün N1E-115 hücre serisi üzerinde 72 saat uygulama sonrasında MTT testi verileri kullanılarak yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değeri.	95
Şekil 4.25. C6 Hücre serisi Temozolomid IC ₅₀ ve kombinasyon uygulamaları	96
Şekil 4.26. C6 Hücre serisi Temozolomid IC ₅₀ ve kombinasyon uygulamalarına ait MTT testi görüntüsü. TMZ:Temozolomid, M: Melatonin, E: Ergosterol, PTX: Paklitaksel	96
Şekil 4.27. Glioma C6 hücre serisinde 72 saat süre ile ½ IC ₅₀ Temozolomid ve Temozolomid kombinasyonları uygulaması sonrasında MTT testi ile belirlenen % canlı hücre oranları	97
Şekil 4.28. C6 Hücre serisi Temozolomid ½ IC ₅₀ ve kombinasyon uygulamalarına ait MTT testi görüntüsü.....	97
Şekil 4.29. Nöroblastoma N1E hücre serisinde 72 saat süre ile Temozolomid ve Temozolomid kombinasyonları uygulaması sonrasında MTT testi ile belirlenen % canlı hücre oranları	99

Şekil 4.30. N1E-115 Hücre serisi TMZ IC ₅₀ ve kombinasyon uygulamalarına ait MTT testi görüntüsü	100
Şekil 4.31. Nöroblastoma N1E-115 hücre serisinde 72 saat süre ile Temozolomid ve Temozolomide kombinasyonları uygulaması sonrasında MTT testi ile belirlenen % canlı hücre oranları.....	101
Şekil 4.32. N1E-115 Hücre serisi Temozolomid ½ IC ₅₀ ve kombinasyon uygulamalarına ait MTT testi görüntüsü.....	101
Şekil 4.33. Astrosit C8 hücre serisinde 72 saat süre ile Temozolomid ve Temozolomid kombinasyonları uygulaması sonrasında MTT testi ile belirlenen % canlı hücre oranları	102
Şekil 4.34. Astrosit C8 Hücre serisi TMZ IC ₅₀ ve kombinasyon uygulamalarına ait MTT testi görüntüsü.....	103
Şekil 4.35. Astrosit C8 hücre serisinde 72 saat süre ile Temozolomid ve Temozolomid kombinasyonları uygulaması sonrasında MTT testi ile belirlenen % canlı hücre oranları	104
Şekil 4.36. C8 Hücre serisi Temozolomid ½ IC ₅₀ ve kombinasyon uygulamalarına ait MTT testi görüntüsü.....	104
Şekil 4.37. C6 hücre serisi TALİ sitometre canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri .	106
Şekil 4.38. N1E-115 hücre serisi TALİ sitometre canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri	107
Şekil 4.39. C6 hücre serisinde, Tali görüntü tabanlı sitometri kullanılarak Annexin V/Propidyum İyodid ile boyandıktan sonra saptanan canlı hücrelerin yüzdesi	108
Şekil 4.40. TALİ sitometre canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri	109
Şekil 4.41. TALİ sitometre canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri	110
Şekil 4.42. N1E-115 hücre serisinde, Tali görüntü tabanlı sitometri kullanılarak Annexin V/Propidyum İyodid ile boyandıktan sonra saptanan canlı hücrelerin yüzdesi	111
Şekil 4.43. Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C6 hücre serisi üzerinde SOD, SOD2 ve CAT Antioksidan sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi q RT-PCR analizi	114

Şekil 4.44. Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C6 hücre serisi üzerinde Mlh 1, Neil 2, Exo 1, Rad 18, Xrcc 3, Smug 1 DNA Tamir sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi	115
Şekil 4.45. Temozolomid, Temozolomid - Melatonin, Temozolomid - Ergosterol, Temozolomid - Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C6 hücre serisi üzerinde Hsp 27, Hsp 60, Hsp 70, Hsp 90 Isı şok moleküler şaperon sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi	117
Şekil 4.46. a) Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C6 hücre serisi üzerinde Nf-kb, Ikb- α , P13k, Akt Cox 2 ve mTOR yaşam sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi	119
Şekil 4.47. Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C6 hücre serisi üzerinde P21, P27, P53 hücre döngüsü sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi	120
Şekil 4.48. a) Temozolomid, Temozolomid-Melatonin, Temozolomid-Ergosterol, Temozolomid-Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C6 hücre serisi üzerinde Bcl-2, Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 8, apaf1, Tnf- α ve Cyt-c yaşam sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi	122
Şekil 4.49. Temozolomid, Temozolomid - Melatonin, Temozolomid - Ergosterol, Temozolomid - Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen N1E-115 hücre serisi üzerinde Sod, Sod 2 ve Kat Antioksidan sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi ..	125
Şekil 4.50. Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen N1E-115 hücre serisi üzerinde Mlh 1, Neil 2, Exo 1, Rad 18, Xrcc 3, Smug 1 Antioksidan sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi	126
Şekil 4.51. Temozolomid, Temozolomid - Melatonin, Temozolomid - Ergosterol, Temozolomid - Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen N1E-115 hücre serisi üzerinde Hsp 27, Hsp 60, Hsp 70, Hsp 90 Isı şok moleküler şaperonlar sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi	127

Şekil 4.52. a) Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen N1E-115 hücre serisi üzerinde Nf-kb, Ikb- α , P13k, Akt yaşam sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi...	129
Şekil 4.53. Temozolomid, Temozolomid - Melatonin, Temozolomid - Ergosterol, Temozolomid - Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen N1E-115 hücre serisi üzerinde P21, P27, P53 hücre döngüsü sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi.....	130
Şekil 4.54. a) Temozolomid, Temozolomid - Melatonin, Temozolomid - Ergosterol, Temozolomid - Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen N1E-115 hücre serisi üzerinde Bcl-2, Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 yaşam sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi	132
Şekil 4.55. Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C8 hücre serisi üzerinde Sod 1, Sod 2 ve Kat Antioksidan sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi	135
Şekil 4.56. Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C8 hücre serisi üzerinde Mlh 1, Neil 2, Exo 1, Rad 18, Xrcc 3, Smug 1, DNA Tamir sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi	136
Şekil 4.57. Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C8 hücre serisi üzerinde Hsp 27, Hsp 60, Hsp 70, Hsp 90 Isı şok moleküler şaperonlar sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi	138
Şekil 4.58. Temozolomid, Temozolomid - Melatonin, Temozolomid - Ergosterol, Temozolomid - Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C8 hücre serisi üzerinde Nf-kb, Ikb- α , P13k, Akt, mTOR yaşam sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi.....	140
Şekil 4.59. Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C8 hücre serisi üzerinde P21, P27, P53 hücre döngüsü sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi	141
Şekil 4.60. Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C8 hücre serisi üzerinde Bcl-2, Bax, Cyt-c, Apaf 1, Tnf- α , Kaspaz 8 apoptoz sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi	142

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Dünya Sağlık Örgütü tarafından, 2016 yılında yapılan Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Sınıflandırması.....	9
Çizelge 3.1. MTT Testi ile belirlenen IC ₅₀ doz çizelgesi.....	63
Çizelge 3.2 RNA miktarları ve RNA saflıkları.....	68
Çizelge 3.3. cDNA Mix Protokolü.....	69
Çizelge 3.4. qRT-PCR reaksiyonunda kullanılan primer dizileri	70
Çizelge 3.5. cDNA mix hazırlama protokolü.....	73
Çizelge 3.6. Western Blot Analizinde kullanılan proteinler	75
Çizelge 4.1. C6 hücre serisinde 72 saat süreyle Temozolomid-Paklitaksel Temozolomid-Melatonin, Temozolomid-Ergosterol uygulaması sonucunda TALİ sitometre ile belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları ve yüzdeleri.....	108
Çizelge 4.2. N1E-115 hücre serisinde 72 saat süreyle Temozolomid-Paklitaksel, Temozolomid-Melatonin, Temozolomid-Ergosterol uygulaması sonucunda TALİ sitometre ile belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları ve yüzdeler.	112
Çizelge 4.3. C6 hücre serisinde, Kontrol ve deney gruplarında Antioksidan, DNA Tamir, Isı Şok, Hücre Döngüsü Kontrolü, Yaşam Sinyal ve Apoptoz yolları genlerinin göreceli kat değişimi qRT-PCR analizi (TMZ: Temozolomid, TM: TMZ-Melatonin, TE:TMZ-Ergosterol.....	113
Çizelge 4.4. N1E-115 hücre serisinde, Kontrol ve deney gruplarında Antioksidan,DNA Tamir, Isı Şok, Hücre Döngüsü Kontrolü, Yaşam Sinyal ve Apoptoz yolları genlerinin göreceli kat değişimi qRT-PCR analizi	124
Çizelge 4.5. Astrosit hücre serisinde, Kontrol ve deney gruplarında Antioksidan, DNA Tamir, Isı Şok, Hücre Döngüsü Kontrolü, Yaşam Sinyal ve Apoptoz yolları genlerinin göreceli kat değişimi qRT-PCR analizi	134

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Malign glioma, yıllık insidansı 5/100.000 birey olan en yaygın primer beyin tümörü türüdür (Jovcevska, Kocevar & Komel, 2013). Tahmini verilere göre, dünya genelinde 2018 yılı verileri incelendiğinde yeni teşhis edilmiş kanser vakası 18,1 milyon ve kanser kaynaklı ölüm 9,6 milyon olarak kaydedilmiştir (Ferlay vd. , 2019). Birincil merkezi sinir sistemi (MSS) maligniteleri, tüm kanserlerin % 1,4'ünü oluşturmaktadır (Vargo, 2020). Merkezi sinir sistemi üzerinde primer (birincil) ve sekonder (metastatik) kaynaklı oluşabilen bu tümörler, hastalarda sağ kalım oranını düşürmektedir. Dünya genelinde, primer malign beyin tümörlerinin yıllık insidansı yaklaşık olarak 24.000 vakadır (Cheng, Morshed, Auffinger, Tobias & Lesniak, 2014).

Beyin tümörleri beyinden köken alarak oluşan primer beyin tümörleri ve vücudun diğer bölgelerinden köken alarak gelişen sekonder beyin tümörleri olarak iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Birincil beyin tümörleri, farklı tipteki beyin hücrelerinden kaynaklanabileceği gibi beynin çevresindeki zarlardan (meninksler), sinirler veya bezlerden de ortaya çıkabilir. Beynin gliyal dokusundan kaynaklanan glioma, en yaygın görülen primer beyin tümör tipidir. Gliomalar, astrositoma, oligodendroglioma ve ependimomlar gibi çeşitli alt türler içerir. Astrositomlar ayrıca derece I (pilositik), derece II (fibriler), derece III (anaplastik) ve derece IV (Glioblastoma multiforme veya GBM) olarak sınıflandırılır (Bhowmik, Khan & Ghosh, 2015).

Glioblastoma multiforme (GBM) bağ dokusunun kötü huylu tümörlerinden olup, en yıkıcı birincil beyin tümörü olarak kabul edilir. Genomik dengesizlik, fosfoinositid 3-kinaz (P13k) / protein kinaz B (Akt) yolağının aktivasyonu, epidermal büyüme faktörü reseptöründeki (Egfr) regülasyonun bozulması GBM patolojisinde sık karşılaşılan mekanizma anormalleridir. GBM heterojen, invaziv bir yapıya sahiptir, ayrıca

kemoterapi ve radyasyona direnç ile karakterize edilir (Jena, McErlean, & McCarthy, 2020; Tavana vd. , 2020). GBM teşhisi akabinde ilk standart tedavi adımları, maksimum güvenli rezeksiyon, eş zamanlı TMZ ile radyasyon ve ardından adjuvan TMZ tedavisinden oluşur. Bu kombine tedaviye rağmen, GBM için prognoz, yaklaşık 15 aylık bir medyan sağkalım ve % 30 oranında 2 yıllık sağkalım oranı ile oldukça kötü seyreder (Dixit & Kumthekar, 2017). Gelişen tanı araçları ve terapötik yollara rağmen, beyin tümörlerinin tedavisi halen zorlu bir süreç olarak görülmektedir (Cheng, Morshed, Auffinger, Tobias & Lesniak, 2014; Bjoern H Menze vd. , 2014). Kan yoluyla taşınması gerçekleştirilen kemoterapötik ilaçların etki gösterebilmesi için kan damarı bariyerini aşması ve maksimum sayıda tümör hücrelerine nüfus etmesi gerekmektedir. Beynin lokal mikro çevresi, ilaçların primer ve sekonder beyin tümörlerine etkinliğini engelleyebileceğinden, ilaçların ayrıca, bu mikroortam tarafından tümör hücreleri mikro-çevresindeki direnç mekanizmaları ile baş etmesi gerekmektedir (Arvanitis, Ferraro & Jain, 2020).

GBM tedavisi, 500 Dalton'dan büyük moleküllerin beyne girişini engelleyen kan beyin bariyeri (KBB)'nin varlığı nedeniyle kısıtlıdır. KBB, merkezi sinir sistemi (MSS)'nin homeostazisini korumak için molekül geçişlerini denetler. Beyin endotelyum hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar normal, paraselüler taşınmaya izin vermez, molekülleri transselüler taşınmaya zorlar, bu da KBB'yi seçici bir fiziksel engel kılar (Jovcevska vd. , 2013). Beyin tümörlerinin heterojen mikro ortamdan köken alan yapısı ve yüksek nüks oranları GBM tedavisi için klinik olarak denenilen tedavi seçeneklerini de başarısız kılmıştır. Ayrıca, GBM'nin etkili bir şekilde tedavi edilebilmesi, tümörün hassas olarak görselleştirilmesi ve etkili bir kemoterapötik uygulamayı gerektirir. GBM'nin infiltratif doğası, tümör teşhisini ve tam tümör rezeksiyonunu sınırlar.

Sonuç olarak, GBM'nin tedavi seçenekleri sınırlıdır. GBM tedavisi için tüm iyileştirme çabaları yetersiz kalmakta, GBM en ölümcül kanserlerden biri olmaya devam etmektedir. GBM'nin biyolojisinde yer alan ana yolları anlamak ve tedavi için önemli hedefleri belirlemek tedavide başarı sağlamak için elzemdir. GBM hastaları diğer kanserli vakalar ile kıyaslandığında çok düşük sağkalım oranı gösterdiğinden, daha etkili ve daha az toksik tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır (Reichel vd. , 2020; Schonberg, Lubelski, Miller & Rich, 2014).

Nöroblastoma (NB), nöral krest hücre kaynaklı, pediatrik bir sempatik sinir sistemi tümörüdür. Nöroblastomların klinik seyri kendiliğinden gerileme, benign gangliyo nöromaya farklılaşma ya da agresif bir şekilde ilerleme şeklinde görülebilir. Kanserden ölen çocuk vakaların % 15'inden fazlası NB'lu hastalar oluştururken (Ackermann vd. , 2018; Brodeur, 2018; Joshi, 2020) metastatik oluşan NB hastaları için ise, 5 yaşından sonra % 40 gibi çok düşük bir genel sağkalım oranı mevcuttur. NB biyolojisi, genetik, klinik ve morfolojik açılarından oldukça heterojen bir hastalıktır ve bu nedenle tedavide başarıyı yakalamak zordur. NB'nin ilerleme mekanizmalarını anlamak, sağkalımda başarıyı yakalamak için tedaviyi daha etkin kılma çabaları devam etmektedir (Valter, Zhivotovsky & Gogvadze, 2018).

Glioblastom tedavisinde anjiogenez hedefli etkinliğe sahip TMZ, ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanan ilk oral kemoterapi ajanıdır (Graham & Cloughesy, 2004; C. Sun vd. , 2016). Glioma tedavisinde ana kemoterapi olarak kullanılan TMZ, tümör proliferasyonunu önlemek için DNA'yı guaninin O⁶ pozisyonunda metilleyerek işlev gören bir alkilleyici ön ilaçtır. DNA replikasyonu sırasında, metillenmenin devam etmesi, guanin ile sitozin yerine timin eşleşmesine neden olarak genomik dengesizliğe ve sonunda hücre ölümüne yol açar. TMZ kan beyin bariyerinden iyi nüfuz eden oral bir ajandır (Chua, Nafziger & Leung, 2019; Daniel vd. , 2019). TMZ, glioblastom üzerinde güçlü antikanser etki oluşturması sebebiyle GBM'nin klinik tedavisinde yaygın olarak kabul görmüş ve şu an için en geçerli standart kemoterapi ajanı olmuştur. Ancak aynı TMZ tedavisi uygulanan hastaların genel ve ilerlemesiz sağkalımları büyük farklılıklar göstermiştir. Bunun nedeni, hasta moleküler arka planlarıyla ilişkili olan bazı GBM dokularında, TMZ'ye karşı oluşan farklı hassasiyetleridir. Hastalar arasında oluşan bu biyolojik heterojenlik, GBM'nin kişiselleştirilmiş tedavi ve prognozunun iyileştirilmesi önündeki en önemli engellerden biridir ve farklı tedavi yanıtlarına sebep olmaktadır (Cai vd. , 2020).

Paklitaksel, taksan grubuna ait, Taksol olarak da bilinen önemli bir kanser kemoterapötikidir. Anti tümör etkisi, mikrotübül stabilitesi ile ilgilidir (Erdemoğlu & Şener, 2000). Diğer tübülün bağlayıcı antikanser ilaçları, tübülünün mikrotübüllere birleşmesini engellerken, paklitaksel, tübülünün mikrotübüllere birleşmesini indükler ve mikrotübüllerin ayrışmasını önler. Ayrıca, hücre döngüsü ilerlemesini G2 / M fazında bloke ederek hücrelerin mitotik bölünme geçirmesini engeller ve kanser hücrelerinin

büyümesinin engeller (Horwitz, 1994; Zhu, Chen & letters, 2019). Taksol bu etki mekanizması ile tümör hücrelerinin apoptozunu sağlarken, birçok kanser tedavisinde model bir anti kanser ilaç olarak kullanılır (Bui vd. , 2016).

Pineal bezin ana ürünü olan melatonin, ardışık enzimatik bir yol ile öncüsü triptofandan sentezlenen amfilik bir indolamindir. Hem ökaryot hem de prokaryotlar da bulunabilen bir moleküldür. Memelilerde epifiz bezinden günlük veya mevsimsel bir şekilde ritmik olarak salgılanan melatonin, epifiz bezinin yanı sıra, retina, bağırsak kemik iliği, lökositler, beynin ve cildin bazı bölgelerinde de üretilir. Vücutta, en yüksek Melatonin konsantrasyonu beyindedir. Melatoninin hücreler üzerinde geniş biyolojik etki spektrumuna sahip olmasını yanında, genel olarak, karsinogenezi azalttığı ve kanser hücre büyümesini engellediği bilinmektedir. Özellikle, meme, kolon ve mide gibi birçok kanser türü üzerindeki inhibitör etkileri belirlenmiştir (H. Ma vd. , 2018; Mayo vd. , 2019; Moradkhani vd. , 2020).

Tıbbi mantarlar, antioksidan, antimikrobiyal, antiproliferatif ve organ koruyucu özelliklere sahip, sağlık açısından oldukça etkili türlerdir. Günümüzde, tıbbi mantarların biyoaktif antioksidan bileşiklerin önde gelen kaynağı olduğu bilinmektedir ve etkili ve güvenli doğal antioksidan araştırma çabaları önem kazanmıştır (Singh & Passari, 2019).

Pro-vitamin D2 olarak da bilinen Ergosterol, mantarların hücre zarında önemli bir role sahip (Al-Rabia, Mohamed, Ibrahim & Asfour, 2020) ve hemen hemen tüm ökaryotik mantarlarda bulunan önemli bir biyoaktif steroldür. Yenilebilir mantarların meyve veren gövdelerinde bulunan ergosterol (ergosta-5,7,22-ergotrien-3 β -ol) mantar sterollerinin toplam içeriğinin % 83-89'unu oluşturur. Anti-tümör ve immüno modülatör aktivite gösterir ve katı tümörlerle ilişkili anjiyogenez sürecini inhibe eder, tümör büyümesini önler ve kanserden etkilenen hücrelerin göçünü ve çoğalmasını önler (Ng & Wang, 2005; Raina, Sodhi, Sethi & Singh, 2014; Singh & Passari, 2019).

Kemoterapi, farklı beyin tümörü tiplerinin tedavisinde en yaygın yöntemdir (Zheng vd., 2017). Ancak özellikle GBM ve NB hastalarında kullanılan kemoterapötiklerin ciddi yan etkileri ve kanser hücrelerinin kullanılan ilaçlara karşı zamanla direnç geliştirmesi ve terapötik maddelerin kan beyin bariyeri tarafından girişlerinin engellenmesi, tedaviyi olumsuz etkilemektedir (Cheng vd. , 2014; Lowenstein & Castro, 2011). Bu sebeple, hastalığın yönetimi için kombine tedavi stratejileri

oluşturulmaktadır. TMZ'in diğer ilaçlarla kombine kullanımının tek başına kullanımından, daha etkili bir sonuç ortaya koyduğu belirtilmektedir (Sun vd. , 2016). Ancak henüz beyin tümörleri için kombine tedavi uygulamaları yenidir ve onay almış çok fazla seçenek oluşmamıştır. Adjuvan tedaviler, kemoterapi tedavilerine ek olarak kullanılan ilacın etkinliğini arttırmasının yanısıra, ilacın sebebiyet verdiği yan etkileri de ortadan kaldıran yardımcı ajanlardır (Cheng vd. , 2014). Bu nedenle, KBB'ni geçebilen ve tümör hücrelerini hedefleyebilen kombine terapötik tedavilerin geliştirilmesi ve böylece sağlıklı hücrelere karşı yan etkiyi azaltarak verimliliği ve hasta sağkalımını arttıran yeni çalışmalar yapılmalıdır (Zheng vd. , 2017).

Tez kapsamında, beyin tümörlerinde güncel tedavide uygulanan kombine kemoterapi rejimine alternatif iki yeni kombine tedavi modelinin etkinliği araştırılmıştır. İki farklı beyin tümör ve bir adet sağlıklı hücre hattı (C6, N1E-115, C8) kullanılarak temozolomid ile birlikte oluşturulan melatonin, ergosterol ve paklitaksel kombine kullanımları denenmiştir. Kullanılan her kombinasyonun, kanser hücre sinyal yollarındaki spesifik moleküllere etkileri moleküler düzeyde genetik ve proteomik çalışmalar ile araştırılmıştır. Bu kapsamda glioblastoma ve nöroblastoma üzerinde kapsamlı bir veri elde edilmiş, bundan sonra yapılacak çalışmalar için araştırmacılara önemli bir veritabanı sağlanmıştır. Ayrıca tez ile elde edilen spesifik sinyal moleküllerinin daha sonra yapılacak ilaç tasarım çalışmalarına ışık tutabileceği düşünülmektedir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, genetik mutasyonların neden olduğu anormal ve kontrolsüz hücre büyümesi ile karakterize edilen hastalıklar topluluğudur (Martínez-Jiménez vd. , 2020). Dünya çapında her yıl 8 milyondan fazla insanın ölümüne sebep olmaktadır. Bu bilanço ile ölümcül hastalık sıralamasında ikinci sırada gelmektedir (The, of Whole & Nature, 2020). Kanser sınırsız bir çoğalmadır. Çok hücreli organizmalarda, organlar uygun boyuta ulaştığında hücreler bölünmeyi durdurur, ancak kanserli hücreler bölünmeye devam eder. Kanserli hücreler, hayatta kalmak için yüksek adaptif yeteneklere sahiptir. Kendilerini çevreleyen hücrelere etki ederek onları yok ederler ve kendi hızlandırılmış çoğalmaları ve büyümeleri için alan yaratırlar (Tripathy, Pradhan & Development, 2020). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2020 yılında yapılan istatistiksel veri sunan bir çalışmada, cinsiyet ve kanser türüne göre tahmini yeni invaziv kanser vakası sayısı sunulmaktadır. Toplamda, teşhis edilen yaklaşık kanser vaka sayısının 1.806.590 kişi olması öngörülmektedir, bu da her gün yaklaşık 4.950 yeni vakanın eşdeğeridir (Siegel, Miller & Jemal, 2020).

2.1.1. Beyin Tümörleri

Beyin tümörü, merkezi sinir sisteminde anormal hücrelerin aşamalı olarak eklenmesiyle yapılandırılan bir doku kümesidir (Anitha & Murugavalli, 2016). Beyin tümörleri iyi huylu veya düşük dereceli (derece I ve II), kötü huylu veya yüksek dereceli (derece III ve IV) olarak sınıflandırılmıştır. İyi huylu tümörler yavaş büyürler, vücudun başka hiçbir yerine yayılamaz ve daha az agresif tutum sergilemektedir. Bununla birlikte, malign tümörler tanımlanamayan sınırlarla hızla büyürler. Beyin tümörleri, beynin kendisinden köken alan primer (birincil) malign tümörler ve vücudun başka bir

bölgesinden kaynaklanabilen sekonder (ikincil) malign tümörler olmak üzere 2 gruptan oluşmaktadır (Mohsen, El-Dahshan, El-Horbaty, Salem & Journal, 2018). Primer beyin tümörleri, çok nadir, invaziv olmayan ve cerrahi olarak tedavi edilebilen düşük dereceli gliomalardan yetişkinlerde sık görülen ve neredeyse tedavi edilemez olan en yaygın beyin tümörü Glioblastoma multiforme'ye kadar uzanır. Bu hastalarda bir veya düzinelerce beyin metastazı olabilir. Radyasyon veya kemoterapiye oldukça duyarlı veya yüksek derecede direnç gösteren bir malignite olabilir. Bu belirgin heterojenlik nedeniyle, beyin tümörleri için prognostik özellikler ve tedavi seçenekleri her hastaya bireysel olarak uygulanmalıdır (Guo, Wang, Wang & Zhang, 2019; Nabors vd. , 2013). Kanseri hücreleri beyine diğer organlardan yayıldığında ikincil beyin tümörü oluşur (Thejaswini, Bhat & Prakash, 2019). Sekonder (metastatik) beyin tümörleri beyinde yaygın görülen tümörler olup sık ya da nadir görüntüleme bulguları ile karşımıza çıkabilmektedirler ayrıca morbidite ve mortalite için önemli sonuçları vardır (Apaydın, 2020). En sık görülen ikinci tümörler, beyin ve sinir sistemine ait tümör türleridir (%26), ardından yumuşak doku sarkomları (%7, neredeyse yarısı rabdomyosarkom), Nöroblastoma (%6), Hodgkin dışı lenfomalar, Burkitt lenfoma (%6), renal (Wilms) tümörler (%5) ve Hodgkin lenfomalar (%3) gelmektedir (Rebecca L Siegel, Miller & Jemal, 2016). Yeni nöro-görüntüleme tekniklerinin kullanımı ile birlikte son 30 yılda beyin tümörlerinin görülme sıklığı artmıştır. Uygulanan mevcut tedaviler, ölümcül beyin tümörleri için prognozu iyileştirmemiştir. Çok sayıda potansiyel risk faktörü epidemiyolojik çalışmalar tarafından araştırılmış ve şu ana kadar beyin tümörleri için doğrulanmış tek ilişki yetişkinlerde ve çocuklarda riski arttıran iyonlaştırıcı radyasyon ve yetişkinlerde riski azaltan alerji öyküsü etkenleridir (Fisher, Schwartzbaum, Wrensch & Wiemels, 2007; Ostrom vd. , 2019).

Onlarca yıllık araştırmalara rağmen, beyin tümörleri, tüm kanser türleri arasında en ölümcüller arasındadır. Bu tümörlerin hemen hemen tüm geleneksel ve yeni tedavilere karşı direnç göstermesi kısmen, nöral dokuların hücre-içsel ve mikro-çevresel özelliklerinin heterojenitesi ile ilgilidir (Boire, Brastianos, Garzia & Valiente, 2020).

2.2. Sınıflandırma

Dünya Sağlık Örgütü 2016 yılında, Merkezi Sinir Sistemi (MSS) Tümörlerinin sınıflandırmasını (Çizelge 2.1.) yaparken, birçok tümör oluşumunu tanımlamak için, ilk

kez, histolojiye ek olarak moleküler parametreler kullanmış ve böylece MSS tümör tanısının moleküler düzeyde nasıl yapılandırılması gerektiğine dair bir şablon oluşturmuştur (Louis vd. , 2016). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, gliomalar, pilositik astrositoma (derece I), düşük dereceli astrositom (derece II), anaplastik astrositom (derece III) ve glioblastoma multiforme (derece IV) olan hücre tipi ve malignite derecesine göre sınıflandırılır (de Melo, Piva & Tedesco, 2020). "Multiforme" terimi, bu tip tümörün klinik prezentasyon, patoloji, genetik özellikler ve tedaviye yanıt açısından heterojenliğini yansıtır. Gliomaların yeni sınıflandırması, prognozu daha iyi yakalayan "birleşik tanıya" ulaşmak için moleküler özelliklere ve histolojiye dayanmaktadır. Glioblastomlar, tüm gliomaların % 60-70'ini, anaplastik astrositomlar % 10-15'ini, anaplastik oligodendrogliomlar ve anaplastik oligoastrositomlar % 10'unu ve geri kalan % 5-20'sini anaplastik ependimomlar ve anaplastik gangliogliomalar gibi daha az yaygın tümör tipleri oluşturmaktadır. En yaygın beyin tümörleri, sistemik kanserlerden, menenjiyomlardan ve gliomlardan, özellikle Glioblastomdan kaynaklanan intra-kraniyal metastazlardır (McFaline-Figueroa & Lee, 2018).

Çizelge 2.1. Dünya Sağlık Örgütü tarafından, 2016 yılında yapılan Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Sınıflandırması (Louis vd. , 2016)

DÜNYA SAĞLIK ÖRGÜTÜ MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ TÜMÖR SINIFLANDIRMASI			
Difüz Astrositik Ve Oligodendrogliyal Tümörler		Nöronal Ve Nöronal-Gliyal tümörler	
Diffüz astrositoma, "IDH-mutant"	9400/3	Disembriyoplastik nöroepitelyal tümörler	9413/0
Gemistositik astrositom, "IDH-mutant"	9411/3	Gangliositoma	9492/0
Diffüz astrositom, "IDH- yabancı tip"	9400/3	Ganglioglioma	9505/1
Diffüz astrositoma, "NOS"	9400/3	Anaplastik ganglioglioma	9505/3
		Serebellumun displastik gangliositoma (Lhermitte-Duclos)	9493/0
Anaplastik astrositom IDH-mutant	9401/3	Desmoplastik infantil astrositom ve ganglioglioma	9412/1
Anaplastik astrositom "IDH- yabancı tip"	9401/3	Papiller glionöronal tümör	9609/1
Anaplastik astrositom NOS	9401/3	Rozet oluşturan glionöronal tümör	9609/1
		Diffüz leptomeningeal glionöronal tümör	
Glioblastoma, "IDH- yabancı tip"	9440/3	Santral nörositom	9606/1
Dev hücreli glioblastom	9441/3	Ekstraventriküler nörositom	9606/1
Gliosarkoma	9442/3	Serebellar liponörositom	9606/1
Epiteloid glioblastoma	9443/3	Paraganglioma	8093/1
Glioblastom IDH mutant	9445/3 *		
Glioblastom NOS	9443/3	Pineal Bölge Tümörleri	
		Pineositoma	9361/1
Diffüz Orta Hat Gliomu (midline glioma) H3 K27M-mutant	9385/3 *	Orta diferansiyasyonlu inel parankimal tümörler (PPTID)	9362/3
		Pineoblastoma	9362/3
Oligodendroglioma IDH-mutant ve 1p-19q co-delesyon	9450/3	Pineal bölgenin papiller tümörleri	9396/3
Oligodendrogliom NOS	9450/3		
		Embriyonel tümörler	
Anaplastik oligodendrogliom IDH-mutant ve 1p/19q co-delesyon	9451/3	Medulloblastom (genetik tanımlama)	9475/3 *
Anaplastik oligodendrogliom NOS	9451/3	Medulloblastom, WNT-aktif	9476/3
		Medulloblastom, SHH-aktif ve TP53 mutant	9471/3
		Medulloblastom, SHH aktif ve TP53-yabancı tip	9471/3
Oligoastrositoma, NOS	9382/3	Medulloblastom, non-WNT/non-SHH grup 3 ve grup 4	9477/3
Anaplastik oligoastrositoma NOS	9382/3	Medulloblastom (histolojik tanımlama)	
		Medulloblastom klasik tip	9470/3
Diğer Astrositik Tümörler		Medulloblastom desmoplastik/noduler	9471/3
Pilositik astrositoma	9421/1	Medulloblastom yaygın nodüler tip	9471/3
Pilomiksoid astrositoma	9425/3	Medulloblastom dev hücreli/anaplastik	9474/3
Subependimal dev hücreli astrositoma	9384/1	Medulloblastom, NOS	9470/3
Pleomorf ksantoastrositoma	9424/3	Çok tabakalı rozetlerden oluşan embriyonel tümör C19MC-değişken	9478/3 *
Anaplastik pleomorf ksantoastrositoma	9424/3	Çok tabakalı rozetlerden oluşan embriyonel tümör NOS	9478/3
		Medulloepitelyoma	9601/3

Ependimal Tümörler		CNS Nöroblastoma	9600/3
Subependimomlar	9383/1	CNS Ganglionöroblastoma	9490/3
Miksopapiller ependimom	9394/1	Embriyonel Tümör NOS	9473/3
Ependimoma	9391/3	Atipik teratoid/rabdoid tümör	9608/3
Papiller ependimom	9393/3	CNS Rabdoid özellik gösteren santral sinir sistemi embriyonel tümörü	9506/3
Berrak hücreli ependimom	9391/3		
Tanisitik ependimom	9391/3	Kranial ve paraspinal sinir tümörleri	
Ependimom, RELA-füzyon pozitif	9396/3 *	Schwannom	9560/0
Anaplastik ependimom	9392/3	Sellüler Schwannom	9560/0
		Pleksiform Schwannom	9560/0
Diğer Gliomlar			
3. ventrikülün koroid gliomu	9444/1		
Anjiyjenik glioma	9431/1		
Astroblastoma	9433/3		
Koroid Pleksus Tümörleri			
Koroid pleksus papilloma	9390/0		
Atipikal koroid pleksus papilloma	9390/1		
Koroid pleksus karsinoma	9390/3		

2.3. Gliomaların Teşhis Yöntemleri

Gliomalar için, multiparametrik manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve amino asit pozitron emisyon tomografisine (PET) / bilgisayarlı tomografiye (BT) dayalı ışınlama, tanıda kullanılan görüntüleme yöntemleridir (Popp, Weber, Combs, Yuh & Grosu, 2019). Bunun haricinde tiplendirme genellikle genetik özelliklere göre yapılır. Glioblastomun dört farklı moleküler tipi tanımlanmıştır. Difüz gliomaların anahtar moleküler özellikleri arasında, izositrat dehidrojenaz (IDH) mutasyon durumu, 1p / 19q kromozomun beraber kaybı, EGFR gen amplifikasyonu ve TP53 ve / veya ATRX'teki mutasyonlar bulunmaktadır. GBM'de, DNA onarım geninde promoter hipermetilasyon belirlenmesi, O-6-metilguanin-DNA-metiltransferaz (MGMT), prediktif ve prognostik bir belirteçtir (Hallal vd. , 2019). GBM'li hastaların çoğunluğu için, hastalığın bilinen bir nedeni yoktur. GBM'nin erken tespiti yoktur. Tanımlanabilir bir lezyon belirlendiğinde GBM tümör seviyesi ileri düzeydedir (Alexander & Cloughesy, 2017). Gliomaların gösterdikleri semptomlar yaygın olabileceğinden erken teşhis edilmesi zordur (örn. Baş ağrısı, nöbetler, konfüzyon, hafıza kaybı ve kişilik değişiklikleri). Bunun yanı sıra, konuşma veya motor fonksiyon sorunları ortaya çıksa da fark edilmeyebilir. Şimdiye kadar, bu hastalığın kalıtsal olarak bilinen herhangi bir genetik kalıbı yoktur. Tanı genellikle manyetik rezonans görüntüleme (MRI) veya bilgisayarlı tomografi ile doğrulanır ve genellikle çevre ödemi olan bir kitle varlığı ile kesin tanı konulabilir (Jovčevska, Kočevar, & Komel, 2013). Bahsedilen bu yöntemlere alternatif gliomaların teşhis ve tedavisinde yer alan başka bir yöntem ekzozomal miRNA'lardır. Ekzozomlar, protein, RNA ve diğer biyoaktif moleküllerin taşıyıcıları olarak işlev görebilen, 30 ila 100 nm arasında değişen boyutlara sahip hücre dışı veziküllerdir. Yapılan çalışmalar, ekzozomal mikroRNA'ların (miRNA'ların) hücre dışı mikro ortamda tespit edilebileceğini ve ayrıca hücreler arası geçiş yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, miRNA'lar, farklı sinyal yollarını aktive ederek ve / veya inhibe ederek gliomaların başlaması ve ilerlemesinde rol oynayabilmektedir (Ghaemmaghami vd. , 2020).

2.4. Beyin Tümörü Tedavileri

Kanser sağkalımı, teşhisten ilk tedavinin sonuna kadar geçen süre, tedaviden uzun süreli hayatta kalmaya geçiş ve uzun süreli sağkalım dahil olmak üzere en az 3 farklı aşamayı kapsamaktadır. Tedavinin amacı, hem uzun hem de kısa vadede mümkün olan en yüksek yaşam kalitesini korurken, "kanseri iyileştirmek" veya ilerlemiş hastalığı olan hastalarda hayatta kalmayı uzatmaktır (Siegel vd. , 2012). Bu tümörlerin tamamen tedavi edilmesi çok zordur ve beyin tümörleri için terapiler geliştirmeye yönelik birçok zorluk arasında, ilacın ilgili dokuya iletimi önemli bir sorun olmaya devam etmektedir (Feldman & Chen, 2020). Yeni teşhis edilmiş glioblastoma için ilk tedavi seçeneği, cerrahi müdahale özellikle "maksimum güvenli rezeksiyon" ve ardından eşzamanlı kemo-radyasyon ve sağ kalımın devam etmesi için ilave kemoterapidir. Bununla birlikte, bu tedavi rejimi ortalama hayatta kalma süresini sadece 15 ay kadar uzatır ve hastalık sonuç olarak tedavi edilemez. Radyoterapi sırasında verilen TMZ ve ardından altı döngü idame kemoterapisi, sağkalımı uzattığı gösterilen ilk ve bugüne kadar tek farmakolojik tedavidir. Bu agresif tedavi seçeneklerine rağmen, hastalık neredeyse kaçınılmaz olarak tekrarlayan glioblastoma olarak geri döner ve bunun için standart bir tedavi yaklaşımı yoktur. Tekrarlayan glioblastoma için tedavi seçenekleri arasında yeniden rezeksiyon, anti-anjiyogenez ajanı bevacizumab ile tedavi ve deneysel klinik yaklaşımlar yer alır. Nüksetme sırasında herhangi bir müdahalenin sonucu iyileştirdiğine dair çok az kanıt vardır. Tekrarlayan glioblastoma hastaları için, 6 aylık progresyonsuz sağkalım yaklaşık olarak % 15'tir ve genel sağkalım genellikle 6 aydan azdır (Perrin vd. , 2019; Weller, Le Rhun, Preusser, Tonn & Roth, 2019).

Kombine cerrahi, radyasyon terapisi, kemoterapi ve hedefe yönelik tedaviye rağmen, gliomaların klinik etkinliği ve prognozu her zaman zayıftır. Bu nedenle, hastalığın klinik yönetimini iyileştirmeye yönelik acil ihtiyaç devam etmektedir (Xie vd. , 2019).

2.4.1. Radyasyon

Primer beyin tümörü olan hastalar için Radyoterapi sadece tümör ve çevresi için sınırlı bir alanda uygulanırken, tam beyin radyo terapisi (WBRT) ve SRS esas olarak beyin metastazları için kullanılır. Uygulanan radyasyon dozu, patoloji sonuçlarına bağlı olarak değişir (Nabors vd., 2013). Tümör büyümesini durdurmayı amaçlayan tek doz

stereotaktik radyocerrahi (SRS) ve fraksiyon stereotaktik radyoterapi (FRST) en yaygın kullanılan invazif olmayan alternatiflerdir (Persson vd. , 2017). Genel olarak, hem SRS hem de FRST, acil cerrahiye ihtiyaç duymayan nöroblastoma hastaları için eşit derecede etkili ve güvenli seçeneklerdir (Kalogeridi, Kougioumtzopoulou, Zygianni & Kouloulis, 2020). Radyoterapi pediatrik beyin tümör tedavisinde de kullanılan birincil tedavilerdendir. Radyoterapinin beyin üzerinde, radyasyona bağlı nekroz, atrofi, glioz, vaskülopati gibi potansiyel olumsuz etkileri olabilir. Radyasyona bağlı olarak gelişen serebral vaskülopatinin özellikle pediatrik beyin tümörleri, gliomalar gibi yaygın tümörlerde geleneksel foton radyoterapisinin ardından görüldüğü bildirilmiştir. Geleneksel radyasyon tedavisine alternatif sunulan proton ışın radyoterapisi (PBT), uyumlu doz dağılımı, tümörlü bölgenin bitişiğinde bulunan normal dokunun daha az ışına maruz kalması gibi olumlu etkileri yönünden avantaj sunar (Kralik vd. , 2017). Radyasyonun hayatta kalmayı 12 aya kadar uzattığı gösterilmiştir, ancak vakaların % 90'ında tümörler primer bölgede tekrar ortaya çıkar. Kemoterapi radyasyon tedavisiyle kombinasyon halinde kullanıldığında hastanın hayatta kalmasına katkıda bulunur (Jovcevska vd. , 2013). Radyoterapi, glioma için önemli bir terapötik yöntem olarak kabul edilmiş olmasına rağmen, kaçınılmaz tümör nüksünü önlemek için kritik olarak yeni radikal yollara ihtiyaç vardır (Wu vd. , 2019).

2.4.2. Kemoterapi

Kemoterapi, kanser tedavisinin birincil basamak tedavi seçeneklerinden birisidir ve cerrahi veya radyasyon tedavisi gibi diğer tedavilere ek olarak (adjuvan) kullanılabilir (Horowitz, Suls & Trevino, 2018). Kemoterapi, kanser tedavisi için standart bir terapi şekli olsa da kan-beyin bariyerini aşabilen ilaç sayısı sınırlıdır. KBB sadece büyük moleküllü ilaçların değil, aynı zamanda % 98'den fazla (Paklitaksel, doksorubisin, metotreksat ve vinkristin) küçük moleküllü antikanser ilaçlarında beyne nüfuz etmesini kısıtlar. Sonuç olarak, kullanılan kemoterapötik maddeler beynin hedef bölgelerine etkili bir şekilde ulaşamaz (Yang vd. , 2015). Kemoterapi, malign gliomaların tedavi yönetim sürecinde hem primer hem de nükseden tümör bölgelerinde kullanılır. Glioma tedavisinde kullanılan en sitotoksik ajanlar arasında alkilleyici ajanlar, nitrosourea ve topoizomeraaz inhibitörleri bulunmaktadır. Glioma hastaları için tedavi protokollerine, çoğunlukla nüks eden tümörler için, sitostatik ajanlar eklenmiştir. Sitostatik ajanlar, doğrudan hücre

ölümüne neden olmadan tümör hücrelerinin biyolojisinde değişikliklere neden olarak etki etmektedirler (Graham & Cloughesy, 2004). Glioblastoma için standart rezeksiyon sonrası tedavi oral metilatör içerir. TMZ beyni yoğun radyoterapiden korurken, yeni teknolojilerin kullanımıyla gelişmeye devam eden radyasyonla eşzamanlı olarak uygulanır. Bu tür tedavilerle bile, prognoz, 70 yaşın altındaki hastalarda, rezeksiyon sonrası, 12-15 ay ortalama hayatta kalma süresiyle sınırlıdır (Schonberg, Lubelski, Miller & Rich, 2014). GBM hastalarının genel sağkalımını iyileştirmek için, tümörü TMZ'e duyarlı hale getirmek adına birçok çalışma yapılmıştır. Nitrosüreler lomustin (CCNU), nimustin (ACNU), karmustin (BCNU), semustin (MeCCNU) ve fotemustin, dakarbazin (DTIC), prokarbazin (STZTIC) gibi kloroetile edici nitrosüreler (CNU), malign gliomlar, farklı orijinli beyin metastazları, melanomlar ve Hodgkin hastalığının tedavisi için kullanılır. DNA bazlarını alkilleştirir ve monoaddüktlerin ve ardından iplikler arası çapraz bağların (İÇB) oluşumuna yol açar. İÇB, DNA zincirlerini kovalent olarak bağlayan ve DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu bloke eden kritik sitotoksik DNA lezyonlarıdır. Sonuç olarak, S fazı ilerlemesi inhibe edilir ve hücreler, apoptoz ve nekroza girmeye tetiklenir. Bunun yanı sıra, tümör hücreleri, CNU kaynaklı DNA hasarının onarımı yoluyla kemoterapiye direnç gösterir (Nikolova, Roos, Krämer, Strik & Kaina, 2017). Bu ilaçlar KBB'ni geçer ve tek başlarına veya radyoterapi ile kombinasyon halinde kullanıldıklarında klinik sonuçları etkili bir şekilde iyileştirir, ancak, beyinde terapötik konsantrasyonlara ulaşabildikleri halde, gliomanın kemorezistansı ana problemlerden biri olmaya devam etmektedir. GBM'ler iyonlaştırıcı radyasyon ve genotoksik ilaçların neden olduğu DNA hasarlarına DNA onarım mekanizmasını aktive ederek yanıt verir. Bunlara ilaveten, tümörler, özellikle P-glikoprotein (P-gp) / MDR1, MRP1 ve BCRP1 / ABCG2 gibi ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılarının artan ekspresyonu ve aktivitesi yoluyla hücrelerden kemoterapötik bileşikleri elimine edebilirler (Annovazzi, Mellai & Schiffer, 2017). GBM'de birinci basamak kemoterapötik olarak kullanılan TMZ'den sonra ikinci basamak tedavideki durum karmaşıktır: ABD'de lisanslı, antianjiyojenik vasküler-endotelial büyüme faktörü antikoru bevacizumab ikinci basamak tedavi olarak kabul edilmiştir (Schaub vd. , 2016). Bevacizumab, 2009 yılında ABD'de ve diğer bazı ülkelerde, tekrarlayan glioblastomlu hastalarda iki faz II çalışmada umut verici radyografik yanıt oranlarına dayalı şartlı olarak onaylanan bir kemoterapötiktir (Seystahl vd. , 2020). Bevacizumab'ın birincil ve tekrarlayan klinik ortamda terapötik etkisini

gözden geçirmek için steroid gereksinimini azaltabilmesine rağmen, bevacizumab kullanımının sağlıkla ilişkili yaşam kalitesinde bugüne kadar bildirilen ek bir faydası ortaya konulamamıştır (Diaz vd. , 2017). Tirozin kinaz inhibitörlerinin, mTOR inhibitörlerinin, Nf-kb modülatörlerinin, nitrozürelere ve immünoterapötik ajanların kullanımı gibi ortaya çıkan modaliteler, GBM sonuçlarının iyileştirilmesinde umut verici olduğunu göstermiştir (Mohtashami vd. , 2020). Topoizomeraz 2 (TOP2) toksinleri, TOP2'nin DNA hasarına neden olmasını sağlayan, ancak onu tamir etme kabiliyetine müdahale eden bir ilaç sınıfıdır. Bu güçlü kemoterapötik ajanlar hâlihazırda bir dizi malignitede kullanılmaktadır ve GBM tedavisinde umut vaat etmektedir. Diğer ilaçlara, enzimin DNA'ya bağlı olduğu geçici ara maddeleri stabilize ederek hücreleri öldürdükleri ve böylece çift zincir kırıklarını (DSB'yi) tetikledikleri, esasen topoizomeraz enzimini DNA'ya zarar veren ve apoptoza yol açan bir ajana dönüştürdükleri için TOP2 toksinleri olarak adlandırılır. TOP2'nin başlangıçta DNA'ya bağlanmasını önleyerek işlev gören Aclarubicin ve TOP2'nin bağlandıktan sonra DNA'yı parçalamasını önleyen Merbarone TOP2 etkili kemoterapötik ajanlara örnek sayılabilir. Etoposid gibi epipodofilotoksinler, DNA'ya kovalent olarak bağlanarak yukarıdaki işlevleri yerine getirirken, Antrasiklinler bunu DNA'ya girerek yapar. Bir Antrasiklin olan Doxorubicin, DNA'ya interkalasyon yapan ve ayrıca histonları kromatinden ayıran, normal DNA hasar tepkisini bozan, hasarlı bölgelerde epigenetik düzenlemeye müdahale eden ve reaktif oksijen türleri üreten bir TOP2 toksinidir (Mehta, Awah & Sonabend, 2018).

2.4.3. İmmünoterapi

Kanser immünoterapisi, kanserli hastaların tedavisi için doğrulanmış ve kritik öneme sahip bir yaklaşımdır (Hegde & Chen, 2020). Son yıllarda, çeşitli malignitelere karşı klinik uygulamada iki programlı ölüm reseptörü-1 (PD-1) ve üç programlı ölüm ligandı-1 (PD-L1) inhibitörü kullanılmıştır. Başlangıçta melanom, böbrek ve akciğer kanserleri gibi immünojenik olarak kabul edilen kanserleri hedeflemeye odaklanılmış, tedavi daha sonra diğerlerinin yanı sıra Hodgkin Lenfoma, ürotelyal ve ayrıca baş ve boyun kanserini de kapsayacak şekilde genişletilmiştir. Güncel çalışmalar, kanser hücreleri ve tümör mikro ortamı içindeki konakçı bağışıklık hücreleri arasındaki ligand-reseptör etkileşimlerine vurgu yapmaya başlamış ve bazıları klinik başarıya dönüşmüştür (Constantinidou, Alifieris, & Trafalis, 2019). Gliomaların bağışıklık sistemini

baskılamak için çeşitli mekanizmalara sahip olduğu iyi bilinmektedir. Genelleştirilmiş immüno baskılama, özellikle hücre aracılı bağışıklık bağlamında, GBM'li hastalarda uzun zamandır kabul edilmektedir. GBM'li bireyler, çoğalma potansiyeli azalmış ve pro-inflamatuar sinyallere yanıtı azalmış olan bozulmuş T hücrelerine sahiptir. Sistemik bağışıklık sistemi zayıflar ayrıca glioma mikroçevresi içinde immün sistemi baskılayıcı değişiklikler meydana gelir (Dunn-Pirio & Vlahovic, 2017). GBM'deki Faz I ve II denemeleri immünoterapötik yaklaşımda önemli sonuçlar sunmuştur. Epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) glioblastomaların % 30 - % 60'ında anormal olduğu gözlenmiştir. Reseptör anormalliği, anormal gen amplifikasyonu, reseptör mutasyonu gibi durumlar, özellikle hücre dışı VIII alanı tarafından yönetilir. EGFR anormallikleri katı tümörlerde yaygındır. Anti-EGFR tedavilerinin ortaya çıkışı, klinik sonuçları büyük ölçüde iyileştirmiştir. Anti-EGFR tedavileri glioblastomlar arasında araştırılmıştır, ancak glioblastoma yönetimindeki rolleri çalışılmaya devam etmektedir (Lee vd. , 2020). Glioblastomda EGFR'yi hedeflemek için özellikle faz III denemelerinde monoklonal antikorlardan Nimotuzumab kullanılan reaktifler arasındadır (Westphal, Maire & Lamszus, 2017). Bu kapsamda yapılan bir çalışmada, yeni teşhis edilmiş glioblastoma için standart tedaviye eklenen epidermal büyüme faktörü reseptörüne (EGFR) karşı bir monoklonal antikor olan Nimotuzumab'ın etkinliğini değerlendirmek için randomize bir faz III denemesi yapılmıştır. Rezidüel tümörü olan veya olmayan olarak sınıflandırılan 149 glioblastoma hastası, standart radyokemoterapiye ek olarak, haftalık 400 mg intravenöz Nimotuzumab ve ardından on iki hafta sonra iki haftada bir 400 mg veya standart radyokemoterapi almak üzere rastgele atandığı ifade edilmiştir. Sonuç olarak, EGFR amplifikasyonu, Nimotuzumab'ın klinik etkinliği ile ilişkili bulunmasına rağmen Nimotuzumab anlamlı seviyede bir etki göstermemiştir (Westphal vd. , 2015). Son yıllarda, tekrarlayan GBM tedavisi için monoterapi ve kombinasyon halinde kullanılan çoklu ilaçlar değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, günümüz uygulamasında, tekrarlayan GBM tedavisi, performans durumu, yaş, tümör histolojisi, biyobelirteçler, tekrar ameliyat olasılığı, tekrarlama zamanı önceki tedaviye yanıt gibi parametreler göz önünde bulundurularak tedaviyi bireyselleştirilme hedeflenmektedir. Moleküler hedefli terapiler şu anda araştırma aşamasında olan umut verici araçlardır (Gallego, 2015). Bağışıklık kontrol noktası blokerlerinin birden fazla ileri kanser türüne karşı etkili olduğu

kanıtlanmış olsa da, genel hasta yanıt oranı hala % 30'un altında kalmaktadır (Aikins, Xu & Moon, 2020).

2.4.4. Gen Terapi

Gen terapisi, genetik materyalin (sitotoksik genler, immüno-uyarıcı genler, onkolitik virüsler) terapötik amaçlar için spesifik bir vektör yoluyla tümör hücrelerine verilmesini içerir (Delgado-Lopez & Corrales-Garcia, 2016). Gliomalar, çok sayıda ve heterojen genetik mutasyonlar taşıdığı için, gen terapisi, geleneksel tedavinin sınırlamalarının üstesinden gelmek için umut verici bir alternatiftir. Viral vektörler, glioblastoma gen terapisi için klinik çalışmalarda değerlendirilmiş ancak viral iletim, verimsiz tümör penetrasyonu ve sınırlı etkinlik ile ilgili sorunlar nedeniyle FDA onayını alamamıştır. Viral olmayan vektörler, glioma gen terapisinin verilmesi için araştırılmış ve klinik öncesi çalışmalarda glioma tedavisi için gen vektörleri olarak ümit vaat etmiş ve birkaç vektör klinik denemelere girmiştir (Caffery, Lee & Alexander-Bryant, 2019). Ancak henüz GBM ve Neroblastoma için başarıya ulaşmış bir seçenek bulunmamaktadır.

2.4.5. Cerrahi

Beyin tümörlerinin cerrahi tedavisinde temel ilke, ameliyat sonrası sonuçları iyileştirmek için maksimum güvenli rezeksiyona ulaşmaktır (Lakomkin & Hadjipanayis, 2019). Cerrahi işlemle, tümörün moleküler genotipinin oluşturulması, yaşam kalitesinin iyileştirilmesi ve sağkalımın artırılması amaçlanır. Mevcut kanıtlar, maksimum güvenli rezeksiyonun fonksiyonel durumu iyileştirdiğini ve hem düşük hem de yüksek dereceli gliomalarda mortaliteyi azalttığını göstermektedir (Scarabino, Caranci, Muto & Popolizio, 2020). Primer beyin lezyonları için, hastanın yaşı, beynin etkili alanlarına yakınlık, agresif cerrahi ile kitle etkisinin azaltılmasının fizibilitesi ve tekrarlayan hastalığı olan hastalarda son cerrahiden bu yana geçen süre gibi etmenler maksimal rezeksiyonu kısıtlayıcı etmenler olarak ortaya çıkmaktadır (Nabors vd. , 2013). Tümör hücrelerinin normal beyin dokularına istila etmesi, cerrahinin tam rezeksiyona ulaşmasının zorluğu sonucunda nüks ve ölüm sık sık meydana gelen olgulardır (Lin vd. , 2018).

2.5. Beyin Tümörü Tedavisinde Başlıca Engeller

2.5.1. Kan Beyin Bariyeri

Kan beyin bariyeri (KBB), polarite ve boyutu baz alarak belirli moleküllerin beyin parankimine akışını engelleyen bir bariyer olarak işlev görür (Sofroniew & Vinters, 2010). KBB'nin, yüksek dereceli primer beyin tümörlerinde geçirgenliği zayıflamıştır. Düşük dereceli gliomalarda ise, KBB stabilitesi GBM'ye göre daha iyi durumdadır. Bu yüzden bu tümörlerin tedavisi, sağlama çok yakın KBB'nin varlığı nedeniyle zordur. KBB, yüksek dereceli beyin tümörlerinin merkezinde veya yakınında bozulmasına rağmen, tümörün büyüyen kenarına yakın bölgede sağlam görünmektedir. Sağlam KBB'nin varlığı bu bölgelere ilaç verilmesini önemli ölçüde engelleyebilir. Sonuç olarak, tümör büyümeye devam eder ve nihayetinde klinik olarak önemli bir boyuta ulaşır (Bhowmik vd. , 2015). KBB ilaçların MSS'ne etkili bir konsantrasyonda ulaşmasına izin vermeyerek tedavi için önemli bir sınırlama oluşturur. KBB, mikrovasküler endotelial hücrelerden oluşur. Bu endotelial sıkı kavşaklar, çok çeşitli enzimlere, reseptörlere, taşıyıcılara ek olarak, intravasküler moleküllerin beyne erişimini önemli ölçüde sınırlar. Sadece 400 daltonun altındaki küçük moleküller ve proteinler KBB'ye başarılı bir şekilde dağılır. Kemoterapilerin çoğu, 400 dalton sınırını aşan moleküler ağırlıklara sahiptir (Feldman & Chen, 2020). Gliomalar için birincil tedavi seçeneği olan TMZ, 194 Da'lık nispeten küçük bir lipofilik moleküldür ve bu nedenle KBB'yi geçebilir. Yapılan çalışmalarda, beyin ve beyin omurilik sıvısındaki TMZ düzeylerinin, ilaç plazma konsantrasyonunun % 20'sine ulaştığı tespit edilmiştir (Bunevicius, McDannold & Golby, 2020).

2.5.2. Kemoterapi Direnci

Kemoterapi direnci, kanserde morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenidir. Kemoterapi direnci, ilaç alımını, metabolizmasını ve hücresel seviyede ilaç taşınımını etkileyen genetik ve epigenetik değişikliklerden etkilenir. Tümör hücresinin otonom mekanizmaları, tümör mikro çevresi direnç gelişiminde ve kötü huylu ilerlemede oldukça önemlidir. Tümörlerin, mikroortamlardan ihtiyaç duydukları destek, tümör mikro ortamındaki stromal hücreleri, stromal hücreler tarafından salınan proteinleri ve hücre

dışı matris gibi hücresel olmayan bileşenleri hedefleyerek engellenebilir. Kemoterapi direnci ve tümör nüksünü azaltmak hedeflenen yeni terapötik stratejiler arasındadır (Senthebane vd. , 2017). Glioblastoma'nın ölümcül bir hastalık olması, tedaviye güçlü direnç göstermesinden ve sağlıklı dokuya agresif infiltrasyon özelliğinden kaynaklanır. GBM tümör mikro ortamındaki hücre dışı matrisin terapötik direnci kolaylaştırdığını gösteren kanıtlara rağmen, bu etkinin altında yatan mekanizmaları sistematik ve ayrıntılı bir şekilde araştırmak halen teknik olarak zordur (Xiao vd. , 2020). TMZ, GBM için kullanılan ilk tedavi yöntemidir. Hastalar kemoterapötik ajan olan TMZ'e direnirler ve TMZ'e karşı artan direnç önemli bir zorluktur. TMZ direnci, hücre döngüsündeki değişiklikler, DNA tamir genlerinin ve O⁶ metilguanin transferazın yukarı regülasyonu gibi faktörleri kapsayan bir süreçtir. Son çalışmalar, kodlamayan RNA'ların (lncRNA'lar ve miRNA'lar) Kemoterapi direnci dahil olmak üzere tümör biyolojisindeki kilit düzenleyici rollerini göstermektedir. TMZ direncinin altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılması, GBM'yi TMZ'e duyarlı hale getirebilecek kombinasyon terapisinin geliştirilmesi için gereklidir (Du vd. , 2017; Munoz vd. , 2014).

2.5.3. O⁶-Metilguanin-DNA Metiltransferaz İle Onarım

Glioblastom Multiforme'un kemoterapi direnci, büyük ölçüde TMZ'e bağlı DNA lezyonlarının O⁶-metilguanin DNA metiltransferaz (MGMT) tarafından onarımından kaynaklanır. TMZ, guaninin N⁷ pozisyonunda, adenin O³ pozisyonunda ve guaninin O⁶ pozisyonunda DNA'yı metilleştiren bir alkilleyici ajandır. Bu ilacın sitotoksitesi çoğunlukla O⁶ metilguanin kaynaklı DNA hasarına bağlıdır. TMZ tedavisine yanıt eksikliği, tipik olarak tümörlerin ilaca olan içsel ve edinilmiş direncine bağlıdır. Dimetile edici enzim MGMT ifadesi, içsel TMZ direncinde rol oynayan anahtar bir yoldur. MGMT, alkil gruplarını doğrudan guaninin O⁶ pozisyonundan çıkararak TMZ'ye direnci indükler (Yi vd. , 2019). Ekspresyonunun, ağırlıklı olarak, gen promotor bölgesinin metilasyonu yoluyla epigenetik susturma ile düzenlendiği düşünülmektedir (Schaff vd. , 2020). GBM'li hastaların yaklaşık % 96'sında IDH1 vahşi tip mutasyonları vardır ve bu hastalar için tedavi başarı oranı, MGMT gen promotoriyle tahmin edilebilir. MGMT promotor metilasyonlu GBM'nin, TMZ'e metillenmemiş muadilinden daha iyi yanıt verdiği bilinmektedir. MGMT metilasyon durumu, TMZ direnci ve zayıf progresyonsuz sağkalım için kritik bir faktör olarak kabul edilir (Le vd. , 2020).

2.6. Glioblastoma Multiforme

Glioblastoma multiforme (Şekil 2.1.) Dünya Sağlık Örgütü tarafından IV. derece ve en sık görülen primer malign beyin tümörü olarak sınıflandırılmıştır (Schonberg vd. , 2014). Gliomalar, glial veya prekürsör hücrelerden kaynaklanan nöro-ektodermal kaynaklı tümörlerdir (Scarabino vd. , 2020). Glial hücrelerden köken almaktadır ve çevre dokulara sızmaktadır (Menze vd. , 2015). Glial tümörler; astrositomlar, oligodendrogliomalar, anaplastik oligoastrositomlar, ependimomlar ve Glioblastoma multiforme'den oluşur (Graham & Cloughesy, 2004). Birincil merkezi sinir sistemi tümörleri, ülkeler arasında önemli bir fark olmaksızın yılda, 100.000 kişi başına 5-17 vaka arasında değişen bir insidansa sahiptir. Tüm kanser ölümlerinin % 2-5'ine neden olurlar. Son otuz yılda, beyin tümörlerinin insidansında özellikle 65 yaşındaki hastalarda yaklaşık iki kattan fazla artış söz konusudur. Gliomlar % 45-62 arasında en sık görülen primer intraserebral tümörlerdir. Erkeklerde kadınlara oranla 1.3 kat daha yaygındır (Scarabino vd. , 2020). Az sayıda çalışma, GBM insidansının Asyalılar, Latinler ve Beyazlar da dahil olmak üzere diğer etnik gruplarda siyahlara oranla daha yüksek olduğunu göstermiştir (Hanif, Muzaffar, Perveen, Malhi & Simjee Sh, 2017). Birincil MSS tümörleri yetişkinlerde çocuk ve ergenlere göre daha yaygındır, ancak çocuklarda en yaygın katı neoplazm türüdür. Gliomlar, tüm malign birincil MSS tümörlerinin % 80'ini ve tüm birincil MSS tümörlerinin % 27'sini oluşturur. Tüm gliomaların %75'i astrositomlardır ve en yaygın olanı en yüksek dereceli alt tip olan glioblastomdur (Şekil 2.2.) (Ferris, Hofmann, Solomon & Perry, 2017). Günümüzde prognostik, yaş ve performans durumu gibi klinik değişkenlerle birlikte histolojik özelliklere dayanmaktadır. GBM'nin karakteristik özellikleri arasında, izositrat dehidrojenaz (IDH)1veya 2 genlerindeki mutasyonlar, O6-metilguanin DNA metiltransferaz promoterinin metilasyonu, epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) kodlayan genin amplifikasyonu veya EGFR varyantı III'ün (EGFRvIII) ekspresyonu gibi çeşitli genetik değişiklikler bulunmaktadır (Struve vd. , 2020). Yüksek dereceli gliomalar, heterojen prognozlu bir grup agresif primer beyin tümöründen oluşur. Glioblastom için medyan hayatta kalma süresi yaklaşık 1 yıldır, ancak hastaların % 8'i 2,5 yıl veya daha uzun süre hayatta kalır. Göreceli serebral kan hacmi gibi perfüzyon parametreleri, tümör vaskülaritesi ve damarların özellikleri glioma derecesinin ilerlemesi ve prognozun seyri ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Bu nedenle, gliomları agresifliklerine göre sınıflandırmak,

hasta sağkalımını tahmin etmek ve sonunda tedavi seçimine yardımcı olmak için güçlü bir prognostik araç olarak görülmektedir (Ulyte vd. , 2016). Aynı zamanda, yeni bir molekül sınıfı olan uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar) ve mikroRNA'lar, GBM ve diğer kanserlerde yeni terapötik veya prognostik biyobelirteçler olarak hizmet edebilir. Bu moleküller, ekspresyon veya epigenetik seviyelerde GBM hücreleri için fenotipik anahtarlar olarak hizmet edebilir (Stackhouse, Gillespie & Willey, 2020). GBM patogenezinde yer alan çeşitli hedefler arasında, mikroRNA'lar (miRNA'lar) bulunur.

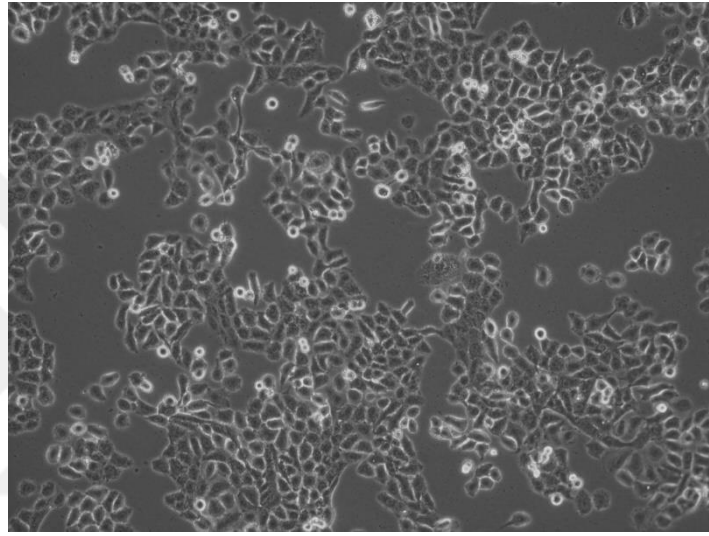
GBM'de çeşitli hücrel ve moleküler yolları etkileyebilecek küçük kodlamayan RNA'lardır. Deregülasyonlarının GBM'nin başlaması ve ilerlemesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. GBM patogenezinde yer alan önemli miRNA'lardan MiR-21 ve ekzozomal miR-21 tanısal ve terapötik biyobelirteç olarak rol oynar (Masoudi, Mehrabian & Mirzaei, 2018). Beyinde başlayan primer beyin tümörleri ve vücudun diğer bölgelerinde gelişen tümörlerden göç eden kanser hücreleri tarafından üretilen sekonder beyin tümörleri olmak üzere klinik olarak iki glioblastom alt tipi tanımlanmıştır (Bhowmik vd. , 2015; Maher & Mckee, 2010). Düşük dereceli bir tümörün birkaç yıl içinde GBM'ye dönüştüğü glioblastomlar, daha yüksek oranda genç hastalarda görülmektedir. Sekonder glioblastoma beyin metastatik lezyonlarının en yaygın kökenleri akciğer (% 65), deri (melanomlar, % 10-40), meme ve gastrointestinal sistem primer kanserleridir (Davis, 2016).

GBM tanısı konma yaşı ortalama 64'tür, primer GBM'ye kıyasla sekonder olarak hastalığa yakalanan vakalar 10-15 yaş daha küçüktür (Delgado-Lopez & Corrales-Garcia, 2016). GBM, diğer glial tümörlere veya merkezi sinir sistemindeki öncüllerine kıyasla insan gliomalarının en agresif ve en yaygın olanıdır. Geleneksel tedavilere direnci, hızlı büyümesi ve yüksek infiltratif doğası, tümör rezeksiyonu, radyasyon ve kemoterapi dahil olmak üzere oldukça agresif tedavilerin kullanımını gerektirir (Schonberg vd. , 2014). GBM'nin kompleks bir kanser olması terapötik müdahalelere karşı direncinin nedenlerinden biridir. GBM mikroskobik incelemesinde, mikrovasküler proliferasyon, psödopalize nekroz bölgeleri, pleomorfik çekirdekler ve hücreler tanımlanmıştır. Tümör yapısının içerdiği bu farklı yapıların yanında, tümör hücrelerinin beyindeki yerleri de değişkendir. Bu değişkenlik, tümörün tamamen rezeke edilememesine neden olur. Agresif cerrahi rezeksiyonlar, ileri radyoterapi ve kemoterapiye rağmen GBM'li hastalar için prognoz istenen başarıyı sağlayamamaktadır (de Melo vd. , 2020). Son yıllarda elde

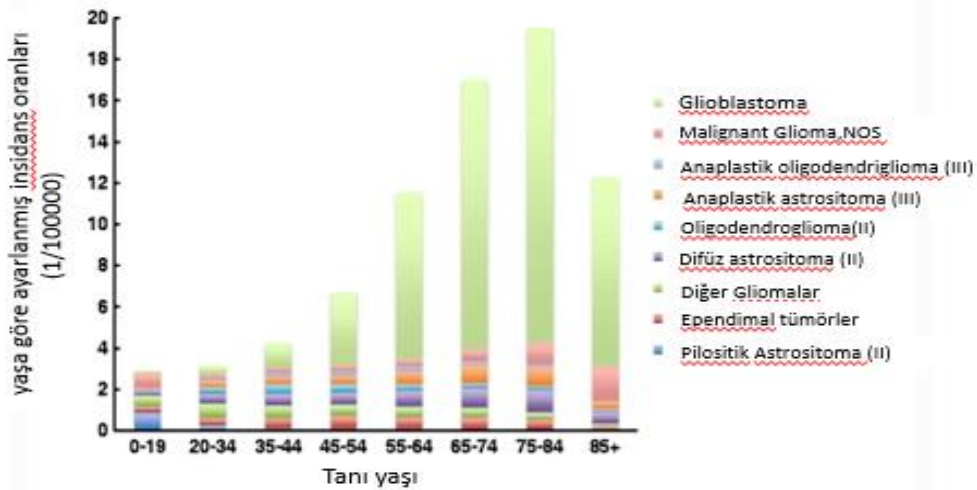
edilen veriler, maksimum güvenli rezeksiyon artı sistemik ve lokal kemoterapi ve radyasyon uygulanan GBM hastalarının medyan sağkalımının yaklaşık 21 ay olduğunu göstermektedir. Standart tedavi, cerrahi rezeksiyon ardından sistemik kemoterapi ve radyoterapi ile oluşturulur (Shapira-Furman vd. , 2019). Pasif ve aktif immünoterapi, anjiyogenez inhibitörlerinin kemo-terapötikler ve gen / antikor terapisi ile birlikte kullanımı gibi deneysel prosedürler ek tedavi seçenekleridir. Bununla birlikte, kan beyin bariyerinin varlığı nedeniyle beyine erişmek zor olduğundan, uygulanan tedavilerin hiçbiri bu hastalığı tedavi etmede başarılı olamamıştır (Jovcevska vd. , 2013).

Glioma gelişimi riskini arttırdığı bilinen birkaç faktöründen en önemlisi iyonize radyasyon maruziyetidir. Başka bir tümör veya durum için alınan radyoterapiye bağlı GBM tedaviden yıllar sonra görülebilir. Vinil klorür, böcek ilaçları, petrol arıtımı ve sentetik kauçuk üretimine yönelik diğer çevresel maruziyetler, gliomların gelişimi ile daha esnek bir şekilde ilişkilendirilmiştir. Formaldehit ve iyonize olmayan radyasyonun GBM'ye yol açtığı kanıtlanamayan faktörler arasındadır (Davis, 2016). Sigara, alkol tüketimi, uyuşturucu kullanımı veya N-Nitroso bileşiklerine maruz kalma gibi yaşam tarzı faktörleri ile GBM ilişkisi ile ilgili önemli bir kanıt yoktur (Kanderi & Gupta, 2020). Ancak 10 yıl gibi uzun süreli maruziyetlerde cep telefonu kullanan kişiler arasında GBM artmış insidans göstermiştir (Alifieris & Trafalis, 2015). Bakır sülfatlarla birleştirilmiş organoklorürler ve alkilüreler gibi bazı pestisitler ve diğer tarımsal kimyasallar kullanılarak yapılan hayvan deneylerinde kanseri indüklediklerinden şüphelenilmektedir. Ayrıca enfeksiyon ve alerjik hastalıkların GBM üzerinde immün gözetim mekanizmasının sürekli aktif olmasından kaynaklı koruyucu etkisi olabileceği de göz önünde bulundurulmuştur. Olguların sadece % 5-10'unda genetik yatkınlık gözlenmiştir (Hanif vd. , 2017). Risk faktörleri arasında ayrıca, alerjiye karşı azalmış duyarlılık, bağışıklık faktörleri ve bağışıklık genleri ve genomik analiz ile tespit edilen bazı tek nükleotid polimorfizmleri bulunur (Tamimi & Juweid, 2017). Genellikle tedavi edilemeyen beyin neoplazmlarının etiyolojisi hakkında çok az şey bilinmektedir. Primer glioblastomlu hastalarda kromozom 10 ve p16 üzerinde fosfataz ve tensin homolog genlerinin silinmesi ve 10q ve 17p kromozomlarında heterozigotluk kaybı gösterir. Sekonder glioblastomlu hastalarda ise, p53 tümör baskılayıcı genindeki mutasyonlar, p16'daki anormallikler ve retinoblastom yollarında ve DNA kopya sayısındaki anormalliklerle karakterizedir. Bugüne kadar, yüksek doz iyonlaştırıcı radyasyona maruz

kalma doğrulanmış tek risk faktörüdür. Çocuklarda veya bebeklerde tinea kapiti ve cilt hemanjiyomunu tedavi etmek için kullanılan nispeten düşük dozlarda radyasyonunda risk faktörleri arasında bildirilmiştir. Ayrıca, Akut lenfoid lösemi (ALL) tedavisi gören hastalar GBM geliştirmeye daha yatkındır ve lösemi veya ALL tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlardan kaynaklanan komplikasyonların bir sonucu olarak oluştuğu düşünülmektedir (Hanif vd. , 2017; Jovcevska vd. , 2013).



Şekil 2.1. C6 Rat Glioblastoma Multiform Floresan mikroskop görüntüsü (10X)



Şekil 2.2. Yaşa göre gliomların insidansı (Ferris vd. , 2017)

2.7. Nöroblastoma

Pediatric yüksek dereceli gliomalar, çocukluk çağındaki primer beyin tümörlerinin % 8-12'sini oluşturur (Guerra-García vd. , 2020). Nöroblastomalar (Şekil 2.3.) bebeklerde en sık, çocuklukta ise en sık görülen üçüncü kanserdir. Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü verilerine göre, nöroblastoma her 7000 çocuktan yaklaşık 1'ini etkilemektedir. İnsidans oranı yaşamın ilk yılında en yüksektir, yaşla birlikte kademeli olarak azalır ve 10 yaşından sonra oldukça nadir hale gelir.

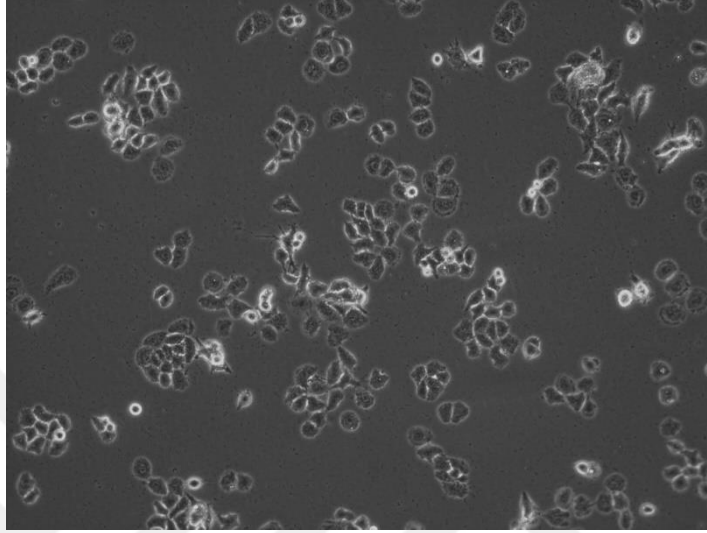
Dünya kanser raporuna göre, nöroblastoma en ölümcül erken çocukluk dönemi kanserlerden biridir ve çocuklarda kanser ölümlerinin % 15'ine neden olmaktadır (Liu, Zhao, Zhang, Huang & Ma, 2020). Gelişmiş ülkelerde 1 yaşın altındaki bebeklerde en sık görülen tümördür. Okul çocuklarında nadirdir ve yetişkinlerde nöroblastoma çok nadir görülmektedir (Spix, Pastore, Sankila, Stiller & Steliarova-Foucher, 2006). Nöroblastoma, melanositler, kraniyal nöronlar, gliya, kıkırdak, kemik, bağ dokusu, periferik sempatik nöronlar ve Schwann hücreleri gibi diğer hücre tiplerine olgunlaşan ve gelişen nöral krest hücrelerinden kaynaklanan, tipik olarak adrenal medullada bulunan, periferik sempatik sinir sistemi kanseridir. Ayrıca boyun, göğüs, karın ve pelviste sempatik sinir sistemi boyunca yer alan sempatik sinir ganglionlarında da bulunabilir (Pastor & Mousa, 2019). Nöroblastom'un moleküler temeli büyük ölçüde belirsiz kalmıştır. NB'leri zorlayıcı kılan en ayırt edici özelliği, çeşitli alt türleri içinde gözlenen heterojenliğin derecesidir (Peifer vd. , 2015). Bu tümörler nadirdir, agresif ve genellikle ciddi bir prognoz taşır. NB'nin klinik ve biyolojik özellikleri birincil tümör bölgelerine göre farklılık göstermektedir (Lu vd. , 2020). Hemen hemen tüm nöroblastoma hücreleri, yüzeylerinde gangliosid GD2 ve nöral hücre yapışma molekülünü içermektedir (Berthold & Hero, 2000). NB'nin prognozu, hasta faktörleri (tanı sırasındaki yaş), biyokimyasal faktörler (laktat dehidrojenaz ve ferritin), tümörle ilgili faktörler (birincil bölge, tümör histolojisi ve evresi), biyolojik faktörler (MYCN amplifikasyonu, ploidi ve kromozom 1p kaybı) ve yönetim faktörleri (indüksiyon sonrası metastatik remisyon ve rezeksiyon derecesi) gibi prognostik faktörler tarafından belirlenir. NB patofizyolojisi ve biyolojisi, MYCN durumunu, kromozom 1p kaybı ve ploidi, metastazların spontan gerilemesini veya agresif büyümesini ve yayılmasını belirlemektedir. MYCN onkojenin amplifikasyonu sonucu 1p ve 17q heterozigotluk kaybı, NB vakalarının yaklaşık % 20-25'inde görülür ve olumsuz bir sonuçla ilişkilirken, triploidi, iyi bir sonuca sahip düşük

evreli NB'ler ile ilişkilidir (Carén, Abel, Kogner & Martinsson, 2008; Peifer vd. , 2015; van Heerden & Kruger, 2020).

Nöroblastoma, Uluslararası Çocukluk Çağı Kanseri Sınıflandırmasına göre, Grup IV olarak sınıflandırılan nöroblastik tümörlerin % 97'lik kısmını oluşturur. Nöroblastik tümörler, spontan gerilemeden ilerlemeye kadar değişen çeşitli biyolojik ve klinik davranışlar gösterirler, tedaviye yanıt vermezler veya tedaviye dirençli hale gelebilirler (Moreno vd. , 2016). Yaygın çocukluk çağı solid tümörleri arasında bulunan Nöroblastoma hastaları için prognoz, son yıllarda iyileşmiş olsada mevcut tedaviler, özellikle çok genç hastalar için, önemli yan etkiler açısından yüksek risk taşımaktadır (Batra & Wistinghausen, 2019; Mueller & Chang, 2009).

Pediyatrik kanserler, kanserin tipine ve evresine göre seçilen terapilerin (cerrahi, radyasyon, kemoterapi ve hedefli tedavi) bir kombinasyonu ile tedavi edilir (Miller vd. , 2016). NB için klinik tanı ve tedavi sürekli olarak iyileşse de, yüksek riskli NB'li çocuklar için 5 yıllık sağkalım oranı % 50'den düşük bir oranda kalmaktadır (Yu vd. , 2019). Radyasyon tedavisi (RT) genellikle yüksek riskli nöroblastoma için indüksiyon kemoterapisinden sonra hem birincil tümör bölgesine hem de metastatik bölgelere uygulanır. Cerrahi rezeksiyon sonrası tümör bölgesine RT, hastalığın bölgesel kontrolüne ve nüksün önlenmesine önemli ölçüde katkıda bulunur. Metastatik nöroblastom için palyatif radyoterapi de etkili ve güvenlidir ve esas olarak semptomatik olarak rahatlama sağlar. Nöroblastoma hastalarında RT'nin geç yan etkileri arasında büyüme ve gelişme yetersizliği, hipotiroidizm, gastrointestinal disfonksiyon, nörobilişsel kusurlar, pulmoner ve kardiyak anormallikler, kısırlık ve ikincil kanserler bulunur (Zhao vd. , 2020). Dördüncü evredeki hastalarda kemoterapi tüm ölümlerin % 15,5'ine denk gelen bir oranla, tedaviye bağlı ölümlere cerrahiden daha fazla sebep olmaktadır. Toksik ölümlerin önüne geçildiğinde, 5 yıllık sağkalım oranının % 30'dan % 35±2'ye çıkması öngörülmektedir. Nöroblastomlu hastalarda kemoterapinin bir başka yan etkisi, ikincil miyelodisplastik sendromların ve dönüştürülmüş akut miyeloid lösemilerin gelişmesidir (Berthold & Hero, 2000). Düşük riskli NB'ler esas olarak 12 aylıktan küçük çocuklarda görülür ve genellikle tek başına ameliyatla yönetilir. Tümör lokalizasyonu, lokal yayılma veya metastatik difüzyon onu ameliyat edilemez hale getirirse, kemoterapi ilk basamak tedavi olarak kullanılır. Yüksek riskli NB tedavisi için kemoterapi, radyasyon tedavisi ve kök hücre nakli gerekir. Bu farklı tedavi yöntemleri, şu anda % 70'e yaklaşan 5 yıllık bir

sağkalım oranına ulaşmayı sağlamıştır (Geurten, Geurten, Hoyoux, Lebrethon & Metabolism, 2019). Yüksek riskli hastalar için mevcut tedavi yoğun ve toksik kemoterapiyi içerir, ardından cerrahi rezeksiyon, miyeloablasyon, otolog kök hücre kurtarma, radyasyon ve yoğun immünoterapi tedavilerini içerir (Huang & Weiss, 2013).



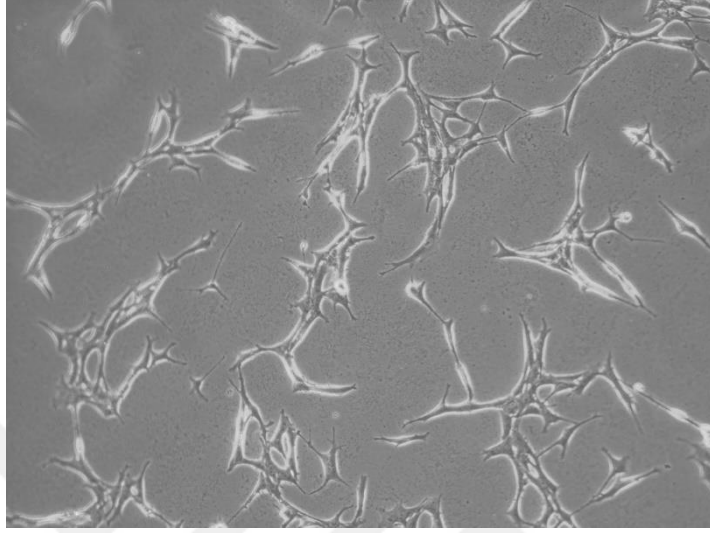
Şekil 2.3. N1E-115 fare Nöroblastoma hücreleri floresan mikroskop görüntüsü (10X)

2.8. Astrosit

Astrositler (Şekil 2.4.), memeli merkezi sinir sistemindeki hücrelerin yaklaşık % 30'unu oluşturur. Beyin ve omurilik fizyolojisinin ayrılmaz bir parçasıdır. Hem mikroglia hem de astrositlerin, yaralanma moduna bağlı pro ve anti-enflamatuar fonksiyonları vardır (Liddelow & Barres, 2017). Morfoloji ve lokasyona göre klasik olarak, ventrikülleri çevreleyen radyal astrositler, gri maddede bulunan protoplazmik astrositler ve beyaz maddede bulunan lifli astrositler olmak üzere üç ana türe ayrılırlar. Radyal astrositler ventriküler yüzeylere dik olarak lokalizedir ve uzun, dallanmamış yapılarla sahiptir. Protoplazmik astrositler, çok sayıda oldukça dallı kısa yapılarla gür bir morfolojiye sahiptir. Lifli astrositler, daha az dallanmış, pürüzsüz, uzun yapılarla yıldız görünümündedir. Beyin hasarı üzerindeki astrosit etkileri, hücrenin hayatta kalması üzerinde anında etkisi olanlar ve daha sonra iyileşmeyi ve işlevi etkileyen uzun vadeli veya gecikmiş etkilere sahip olanlar olarak ikiye ayrılır (Yongmei Chen, Swanson & Metabolism, 2003). Fizyolojik ve patolojik koşullarda MSS'nin homeostazını korumak için, besleyici ve yapısal destek sağlamak, iyonların ve nörotransmitterlerin hücre dışı

konsantrasyonlarını düzenlemek, kan-beyin bariyerini sürdürmek ve nöronlar için yaşayabilir bir mikro ortam oluşturma gibi çok sayıda önemli rolleri bulunur. Astrositlerin ayrıca travmatik yaralanma, inme ve dejeneratif hastalık gibi çeşitli uyaranlara yanıt olarak nöropatolojik oluşumda rol oynadıkları bildirilmektedir (Sun vd. , 2017). Astrositler, nöronlardan farklı olarak, süreçleri boyunca aksiyon potansiyellerini yaymaz. Ancak bu, astrositlerin fizyolojik olarak sessiz oldukları anlamına gelmez. Astrositler, bir tür astrosit uyarılabilirliğini temsil eden hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda kalsiyum'u düzenlenmiş artışlar sergiler (Sofroniew & Vinters, 2010). Astrositlerin nöronal aktiviteyi algılayarak, buna hücre içi Ca^{2+} yükselmeleriyle yanıt vermesi ve Ca^{2+} yükselmelerine ve diğer uyaranlara yanıt olarak vericileri salması astrositlerin sinapslar ve nöronal devrelerle etkileşimi olduğunu göstermektedir. Astrositler, çok sayıda sinaptik araçların yanı sıra sitokinleri, prostaglandinleri ve iyonik konsantrasyonlarda, pH, bağışıklık veya redoks durumundaki değişikliklerle ilgili sinyalleri algılamalarını sağlayan bir reseptör, taşıyıcı ve diğer molekülleri kapsar. Ayrıca, glutamat gibi sinapslarda hareket edebilen çeşitli moleküller üretme mekanizmasına sahiptirler (Santello, Toni & Volterra, 2019). Astrositlerin MSS'de her yerde bulunmaları ve çeşitli fonksiyonlara sahip olması heterojen bir yapıya sahip olduklarını desteklemektedir (Batiuk vd. , 2020). Bu görüş, son birkaç yılda RNA dizilemesi, immünohistokimya, elektron mikroskobu, morfolojik yeniden yapılandırma ve görüntüleme verilerinin mevcudiyeti ile sorgulanmıştır. Bu çalışmalar, astrositlerin farklı bir hücre popülasyonunu temsil ettiğini, beyinde bulundukları bölgeye ve hastalığa özgü özellikler ve işlevler sergilediklerini göstermektedir (Khakh & Deneen, 2019). Ayrıca, astrositlerin CNS fizyolojisinde çok çeşitli yaşamsal işlevler için gerekli oldukları bilinmektedir. Özellikle insan astrositleri, insan beyninin diğer türlerden ayırt edilmesine olanak tanıyan işlevsel bir karmaşıklığa ve yapısal çeşitliliğe sahiptir. Astrositler son derece heterojendir. Astrositik alt tipinin heterojenliğine rağmen, tüm CNS boyunca geniş kapsamlı anatomik organizasyona sahiptir. Bu nedenle, astrositlerin CNS homeostazı için gerekli olduğu bilinmektedir (Cohen & Torres, 2019). Beyin homeostazının ve bilişsel işlemenin sürdürülmesi, insan vücudunun geri kalanına göre önemli enerji harcamaları gerektirir. Beyin toplam vücut ağırlığının % 2'sini oluşturmaya rağmen, toplam vücut enerji tüketiminin %20'sinin beyin aktivitesinden kaynaklandığı ve beyindeki en büyük oranda enerji harcamasının sinaptik iletme olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle, astrositlerin

serebral kan akışını düzenlemedeki rolleri, beyin fonksiyonunu desteklemek için uygun ve tutarlı enerji beslemesinin sağlanmasında temel öneme sahip olabileceği bildirilmiştir (MacVicar & Newman, 2015).



Şekil 2.4. Rat astrositlerinin floresan mikroskop görüntüsü (10X)

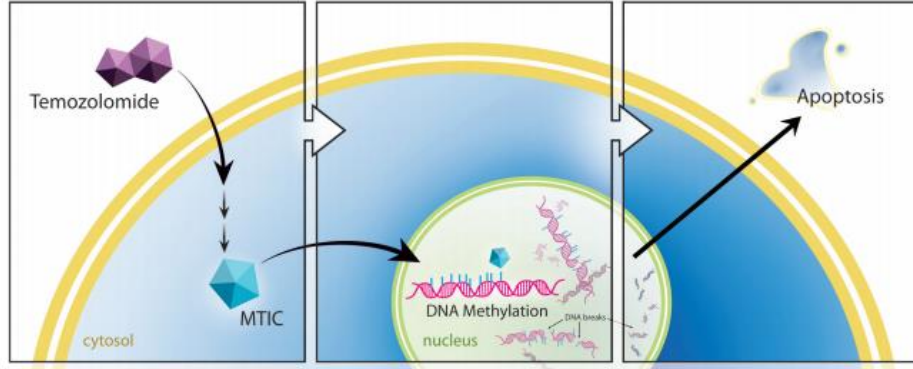
2.9. Kullanılan İlaçlar

2.9.1. Temozolomid

TMZ, 1999 yılında, ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından malign gliomaların tedavisinde kullanılmak üzere onaylanan ilk oral kemoterapi ajanıdır. Nitrosourea ve prokarbazin ile önceden tedavi edilmemiş olan anaplastik astrositomlu hastalarda kullanılmak üzere onaylanmış olmasına rağmen üçüncü ve dördüncü derece malign gliomlu hastalar için adjuvan olarak ya da nüks durumlarında kullanılmaktadır (Graham & Cloughesy, 2004). Glioblastoma tedavisi, cerrahi rezeksiyon veya tümör hacminin küçültülmesi sonrası başlangıç tedavisi olarak, radyasyon ve TMZ kemoterapisi akabinde, 6 döngü ek TMZ uygulamasını içerir. Bu tedavinin genel sağkalımı iyileştirdiği bilinmektedir. Sadece cerrahi ve ardından radyasyon tedavisi ile karşılaştırıldığında 12.1 olan genel sağ kalım, TMZ uygulaması ile birlikte 14.6 aya yükselmiştir ve % 10.4 olan 2 yıllık sağkalım % 26.5'e yükselmiştir (Maher & Mckee, 2010). Yeni teşhis edilmiş glioblastoma hastaları için kullanılan TMZ kemoterapi tedavisi yoğun doz ve kombinasyon uygulamalarına rağmen genel sağkalımı büyük ölçüde iyileştirememiştir.

Bunun yanısıra, TMZ'in düşük toksisitesi, daha yoğun bir alkilleyici kombinasyon tedavisinin uygulanabilir olabileceğini ve daha fazla araştırılması gerektiğini göstermektedir (Herrlinger vd. , 2019). TMZ, ağızdan uygulanabilen bir alkilleyici ajandır. Etkisini sitotoksositeye bağlı gösterir. TMZ kendiliğinden 5- (3-metiltriazen-1-il) imidazol-4-karboksamida (MTIC) dönüştürülür ve daha sonra metildiazonyum katyonuna indirgenir. Bu katyon, DNA ile reaksiyona girerek DNA ipliği kırılmalarına neden olan metil ürünler oluşturur (Şekil 2.5.). Bu iplik kırılmaları onarılmazsa G2/M fazında hücre döngüsü tutuklanmasına ve apoptoza neden olur TMZ küçük boyutu ve lipofilik özelliklerinden dolayı kan beyin bariyerini kolayca aşar (Alexiou, Gerogianni, Vartholomatos & Kyritsis, 2016). Bununla birlikte, direnç mekanizmalarının yaygın olarak ortaya çıkması nedeniyle, optimum terapi bile sağkalıma kısmi fayda sağlar (Farago vd. , 2019). TMZ'nin sitotoksik etkisini etkisiz hale getiren iki ana mekanizma bulunur. TMZ, guaninin O⁶ pozisyonunda DNA'yı metilleyerek etki gösterir. DNA replikasyonu sırasında, bu metil eklenti, guaninin sitozin yerine timin ile eşleşmesine neden olarak genomik dengesizliğe ve hücre ölümüne yol açar. O⁶ guaninden metil eklentisini ayırabilen bir intihar enzimi olan O⁶ metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT), replikasyondan önce değişikliği etkili bir şekilde onarır. MGMT promotor metilasyonu, TMZ'e direnç oluşturan en güçlü yanıtlardan biridir. MGMT yokluğunda, ortaya çıkan baz uyumsuzlukları, uyumsuzluk onarım (MMR) yolu ile onarılır. MSH2, MSH6, MLH1 gibi MMR proteinleri, uyumsuz guanini tanır ve ona bağlanır ve hücrelerin bir DNA onarım döngüsüne girmesine neden olur. Yeni sentezlenen DNA zincirlerindeki uyumsuzluklar onarılırken, metil eklentileri MGMT yokluğunda ebeveyn DNA'sında kalmaya devam eder. Bu, DNA çift sarmallı kırılma oluşumuna, hücre tutuklanmasına ve ölüme neden olan uyumsuzluğa yol açar (Daniel vd. , 2019). TMZ, asidik pH değerlerinde stabil oral uygulamaya izin verebilen ancak pH 7,4'te 1,8 saatlik bir plazma yarı ömrü ile pH 7'nin üzerinde değişken olan bir ön ilaç görevi görür (Zhang, Stevens & Bradshaw, 2012). TMZ için yan etkiler, saç dökülmesi, bulantı, kusma, baş ağrısı, yorgunluk ve anoreksidir (Nabors vd. , 2013). Pediatrik yüksek dereceli gliomalar (HGG)'ın sağkalım oranları iyileşmemiştir ve prognozları 10 ila 18 aylık medyan genel sağkalım ile son derece zayıf kalmıştır. En yaygın olarak kullanılan tedavi cerrahi rezeksiyon ardından fokal radyoterapi ve TMZ'i kapsar (Guerra-García vd. , 2020). İlaç, beyin tümörleri nedeniyle özellikle yetişkin hastalarda yararlıdır ancak TMZ tedavisinden sonra tedaviye

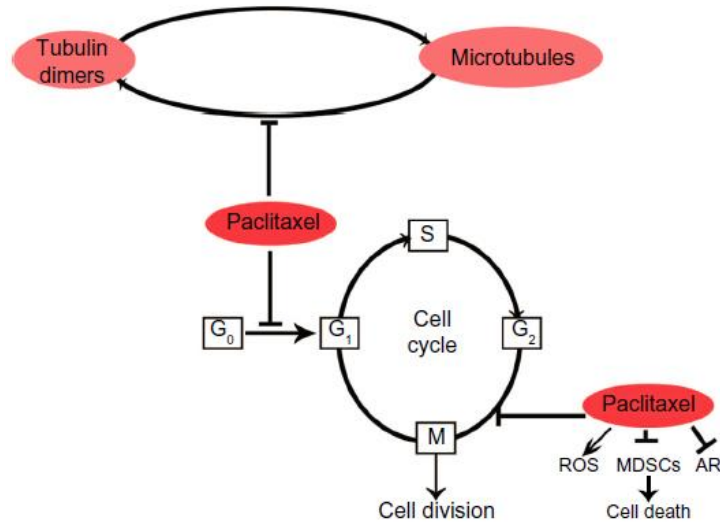
bağlı lösemi vakaları olduğu belirtilmiştir. TMZ'in diğer ajanlarla kombinasyon yoluyla etkisini artırma potansiyelinin incelenmesi için çalışmalara ihtiyaç vardır (Braun, Bauer, Pannen & Werdehausen, 2015; Keir vd. , 2013)



Şekil 2.5. Temozolomid mekanizmasının şematik gösterimi. Temozolomid hücre içinde DNA'yı metilleyen MTIC'e dönüştürülür. Hüresel onarım mekanizmaları ayarlanamaz, bu da DNA kesiklerine ve nihayetinde apoptoza neden olur (Wesolowski, Rajdev & Mukherji, 2010)

2.9.2. Paklitaksel

Taksol, ABD Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından 2014 yılında, periton metastazı olan yumurtalık kanserinin tedavisi için onaylanmıştır. Taksol, *Taxus brevifolia*'nın kabuğundan elde edilen iyi bilinen doğal antikanser ajanlarından biridir, yaygın olarak paklitaksel formu ile satışa sunulmaktadır. Paklitaksel G0/G1 ve G2/M hücre döngüsünün durdurulmasıyla sonuçlanan polimerize mikrotübüllerini stabilize eder (Zein, Aziz, El-Sayed & Sitohy, 2019). Bir araya getirilmiş mikrotübüllerin depolimerizasyonunun önlenmesi, mitoz veya hücre bölünmesini durdurur ve normalde apoptoz sürecini bloke eden bcl-2'ye bağlanarak apoptozun ilerlemesine izin verir (Şekil 2.6.). Paklitaksel'in malign gliomalara ve beyin metastazlarına karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Yumurtalık karsinomu, baş ve boyun kanserleri, meme kanseri, akciğer kanserine karşı önemli bir antikanser aktivitesi sergilediği bildirilmiştir. Paklitaksel ayrıca lösemi ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri dahil olmak üzere bir dizi başka insan malignitesine karşı da etkili görünmektedir (Koziara, Lockman, Allen & Mumper, 2004; Liebmann vd. , 1993; Najlah vd. , 2018).



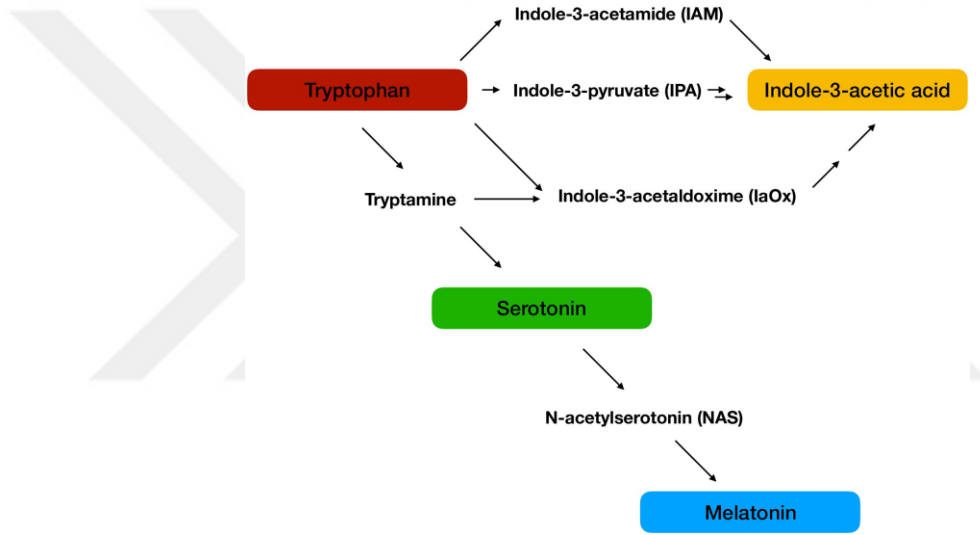
Şekil 2.6. Paklitaksel'in anti-kanser etkileri (Zhang, Yang, Wang & Dong, 2014)

2.9.3. Melatonin

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), insan dahil tüm memelilerin epifiz bezi tarafından salgılanan indolamindir (Erland & Saxena, 2019). Melatonin, hidrofobikliğinden dolayı pasif difüzyon yoluyla membranları geçebilen bir triptofan türevidir (Liu, Labani, Cecon & Jockers, 2019; Reiter, 1998).

Melatonin ayrıca, retina, gastro intestinal sistem, deri, kemik iliği ve lenfositler gibi ekstra-pineal dokular tarafından da salgılanır. Sentezi ve salgılanması, karmaşık bir sinir ağı aracılığıyla üst kiyazmatik çekirdek tarafından düzenlenir (Şekil 2.7.). Melatonin seviyesi gece boyunca yükselir ve gün içinde düşer. Karanlık, melatonin sentezini ve salgılanmasını ilerleten noradrenalin açığa çıkartarak fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesi sağlanır. Melatonin, sirkadian ritim başta olmak üzere, üreme aktivitesi, immün modülasyon, nöro-proteksiyon, gastrointestinal fonksiyonlar, karsinogenезin inhibisyonu, kök hücre proliferasyonu, antiinflamatuvar etki, yaşlanmanın kontrolü ve düzenlenmesinde yer alır (Samanta, 2020). Sirkadiyen ritim bozulması, depresyon, uyku bozuklukları, koroner kalp hastalıkları ve kanser gibi çeşitli patolojilere yol açar. Artan sayıda çalışma, hücre döngüsü düzenlemesinde sirkadiyen ritmin dahil olduğunu ve bu önemli düzenleyicinin bozulmasının, kontrolsüz bir hücre bölünmesine ve daha fazla kanser gelişimine yol açtığını göstermektedir. Antikanser bağışıklığının melatonin tarafından tetiklendiği gösterilmiştir (Moradkhani vd. , 2020). Melatonin doğrudan ve dolaylı bir antioksidan olduğu için nöroprotektif bir ajan olarak kabul edilir. Melatonin'in

nöroprotektif özellikleri ve sirkadiyen rahatsızlıklar üzerindeki düzenleyici etkileri, nörodejeneratif hastalıkların semptomatik tedavisinde melatoninin terapötik bir madde olarak faydalarını doğrular. Melatoninin antioksidan etkinliği yüksektir çünkü serbest radikal süpürme ile oluşan metabolitler aynı zamanda serbest radikal temizleyiciler olarak da işlev görür. Melatoninin nöropatolojik değişiklikleri yalnızca serbest radikalleri temizleyerek değil, aynı zamanda antioksidan enzimleri artırarak ve nöronal, astrosit ve mikrogliyal hücreler tarafından serbest radikal oluşumunu azaltarak da durdurduğu gösterilmiştir (Pandi-Perumal vd. , 2013; Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic & Mazur, 2006).

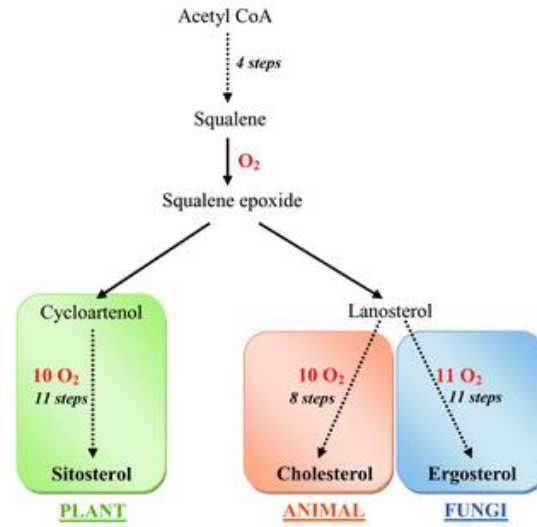


Şekil 2.7. Melatonin sentez basamakları (Erland & Saxena, 2019)

2.9.4. Ergosterol

İlk olarak mayada keşfedilen ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol), genellikle mantarlarda bulunur (Chuang, Hsieh & Lee, 2020). Hemen hemen tüm ökaryotik mantarlarda önemli bir membran sterolü olan ergosterol, *Phellinus ellipsoideus*, *Phellinus yamanoi*, *Hypholoma fasciculare*, *Tricholoma mongolicum* ve *Lycoperdon pyriforme* dahil olmak üzere tıbbi mantarlarda yaygın olarak bulunur. Ergosterol, hücre zarının temel bir sterolüdür ve bir dizi savunma geninin ekspresyonunu aktive edebilir (Raina vd. , 2014). Ergosterol, hayvan hücrelerindeki karşılığı olan "kolesterol" e benzer bir role sahip bir hücre zarı bileşenidir. Ergosterolün ultraviyole aralığında elektromanyetik

radasyona maruz kalması, fotokimyasal olarak ergokalsiferole dönüşmesine yol açar. Ultraviyole radyasyonlara maruz kaldıktan sonra ergosterolden D2 vitamini oluşumuna öncülük eder. D2 vitamini provitamini ergosteroldür. Bu nedenle, mantar biyokütlesinin UV radyasyonlarıyla ($\lambda = 280$ ila 320 nm) ışınlanması, ergosterolün viyosterole dönüştürülmesi ve ardından D2 vitamini ya da ergokalsiferol oluşturmak için provitamin D2'den D2 vitamini oluşumuyla sonuçlanır (Singh & Passari, 2019). Son çalışmalar ergosterolün, in vitro ve in vivo çalışmalarda anti tümör ve antianjiyojenik aktiviteler gösterdiğini ortaya koymaktadır ve şu an için veriler, ergosterolün artık yan etkisi olmayan, kanser hücresi ölümüne neden olma potansiyeline sahip, güçlü bir ilaç adayı potansiyeline vurgu yapmaktadır (Zhang vd. , 2016) (Şekil 2.8.). Ergosterol'ün, insan melanomu, glioblastoma, kolon, yumurtalık, akciğer ve meme kanseri hücrelerinde antitümör özelliklere sahip olduğu bulunmuştur. (Lin, Lee, Alagie & Su, 2017). Ayrıca, ergosterolün, konakçı hücrelerde programlanmış hücre ölümünü tetiklemede rol oynadığı için bir immünoaktivite rolüne sahip olduğu da bildirilmiştir (Papoutsis vd. , 2020).



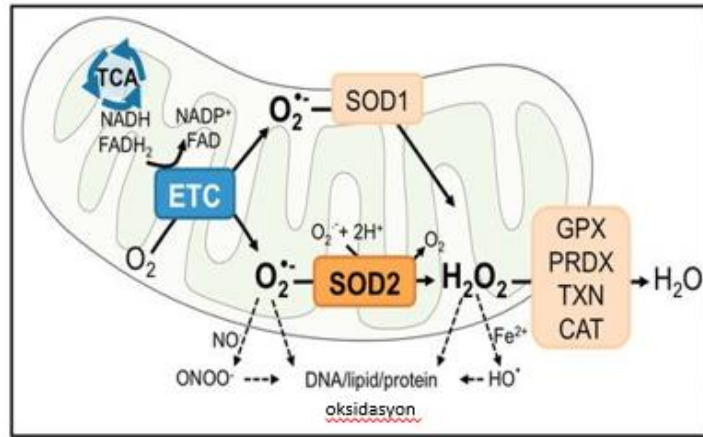
Şekil 2.8. Sterol biyosentez yolları. Bitkiler, hayvanlar ve mantarlarda sterollerin basitleştirilmiş genelleştirilmiş sentetik yolu. Sterol yollarının son ürünleri sırasıyla bitkiler, hayvanlar ve mantarlar için sitosterol, kolesterol ve ergosteroldür (Dupont vd. , 2012).

2.10. Sinyal Yolakları

2.10.1. Antioksidan Sinyal Yolağı

Reaktif oksijen türleri (ROS), moleküler oksijenden türetilen çeşitli molekülleri ve serbest radikalleri tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Moleküler oksijen, dış kabukta iki eşleştirilmemiş elektron içerir. İki tek elektron aynı dönüşe sahip olduğundan, oksijen bir seferde sadece bir elektronla reaksiyona girebilir ve bu nedenle iki elektron ile kimyasal bir bağ içinde çok reaktif değildir. Oksijenin bir seferde bir elektron kaybetmesi, nispeten kararlı ara ürünler üretir (Dröge, 2002; Turrens, 2003). Reaktif oksijen ve azot türlerinin (ROS/RNS) üretimi ile antioksidan savunma arasındaki dengesizlik olarak tanımlanan oksidatif stresin farklı patofizyolojik koşullarda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Oksidan/antioksidan denge, kanserin başlaması ve ilerlemesi için önemli bir faktördür. Antioksidan enzimler, hücreleri reaktif oksijen türleri hasarından korumak için kombinasyon halinde çalışan endojen ve eksojen moleküllerdir. Endojen antioksidan bileşikler enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırılır. Bu antioksidanlar, ROS'un neden olduğu hasarları önleyerek ve onararak serbest radikal temizleyici görevi görür. Bağışıklık savunmasını geliştirebilir, hastalık ve kanser riskini azaltabilir. Antioksidanlar, kendilerini okside ederek serbet radikaller üzerinde etki ettiğinden vücutta sürekli restore edilmelilerdir. (Bostwick vd. , 2000; Gupta vd. , 2014) Radikal türleri temizleyebilen zincir kırıcı antioksidanlar birincil antioksidanlar olarak adlandırılır. İkincil antioksidanlar tekli oksijen söndürücüler, radikal tür içermeyen ürünler veren peroksit ayrıştırıcıları, metal şelatörler, oksidatif enzim (lipooksijenaz) inhibitörleri veya Ultraviyole radyasyon emicileridir. İkincil grup antioksidanlar, birincil grup antioksidanlarla sinerjik etki yoluyla kombinasyon halinde güçlü bir etki gösterebilir. Ayrıca, enzimatik olmayan antioksidanların sentezini veya rejenerasyonunu katalizleyebilir (Pisoschi & Pop, 2015). Belirli bir sistemde serbest radikallere karşı etkili olan bir antioksidan, diğer sistemlerde etkili olmayabilir. Ayrıca, bazı durumlarda, bir antioksidan, toksik ROS gibi ürünler üreterek bir prooksidan olarak işlev görebilir. Mitokondri ve diğer hücresel kaynaklardan elde edilen ROS, geleneksel olarak, lipidlere, proteinlere ve DNA'ya zarar verme potansiyeli olan metabolizmanın toksik yan ürünleri olarak kabul edilmiştir. ROS'un yüksek reaktivitesi ve nispi

kararsızlığı, biyolojik sistemlerde tespit edilmelerini veya ölçülmelerini son derece zorlaştırır (Thannickal, Fanburg & Physiology, 2000). Hücresel ROS seviyesi bunları üreten ve ortadan kaldıran hücresel süreçlerle düzenlenmektedir. Süperoksit anyonu Mitokondriyal solunum zincirinin başlangıç elemanıdır ve enzim süperoksit dismutaz (Sod) tarafından hızla H_2O_2 'ye dönüştürülür ve akabinde katalaz (Cat) veya glutatyon peroksidaz ile suya indirgenir (Şekil 2.9.). Cat, ana hücresel antioksidan enzimlerden biridir ve oksidatif stres sırasında fazla H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasını sağlar (Singh, Savanur, Srivastava, D'Silva & Muges, 2017). Dış uyaranlar da hücre içi ROS oluşumunu indükler ve bir dizi antioksidan protein oluşmasında rol alırlar. Bu antioksidan proteinler Cu-Zn-Sod (Sod 1) ve Mn-Sod (Sod 2) içeren Sod'lardır. Manganez süperoksit dismutaz (MnSod), O_2 radikal anyonun detoksifikasyonunda ilk adımı katalize eden mitokondriyal enzimdir. MnSod, insan kromozomu 6q25.2'ye lokalize olan nükleer gen Sod 2 tarafından kodlanır. Matristeki Sod 2, zarlar arasında yayılamayan süperoksidi H_2O_2 'ye dönüştürür. Daha sonra Cat enzimi ile suya (H_2O) indirgenir (Şekil 2.9). Sod 2 ile karşılaştırıldığında, Sod 1 esas olarak zarlar arası boşluk ve sitozolün süperoksitini H_2O_2 'ye düşürür (Huang, Peng, Oberley, Domann & Medicine, 1997; Zhang vd. , 2016).



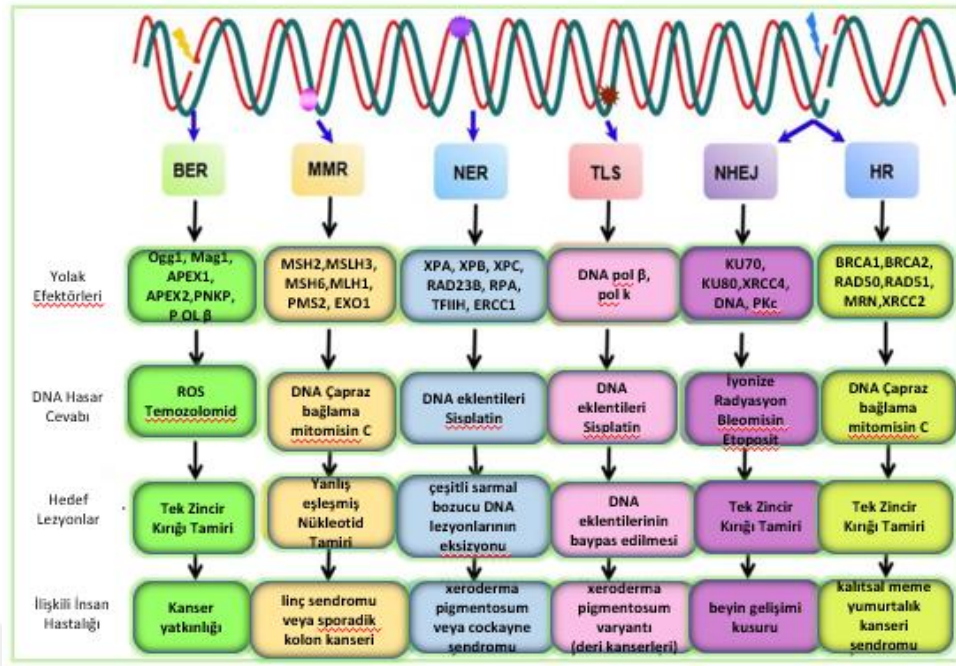
Şekil 2.9. Mitokondriyal SOD2'nin işlevi. SOD2, O_2 'nin H_2O_2 'ye bozulmasını katalize etmek için mitokondriyal matrikste lokalize edilmiştir. H_2O_2 ayrıca peroksizomlarda katalaz (CAT) veya glutatyon peroksidaz (GPX) sistemi tarafından metabolize edilir (Kim, Gupta Vallur, Phaëton, Mythreye & Hempel, 2017).

2.10.2. DNA Tamir Sinyal Yolağı

Hücreler sürekli olarak genomik DNA hasarına neden olan, DNA replikatif stresi, normal hücrel metabolizma sırasında üretilen ROS'lar gibi endojen streslere, iyonlaştırıcı radyasyon, kimyasal maddeler ve virüs, bakteri gibi zararlı mikroorganizmalar gibi eksojen streslere maruz kalır ve bu da bozulmaya, deaminasyona, DNA çapraz bağlarına, tek sarmal kırılmalara (SSB'ler), çift sarmal kırılmalara (DSB'ler) ve kromozomal translokasyonlara yol açar (Samarakkody, Shin, Cantor & Cells, 2020). DNA, iyonlaştırıcı radyasyon ve kimyasal hasar kaynakları ile mücadele etmektedir. DNA'yı kanser veya diğer hastalıkları tedavi etmek için bir araç olarak hedefleyebilmek için, DNA bazlarının alkillenmesini indükleyen metil metansülfonat ve TMZ gibi alkilleme maddeleri, azotlu hardallar gibi DNA hasarına neden olan çeşitli klinik ilaçlar geliştirilmiştir. Topoizomer I veya II inhibitörleri gibi kemoterapötik ilaçlar, topoizomeraz-DNA kovalentini yakalayarak tek zincirli veya çift zincirli kopma hasarları oluşturur (Dexheimer, 2013). Onarılmamış DNA, genetik bütünlüğü tehlikeye atarak gelişimsel bozukluklara, hücre ölümüne veya kansere yol açabilir. Organizmalar hasara tepki vermek için çeşitli yollar geliştirmişlerdir (Gomez Godinez vd. , 2020). DNA hasarı hücre tarafından tanınırsa, hatalı replikasyonu önlemek için çeşitli yanıtlar meydana gelebilir. Hücresel düzeyde, kontrol noktaları hücreyi tutuklamak için etkinleştirilebilir, hasarı telafi etmek için gen transkripsiyonu yukarı regüle edilebilir veya hücre apoptoza yönlendirilebilir. Alternatif olarak, hasar DNA düzeyinde onarılabilir ve böylece hücrenin planlandığı gibi çoğalması sağlanır. Çok sayıda molekülü içeren karmaşık yollar bu tür onarımı gerçekleştirmek için gelişmiştir (Goode, Ulrich, Potter & Biomarkers, 2002). Memeli hücreleri Baz eksizyon tamiri (BER), uyumsuzluk tamiri (MMR), nükleotit eksizyon tamiri (NER) ve homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) içeren çift zincirli kopma tamiri olmak üzere beş ana DNA onarım mekanizmasına sahiptir (Şekil 2.10.). BER, DNA sarmalının genel yapısını önemli ölçüde bozmayan hasarlı DNA bazlarının onarımından sorumludur. MMR sistemi, replikasyon polimerazlarının, prova okuma aktivitesinden kaçan bazların, replikasyon sonrası onarımında önemli bir rol oynar. NER, DNA'dan çok çeşitli sarmal bozucu lezyonları tanıyabilen ve kaldırabilen çok yönlü bir onarım yoludur. Mekanik olarak BER ile benzer olsa da, NER yolu daha karmaşıktır ve çok aşamalı kes ve yama benzeri bir mekanizma gerçekleştirmesi için otuz farklı proteinin kullanılmasını gerektirir (Dexheimer, 2013).

Onarım mekanizmaları kromozomların maruz kaldıkları farklı DNA hasarlarına göre belirlenir. Tek iplik hasarları, hasarlı bazın eksizyonu ve ardından zıt ipliğin şablon olarak kullanılmasıyla BER ya da NER mekanizmaları ile onarılır. İyonlaştırıcı radyasyon, transpoze edilebilir elemanların eksizyonu gibi etmenlerle çift iplik hasarları (DSB'ler) oluşabilir. Tek sarmallı DNA hasarındaki gibi bir DSB tamamlayıcı sarmal şablon olarak kullanılarak onarılamaz. Bunun yerine NHEJ veya HR onarım mekanizmalarından biri kullanılır (Waterman, Haber & Smolka, 2020). NHEJ yolunun, onarım konusunda yetkin hücrelerde tüm hücre döngüsü aşamalarında hareket edebilen ana yol olduğu bilinmektedir. Bunun tersine, yüksek doğrulukta HR yolu, DNA'nın hasarlı kısımlarının yeniden oluşturulması için bir şablon olarak homolog bir kardeş kromatidin kullanılabildiği S ve G2 fazlarında etkilidir (Hufnagl vd. , 2015). Genomdaki oksidatif hasarlı bazların baz eksizyon onarım yolu ile onarımı, geniş substrat aralığına sahip DNA glikosilazlar tarafından bu lezyonların eksizyonu ile başlatılır (Dou, Mitra & Hazra, 2003). Tanımlanan sekiz DNA glikosilazından dördü urasili DNA'dan çıkarabilir. Daha yüksek ökaryotlara özgü olan Smug 1, muhtemel olarak sitozinin deaminasyonu ile DNA'da ortaya çıkan urasili çıkarır (Wood, Mitchell, Sgouros & Lindahl, 2001). İnsan Smug 1 (hSmug 1), urasilin N-glikosidik bağını ve epigenetik düzenleme sırasında oluşan bazı urasil lezyonlarını, hidrolize eder. HSMUG1'in DNA onarım yolundaki işlevsel önemine rağmen, hasar tanıma mekanizması bugüne kadar anlaşılamamıştır (Iakovlev, Alekseeva, Vorobjev, Kuznetsov & Fedorova, 2019). Xrcc 1, DNA kinaz, DNA fosfataz, DNA polimeraz, DNA deadenilaz ve DNA ligaz aktiviteleri dahil olmak üzere DNA tek iplikli kırılma onarımının (SSBR) birden çok enzimatik bileşeniyle etkileşime giren moleküler bir iskele proteindir. Xrcc 1 işlevinin son yıllarda ortaya çıkan en önemli özelliği, PARP1 aktivitesi ile yakın ilişkisi ve kalıtsal nörodejeneratif hastalığı önlemedeki kritik rolüdür (Gomez Godinez vd. , 2020). Xrcc 1 gen polimorfizmleri, kanser epidemiyolojisi çalışmalarında giderek daha fazla araştırılmaktadır (Zhang vd. , 2018). Neil 1 ve Neil 2 DNA glikosilazları, mitokondriyal DNA'yı nöral krest farklılaşması sırasında oksidatif hasara karşı korur. Bir yandan, baz eksizyon onarım enzimleri olarak hareket ederek DNA'nın hasardan korunmasına yardımcı olurlar, yani hasarlı DNA yapı taşlarını kaldırır. Öte yandan, hem gelişme hem de hastalıkla ilgili olan demetilasyon adı verilen bir süreçte DNA yapı taşlarından metil olarak bilinen kimyasal bir grubun çıkarılmasına yardımcı olurlar (Han vd. , 2019). Exo1 proteini,

yüksek ökaryotlar aracılığıyla korunur ve in vivo rekombinasyon ve uyumsuzluk düzeltmesinde rol oynar. Uyumsuzluk düzeltme fonksiyonu ile uyumlu olarak, tomurcuklanan maya Exo1, Msh2 proteini ile etkileşime girer (Tsubouchi & Ogawa, 2000). DNA uyuşmazlığı onarımının genetik ve epigenetik inaktivasyonunun kansere bağlı genlerde değişikliklere ve kanser gelişimine yol açabileceği iyi bilinmektedir. Bu sistemin birincil işlevi, DNA replikasyonu sırasında DNA polimeraz kaymasının bir sonucu olarak ortaya çıkan baz-baz uyumsuzluklarını ve ekleme-silme döngülerini ortadan kaldırmaktır (Santos vd. , 2017). Yapılan çalışmalar, nükseden GBM'de, özellikle MSH6'yı içeren, MMR genlerinin önemli miktarda inaktive edici mutasyonlarını ortaya çıkarmıştır. MMR gen değişikliklerinin, TMZ tarafından seçildiği veya neden olduğu ve son derece yüksek bir mutasyon yükü ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Indraccolo vd. , 2019). DNA MMR proteini Mlh 1, insanlardaki MutL homolog 1 (MLH1) geni tarafından kodlanır ve Escherichia coli'nin DNA MMR gen mutL'sinin bir homologudur. MMR işlevi DNA replikasyonu ile ilişkilidir, DNA polimeraz önleme fonksiyonundaki eksiklikleri düzeltmek. Sonuç olarak, Mlh 1 geninin metilasyonu kanser gelişiminde önemli bir öneme sahip olabilir (Lahtz & Pfeifer, 2011). İnsan kromozomu 3p24-p25 üzerinde bulunan Rad 18 geni, mayadan insanlara kadar çeşitli organizmalarda replikasyon sonrası onarımda çok önemli bir rol oynar (Kanzaki vd. , 2007).



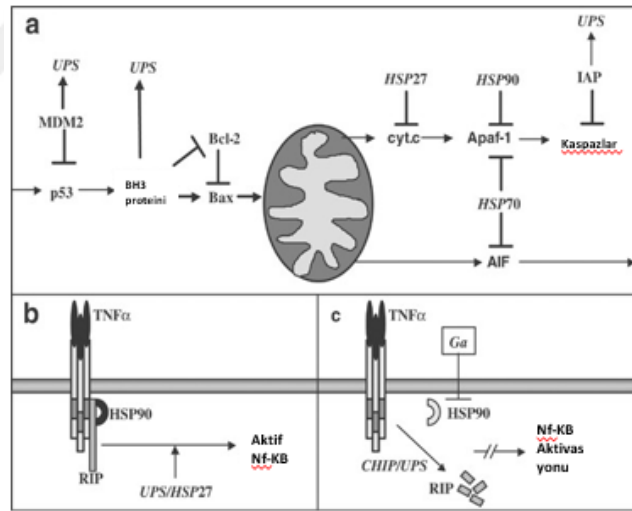
Şekil 2.10. DNA onarım yolunun moleküler mekanizmaları, yol efektörleri ve biyolojik işlevleri. BER:Baz eksizyon onarımı, MMR:Yanlış eşleşme onarımı, NER:Nükleotid eksizyon onarımı, TLS: Translesyon DNA sentezi, NHEJ:Homolog olmayan uç birleştirme, HR:Homolog rekombinasyon (Tian vd. , 2015).

2.10.3. Isı Şok Proteinleri Sinyal Yolağı

Isı şok proteinleri (Hspler) ailesi, radyasyon, ağır metal, oksidatif stres, toksinler, nörodejeneratif hastalık, travma ve kemoterapi gibi bazı önemli durumlarda artan evrimsel olarak korunmuş protein sınıfıdır. Herhangi bir stres durumu olmayan normal hücrelerde protein homeostazını sürdürürler ve anti-apoptotik moleküller olarak bilinirler. Rahim, servikal, mide, meme, mesane, oral, kolorektal, akciğer, endometriyal ve prostat gibi çeşitli kanser türlerinde Hsp seviyesinin yükselmesinin, tümörlerin başlaması, proliferasyonu ve metastazı ile koordine olduğunu göstermiş ve bu da Hsp'nin tümör baskılamasında bir terapötik strateji olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür (Tavana, 2020). Hücre döngüsünün bakımı gibi hücrenin hayati fonksiyonları Hsp ile ilişkilidir. Hücre homeostazının düzenlenmesinde ve hücre sağkalımının desteklenmesinde Hspler moleküler şaperonlar olarak işlev görür (Sreedhar & Csermely, 2004). Stres yanıtı sırasında, birçok Hspnin hücre içi seviyeleri, ortaya çıkan katlanmamış proteinlerin artan konsantrasyonuna bağlı olarak hızla artar. Bu olay, Hsp'nin indüklenen ekspresyonunun

sitoprotektif olduğunu, hücreleri toksik saldırıdan koruduğunu ve ölümlerini önlediğini göstermektedir (Concannon, Gorman & Samali, 2003). Hspler, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinleri tanıyarak protein yapılarını düzeltir veya uygunsuz protein katlanmasını önler. Molekül ağırlıklarına göre Hsp100, Hsp90, Hsp 70, HSP60, Hsp40 ve küçük Hsp aileleri olarak altı grupta sınıflandırılırlar (Siddiqui, Kang, Park, Khan & Shim, 2020). Isı şoku, çevresel ve patofizyolojik stres faktörleri tarafından indüklenen ısı şoku proteini 27 (Hsp 27), bir protein şaperonu ve bir antioksidan görevi gören çok fonksiyonlu bir proteindir. Hsp 27, apoptoz ve aktin hücre iskeletinin yeniden form kazanmasının engellenmesinde önemli bir rol oynar. Hsp 27, birçok kanserde yukarı regüle edilir ve zayıf bir prognozun yanı sıra tedavi direnciyle ilişkilidir, bu sayede hücreler normalde apoptozu indükleyen terapötik ajanlardan korunur (Choi, Kam, Kim, Park & Lee, 2019). Ökaryotlarda, Hsp 60 mitokondri, sitozol ve kloroplastlarda bulunur ve Hsp10 ile etkileşime girerek fonksiyonel bir konformasyon için yeni oluşan polipeptitlere eşlik eder. Hsp 60 ayrıca mitokondriyal Hsp 70 ve apoptoz sürecine katıldığı için survivin ve p53 ile etkileşime girer. Protein katlanma görevinin yanı sıra hücre içi protein trafiğinde, peptid-hormon sinyallemede rol oynar. Hsp 60, çeşitli endojen ve eksojen proteinlerin işlevlerine bağlanabilir ve bunlara müdahale edebilir (Cappello vd. , 2008). Hsp 70, protein homeostazında merkezi bir rol oynayan, oldukça korunmuş ve indüklenebilir bir ısı şok proteinidir. Hsp 70'in ana işlevi, ATP'ye bağımlı bir şekilde protein katlama sürecine yardımcı olduğundan hücreleri fizyolojik, patolojik ve çevresel hakaretlerden korumaktır. Hsp 70, kritik hücre hayatta kalma fonksiyonları sağladığından, kanser hücrelerinin bu şaperona ihtiyacı olduğu düşünülmektedir. Hsp 70'in farklı kanser türlerinde yukarı regüle edildiğini ve tümör büyümesi, istilası, göçü ve anti-kanser tedavisine dirençle ilgili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Elmallah vd. , 2020). Hsp 90 şaperon inhibitörlerinin önemli antikanser ajanlar olarak bilinmesinin yanı sıra, Hsp 70 proteinlerinin tümü, doğru protein katlanmasına aracılık etmede ve sonuç olarak protein homeostazının korunmasında rol oynar. Hsp 90'dan farklı olarak, Hsp 70'in gerçekten spesifik hedef proteinleri yoktur. Bunun yerine, bu protein, katlanmamış ve yanlış katlanmış proteinler üzerindeki açıkta kalan hidrofobik kalıntıların uzantılarına bağlanarak, onları ara katlanmış bir durumda tutar ve kümelenmelerini önler. Hsp 90'dan farklı olarak, Hsp 70 yanlış katlanmış proteinleri ATP bağımlı bir şekilde doğrudan açabilir. Hsp 70 genel olarak stres kaynaklı bir hayatta kalma proteini olarak

kabul edilmekle birlikte, birkaç aile üyesi de önemli temizlik rolü üstlenir (Murphy, 2013). Hsp 90, çoğu kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve viral enfeksiyonlar dahil refrakter hastalıklarla yakından ilişkili olan 300'den fazla proteininin olgunlaşmasının düzenlenmesinde yer alır. Hspler ve Ubiquitin-proteazom sistemi (UPS), hasar gören proteinlerin yeniden katlanmasına (Hspler) veya yok edilmesine (UPS) yardımcı olmaktadır ve bu sistemler arasındaki koordineli etkileşim, temel bir protein kalite kontrol mekanizması olarak işlev görür. Proteinlerin bu yollardan birine bölünmesi, protein triyajı olarak adlandırılır. Her iki sistem hücre ölümüne karşı koruyucu bir etki göstermektedir. Hsplerin antiapoptotik etkileri, şaperon işlevleriyle doğrudan ilişkili görünmeyen protein-protein etkileşimlerini içerir. Hsp 27, mitokondriden salındığında Sitokrom c ile etkileşime girerken, Hsp 70 veya Hsp 90, Apaf-1 ile etkileşime girer ve bu, her durumda apoptozom oluşumunu inhibe ederek Kaspaz aktivasyonuna giden postmitokondriyal yola olumsuz bir şekilde müdahale eder. Hsp 70 ayrıca Kaspazdan bağımsız apoptozu engellemek için AIF ile etkileşim potansiyeline sahiptir (Şekil 2.11.) (Garrido & Solary 2003).

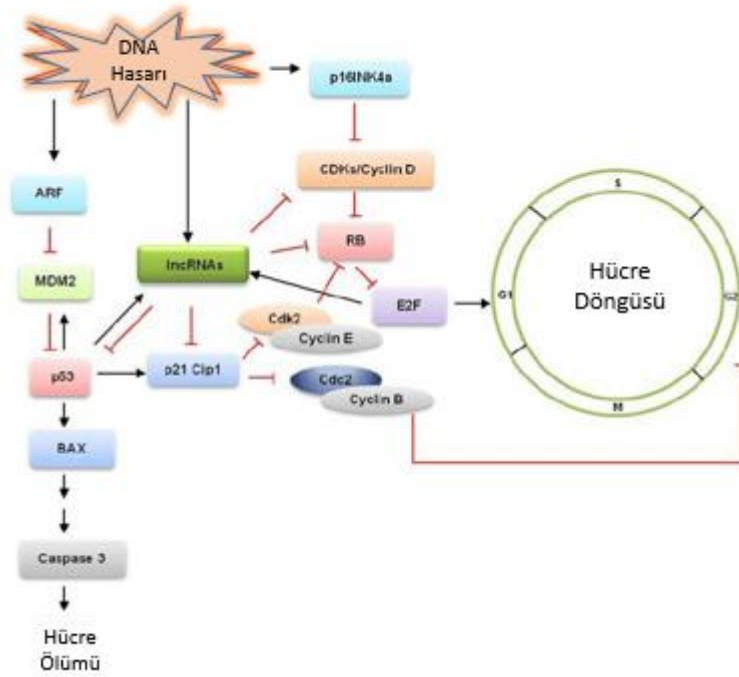


Şekil 2.11. (a)-Protein triyajı mekanizmasının hücre ölümü yollarına etkisi. (b)-Hem HSP'leri içeren renatürasyon yolu hem de ubiquitin-proteazom sistemini (UPS) içeren yıkım yolu, hücre ölüm yollarına karşı bağımsız bir koruyucu etki uygular. Hspler ve UPS, hücre ölümünü modüle etmek için uyum içinde hareket edebilir; örneğin, Hsp 90, Tnfr 1 ile Tnf α etkileşimine yanıt olarak Nf-kb yolunu etkinleştirmek için RIP ile bağlantı kurar. Hsp 27, Nf-kb aktivasyonunu kolaylaştırmak için UPS ile işbirliği yapabilir. (c)-Hsp 90'ın inhibisyonu, RIP'den CHIP aracılığıyla UPS aracılı bozunmayı hedefler, böylece Nf-kb yolunun aktivasyonunu önler. (Garrido vd. , 2003).

2.10.4. Hücre Döngüsü Sinyal Yolağı

Memeli hücre döngüsü, genetik materyalin kopyalanmasını ve hücre bölünmesini sağlayan organize bir süreçtir. Proliferasyon, siklinler ile kompleks halinde hareket eden sikline bağlı kinaz (CDK) tarafından düzenlenir (Otto & Sicinski, 2017). Siklin / sikline bağımlı kinaz kombinasyonları, G1, G1 / S, S ve G2 / M fazlarında hücre döngüsü olaylarını yönlendirir ve düzenler (Li, Qian & Sun, 2019). Siklinler, hücre döngüsü düzenlemesinde merkezi olarak yer alan yapısal bir protein ailesidir. Fosforilasyon ve hedef substratları etkisiz hale getirerek hücre döngüsü kontrol noktalarından ilerlemeyi kontrol eden holoenzim sikline bağlı kinaz komplekslerinin düzenleyici alt birimleridir (Joyce vd. , 2001). Hücre döngüsü fazlar arasında ki geçiş, spesifik hücre döngüsü noktalarında aktive edilen serin / treonin protein kinaz ailesi üyesi sikline bağlı kinazlar olan düzenleyici ana hücre proteinleri tarafından düzenlenir. bir düzen içinde gerçekleşir. Şimdiye kadar tanımlanan dokuz CDK'nın beşi, hücre döngüsü (G1 evresi: CDK4, CDK6 ve CDK2, S evresi: CDK2, G2 ve M evresi CDK1) esnasında, aktiftir. CDK aktivasyonu periyodik olarak hücre döngüsü sırasında yükselip düşen siklin protein seviyesi dalgalanması sonucu sağlanır. Farklı hücre döngüsü fazları için farklı siklinler gereklidir. Şimdiye kadar on altı siklin tanımlanmıştır, ancak CDK gibi hepsi hücre döngüsü ile ilişkili değildir (Vermeulen, Berneman & Van Bockstaele, 2003). GBM hücrelerinin özelliklerinden biri, GBM'nin gelişmesine ve ilerlemesine katkıda bulunan hücre döngüsünün deregülasyonudur. G1 ilerlemesi, siklin D -CDK4 / 6 ve siklin E -CDK2 kompleksi tarafından yönlendirilmektedir. Siklin A - CDK2, S fazının başlangıcını başlatırken, siklin B - CDK1, G2 fazı yoluyla mitotik faza hücre geçişini sağlamaktadır. GBM'nin onkogenezinde hücre döngüsü ilerlemesinin önemi göz önüne alındığında, hücre döngüsü ilerlemesinin hedeflenmesi, GBM'nin tedavisinde potansiyel olarak umut verici bir strateji olabileceği düşünülmektedir (He, Shen, Li & Mao, 2020). Siklin / CDK kompleks birleşmesi ve katalitik aktivite, Cyclin / CDK komplekslerine bağlanan ve aktivitelerini bloke eden CDK inhibitörleri (CDKI'ler) adı verilen bir dizi küçük protein aracılığıyla düzenlenir (Abbastabar vd. , 2018). Siklin kinaz inhibitörü P21, G1 tutuklanmasını indükleyebilir ve Cdk'leri inaktive ederek veya proliferatif hücre nükleer antijeninin (PCNA) aktivitesini inhibe ederek S fazına girişi bloke edebilir. P21 geninin transkripsiyonu, P53'e bağlı ve bağımsız mekanizmalarla aktive edilir. P21'in aşırı ekspresyonu G1'in tutuklanmasına neden olarak in vitro ve in vivo tümör büyümesini

etkili bir şekilde bastırır. Bu protein, G1 siklin / Cdk komplekslerini inhibe ederek hücre döngüsünün düzenlenmesinde anahtar bir rol oynar (Gartel, Serfas, Tyner & Medicine, 1996). P27^{Kip1} ve p21^{Kip1}, Cdk inhibitörlerinin Cip / Kip ailesinin üyeleridir. Birden fazla siklin / Cdk kompleksini bağlayan ve inhibe eden korunmuş bir N-terminal alanını paylaşırlar. P27, intrinsik veya hücre dışı antimitojenik sinyallere, siklin / Cdk'lere bağlanıp inhibe ederek hücre döngüsü ilerlemesini bloke ederek yanıt verir. P27 aynı zamanda henüz tanımlanmamış mekanizmalar yoluyla apoptozu, farklılaşma zamanlamasını ve göçü düzenleyen bir tümör baskılayıcı olarak işlev görür (Philipp-Staheli vd. , 2004). P27, G1 / S fazı kontrol noktasında hücre döngüsünü bloke eder ve G0 ve G1 fazlarında tutuklanan hücrelerde yüksek oranda eksprese edilir (Talaat, 2013). P53, DNA hasarına hücresel yanıtlarda ve hücre döngüsü ve apoptozun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. P53'ün, P21 geni veya Bax, Bak, Puma, Bcl-2 gibi apoptozun düzenlenmesi ile ilgili genler için bir transkripsiyon faktörü olarak işlev gördüğü iyi bilinmektedir. Ayrıca P53, transkripsiyondan bağımsız mekanizmalar yoluyla ve sitozol veya mitokondride Bcl-2 protein ailesinin üyeleriyle doğrudan etkileşimler yoluyla apoptozu da teşvik edebilir (Doan vd. , 2019). PRb ve P53 yolları, sırasıyla hücre döngüsü ilerlemesini ve hücre döngüsü tutuklamasını veya apoptozu düzenler (Şekil 2.12.) (Schubert vd. , 2020). Hücre siklusu kontrol noktalarını pozitif olarak kontrol eden bu tür genler, kanserde onkogenik aktivasyon için hedefler olabilirken, tümör baskılayıcı genler gibi negatif düzenleyiciler inaktivasyon için hedeflenir (Golias, Charalabopoulos & Charalabopoulos, 2004).



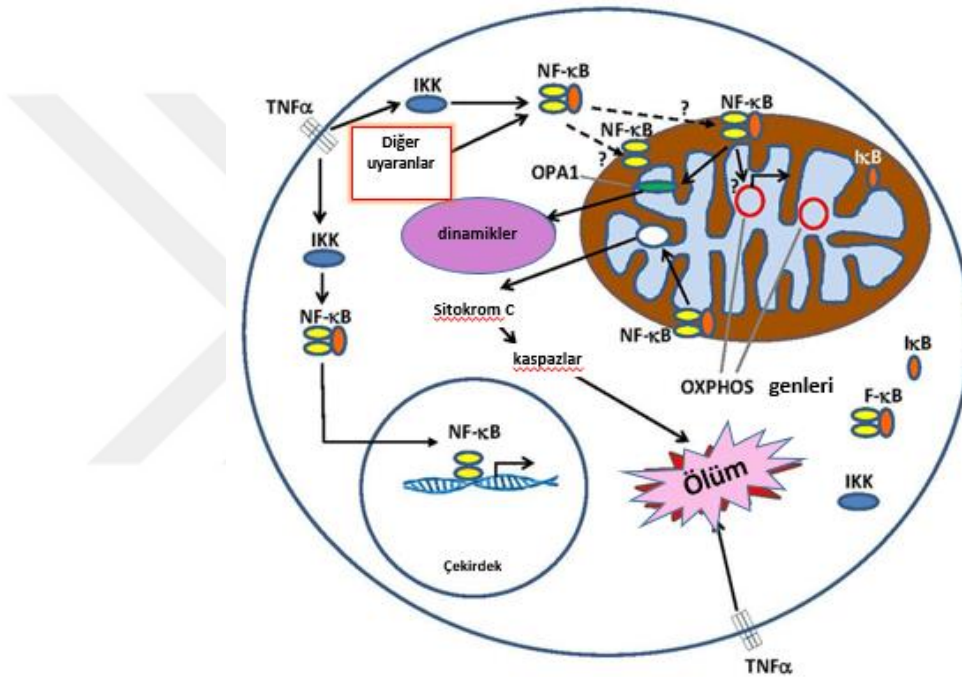
Şekil 2.12. Hücre döngüsü ve apoptoz. Hücre bölünme döngüsünü etkileyen hücre döngüsü kontrol noktası yolları Tümör baskılayıcı yollar P53 ve retinoblastoma (RB) DNA hasarı tepkisini kontrol eder. RB ve P53'ün aktivitesini kontrol eder. RB, G1'de hücre döngüsü tutuklanmasını teşvik eder ve E2F'leri inhibe ederek S fazına girişi düzenler. P53, G1 ve G2'nin tutuklanmasına neden olmak ve apoptozu teşvik etmek dahil olmak üzere çeşitli etkilere aracılık eder. P53 işlevinin kaybı da genomik dengesizliği artırır. Birkaç lncRNA, siklinler-CDK'lar, CKI'ler, pRB, E2F ve p53'ün ekspresyonunu düzenler ve bu nedenle hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynar (Subramanian, Jones & Lal, 2013).

2.10.5. Yaşam Sinyal Yolağı: NF-KB-PI3K-AKT

Nf-kb, hayatta kalma, immün yanıt, inflamasyon, hücre büyümesi ve gelişme gibi çeşitli biyolojik süreçlere katılan bir transkripsiyon faktörüdür. İnaktif hücrelerde, Nf-kb, Ikb- α ve Ikb- β 'yi içeren inhibitör kappa B (Ikb) ailesinin bir üyesi ile etkileşimi ile sitoplazmada tutulur (Serasanambati & Chilakapati, 2016). Ikb kinaz (IKK) kompleksi, iki katalitik alt birimden (IKK α ve IKK β) ve bir düzenleyici alt birim (NEMO)'den oluşur. Aktive edildiğinde IKK, Ikb'yı fosforile ederek proteazomal bozunma için işaretler ve Nf-kb alt birim dimerlerini serbest bırakır. Tlr 4, Tnf- α reseptörü ve interlökin-1 reseptörü bu yolla Nf-kb 'yi uyarır. Bu süreç adaptör protein MyD88 tarafından yürütülür. Bu yol, Nf-kb 'nin klasik veya kanonik yolu olarak kabul edilir (Şekil 2.13.) (Nennig, Schank & Alcoholism, 2017). Alternatif veya kanonik

olmayan yolda ise Nf-kb 'yi indükleyen kinaz IKK-1'i aktive eder ve p100'ün indüklenmesine yol açar. p100 daha sonra p52-RelB dimerine transloke olur (Monaco vd. , 2004). Nf-kb yolağının anormal aktivasyonu, insan kanserlerinde hücre apoptozunun, onkojen mutasyonlarının ve immün uyarımın azaltılması gibi tümörjenezle ilgili süreçlere neden olur. GBM'de önemli bir düzenleyici olan yüksek Nf-kb aktivitesi, kötü prognoz ve kemoterapi ve radyasyona karşı artan dirençle ilişkilidir (Yu vd. , 2019). Tümör hücresi çoğalması, göçü, bağışıklık tepkisi ve apoptozun kontrolünde rol oynar. Çalışmalar, NF-κB geninin tiroid kanseri, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu ve kolorektal kanser gibi farklı kanser türlerinin regülasyon yollarında yer aldığını göstermiştir (Avcı vd. , 2020). Transkripsiyon faktörü Nf-kb ayrıca, immün, enflamatuvar yanıt, hücresel adezyon, farklılaşma, proliferasyon, otofaji, yaşlanma ve apoptoz gibi bir dizi hücresel süreçte çok önemlidir. Benzer şekilde, Nf-kb'nin, artrit, inflamasyon, astım, nörodejeneratif hastalıklar ve kalp hastalığı ile ilişkili olduğu doğrulanmıştır (Lan vd. , 2016). Fosfatidilinositol-3-kinaz (P13k) / protein kinaz B (Akt) / rapamisin (mTOR) ve nükleer faktör kappa-hafif zincir güçlendiricisi (NF / κB) sinyal yollarının çeşitli sinyal yollarının glioma gelişimi ile ilişkisi bilinmektedir (Tsai vd. , 2020). P13k, fosfatidilinositol üretme yeteneğine sahip bir lipit kinazlar sınıfını tanımlar. P13k, bölünmüş bir enzim ailesini içerir: Sınıf I P13k, katalitik ve düzenleyici alt birimleri içerir. Akt olarak da bilinen protein kinaz B (PKB), P13k'nın ana vektörüdür ve çoklu aşağı akım hedefleri olan bir perintal serin / treonin kinaz olarak işlev görür. Akt, P13k'dan gelen yukarı sinyalleri ve rapamisin kompleksi 2'nin (mTORC2) memeli hedefini mTORC1'e aşağı yönde sinyallerle birleştiren ana kinazdır. Bu sinyaller, sağkalım, proliferasyon ve yer değiştirme gibi çeşitli hücresel aktivitelerde etkilidir (Ghoneum & Said, 2019). Akt, serin / treonin kinaz aile üyesidir ve protein kinaz B (PKB) olarak da bilinir. Protein kinaz B (Akt), diğer birçok protein kinaza benzer şekilde, hücre ölümü veya hayatta kalmanın kavşak noktasındadır ve hücre metabolizması, büyüme ve bölünmesi, apoptoz bastırma ve anjiyogenezde rol oynayan çok sayıda birbirine bağlı hücre sinyalleme mekanizmalarında önemli bir rol oynar. Akt, hücresel büyüme faktörlerine aracılık ederek ve pro-apoptotik proteinlerin inaktivasyonu ile apoptozu bloke ederek hücre sağkalımını destekler. Akt tarafından düzenlenen yollardaki aksamalar kanser, diyabet, kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklarla ilişkilidir (Nitulescu vd. , 2018). mTOR proteini hücre büyümesi ve hücre döngüsü ilerlemesinde düzenleyici bir role sahiptir.

mTOR yolağının otofaji üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (Donmez, Kocak & Yildirim, 2017). Siklooksijenaz-2 (Cox-2), hem inflamasyon hem de kanser sırasında yukarı regüle edilen bir enzimdir. Cox-2, inflamasyon bölgesinde pro-inflamatuar sitokinler tarafından indüklenir ve prostaglandinlerin Cox-2 ile indüklenen sentezi, kanser hücresi proliferasyonunu uyarır, anjiyogenezi teşvik eder, apoptozu inhibe eder ve metastatik potansiyeli artırır (Desai, Prickril & Rasooly 2018).



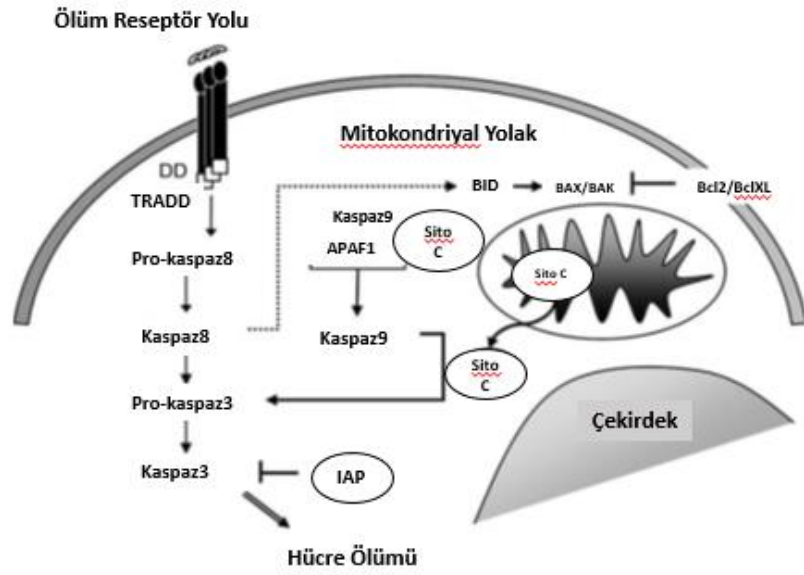
Şekil 2.13. Sitoplazma ve mitokondride Nükleer faktör κ B (Nf-kb) sinyalizasyon yolları. Nf-kb tri-subunit kompleksi (örneğin, p65, p50, I κ B - olası bir kombinasyon) sitoplazmada aktif olmayan bir durumda bulunur. Tnf- α gibi moleküller Tnf reseptörlerine bağlandığında Nf-kb aktivasyonu başlatılır. Diğer harici veya dahili uyarılar da Nf-kb'yi aktive edebilir. Tnf reseptörleri aktive edildikten sonra karmaşık bir sinyal iletim süreci başlar; I κ B kinaz (IKK) sonuçta tetiklenir ve I κ B'nin fosforilasyonuna yol açar, bu da I κ B'nin her yerde bulunmasına ve bozunmasına neden olur. I κ B bozulduktan sonra, kalan Nf-kb dimer, hedef genlerin bir DNA konsensüs dizisine bağlandığı çekirdeğe yer değiştirir (Albensi, 2019).

2.10.6. Apoptoz Sinyal Yolağı

Apoptoz insan ve diğer organizmaların büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan fizyolojik bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptoz, genomik dengesizliğe sahip hücrelerin ve ayrıca kanser öncesi hücrelerin büyümesini ve bölünmesini önleyebilir. Oksidatif stres ve büyük DNA hasarı gibi stres koşulları sırasında, özellikle proliferasyon oranı yüksek ve proapoptotik genlerin yüksek ekspresyonuna sahip hücreler için apoptoz oluşabilir. Apoptoz, Kaspazlar olarak bilinen bir grup enzimin aracılık ettiği karmaşık bir süreçtir. Kaspazlar apoptozun hem başlangıcında hem de ilerlemesinde rol oynarlar (Mortezaee vd. , 2019). Kaspazlar, programlanmış hücre ölümü ve iltihaplanmada anahtar roller oynayan, korunmuş bir sistein proteazları ailesidir. Çok hücreli organizmalarda Kaspazlar, makromoleküler sinyalleşme kompleksleri aracılığıyla aktive edilir. Kaspazların aktivasyonu, hücre ölümünün programlanmış olarak yürütülmesine neden olur ve bu ilgili Kaspazlar tarafından belirlenir (Kesavardhana, Malireddi & Kanneganti, 2020). Bugüne kadar, bu ailenin en az 14 üyesi memelilerde tanımlanmış olmasına rağmen, hepsi apoptoz sırasında işlev görmemektedir (Zhang, Wu, Lai, Yew & Aging, 2004). Kaspaz ailesinin üyeleri enflamatuar veya apoptotik olarak sınıflandırılır. Kaspazlar 1, 4, 5 ve 11, enflamatuar Kaspazlar olarak gruplandırılır ve N-terminal ucunda bir CARD alanını paylaşır. Apoptotik Kaspazlar ayrıca başlatıcı ve yürütme Kaspazlarında alt kategorilere ayrılabilir. Kaspaz 8, 9 ve 10, enflamatuar Kaspazlara benzerdir, ancak bunların işlevi, yürütücü Kaspaz 3, 6 ve 7'nin aktivasyonu yoluyla apoptozu başlatmaktır (Van Opdenbosch & Lamkanfi, 2019). Apoptotik hücre ölümü içsel ve dışsal olmak üzere iki moleküler sinyal yol tarafından indüklenir. İlk yol, Bcell lösemi/lenfoma-2 (Bcl-2) protein ailesi ve mitokondriyal sinyal üyeleri tarafından hücrenin içinden indüklenen intrinsik yoldur. İkinci yol, hücre yüzeyi ölüm reseptörleri (DR'ler) ve pro-apoptotik ligandların etkileşmesiyle hücre dışından indüklenen ekstrinsik yoldur. Hem içsel hem de dışsal yol, çok sayıda proteolitik olaya ve apoptotik hücre ölümüne aracılık eden enzimatik kaspaz kaskadını harekete geçirmektedir (Ashkenazi, 2008). İçsel yol, DNA hasarını, viral patojenlerin varlığını saptayan hücre içi sensörlerden veya diğer hücrelerden dışarıdan sağlanan hayatta kalma sinyallerinin olmamasına yanıt olarak başlar. Bunun tersine, apoptozun dışsal yolu, hücre dışından, çoğunlukla Doğal Katil (NK) lenfositler veya CD8-pozitif Sitotoksik T lenfositler tarafından gelen bir ölüm öncesi sinyal ile başlar (Yanumula & Cusick, 2020).

2.10.6.1 İçsel Yol

Apoptozun mitokondriyal yolu olarak da bilinen intrinsik yol, hücre içindeki birden fazla hedef üzerinde etkili olan çeşitli uyarınları içerir. Bu apoptoz formu, mitokondriden salınan faktörlere bağlıdır ve pozitif veya negatif bir yoldan başlatılır. Negatif sinyaller, hücrenin yakın çevresinde sitokinlerin, hormonların ve büyüme faktörlerinin yokluğundan kaynaklanır. Radyasyona, toksinlere, reaktif oksijen türlerine, virüslere ve çeşitli toksik ajanlara maruz kalma apoptozu başlatan pozitif faktörlerdir. Apoptoz, pozitif veya negatif uyarınlarla indüklendiğinde, mitokondriyal zarla değişiklikler tetiklenir (Ekert & Vaux, 2005). İnrinsik yolda, nörotrofin çekilmesi veya bir toksine maruz kalma gibi apoptotik bir uyarı, Bax gibi Bcl-2 protein ailesinin proapoptotik bir üyesinin dış mitokondriyal membranı geçirgen hale getirir (Franklin, 2011). Mitokondriyal transmembran potansiyelinin kaybı 2 grup pro-apoptotik proteinin membranlar arası boşluktan sitozole salınmasını aktive eder. İlk protein grubunu, Smac/Diablo, serin proteaz HtrA2/Omi ve Sitokrom c oluşturur. Bu grup Kaspaza bağımlı mitokondriyal yolu indükler. Sitokrom c'nin, Apaf-1 ile Prokaspas-9'u bağlayarak harekete geçirmesiyle apoptozom kompleksi oluşur. ProKaspaz-9'un aktivasyonu gerçekleşir. Hücre lm olacağı kesinleştikten sonra ortaya çıkan, apoptoz sırasında mitokondriden salınan AIF, endonükleaz G ve CAD ise ikinci protein grubu üyelerinin oluşturur. CAD daha sonra çekirdeğe taşınır, Kaspaz 3 aktivasyonundan sonra oligonükleozomal DNA fragmantasyonuna ve daha belirgin bir kromatin yoğunlaşmasına yol açar (şekil 2.14.) (Elmore, 2007).



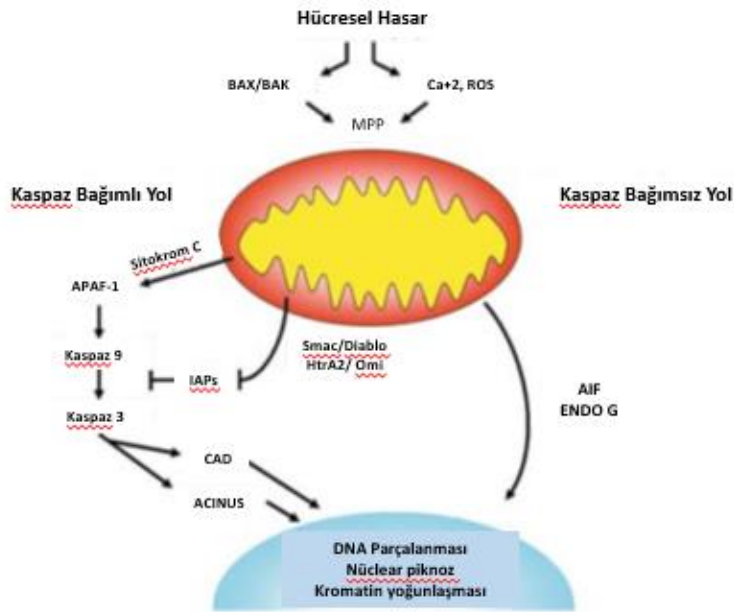
Şekil 2.14. Apoptozda ölüm reseptörü ve mitokondriyal yollar. Ölüm sinyallerinin hücreye bağlanması, ölüm alanları (DD) ve sonunda hücre ölümü teşvik eden Kaspaz 3 aracılığıyla bir fosforilasyon olayları dizisi başlatır. Kaspaz 8'in aktivasyonundan sonra, Bıd sinyali mitokondriye gönderir ve sitokrom c sitozole salınır. Pro-Kaspaz 9'a ek olarak Cyt c ve Apaf-1 apoptozomu oluşturur. Hücrenin intihar etmesi için Kaspaz 3'ün aktivasyonu gereklidir. Kaspaz 3 aktivasyonu, apoptoz proteini inhibitörleri tarafından engellenir. bcl-2 ailesi proteinleri Cyt c'nin mitokondrinin iç zar boşluğundan salınmasını kontrol eder (Sainz vd. , 2003).

2.10.6.2. Dışsal Yol

Apoptozun ölüm reseptörü (DR) yolu olarak da bilinen dışsal yol, hedef hücre membranındaki DR'ler ile bağlandığında başlar (D'Arcy, 2019). En iyi bilinen ölüm reseptörleri TNFR1 ve Fas (CD95) proteinleri ve sırasıyla ligandları Tnf ve Fas ligand (FasL)'lardır. Bu ölüm reseptörleri, TNF reseptörü ve Fas ile ilişkili ölüm alanları (TRADD ve FADD) gibi adaptör proteinleri ve Kaspaz 8 gibi sistein proteazları kapsayan bir hücre içi ölüm domainine sahiptir. Ölüm ligandı ve reseptörünün bağlanması, ligand-reseptör-adaptör protein kompleksi olarak bilinen, ölüm indükleyici sinyal kompleks (DISC) yapısını oluşturur. DISC yapısı inaktif kaspaz olan Pro-kaspaz 8'i aktive eder. Aktive olan Kaspaz 8, diğer kaspazları parçalayarak apoptozu başlatır (Wong & Research, 2011). Apoptoz kaspaza bağlı ve kaspazdan bağımsız olmak üzere 2 farklı yoldan gerçekleşebilir (Şekil 2.15.). Kaspaza bağlı yol, programlanmış klasik hücre ölüm yoludur. Tnf- α kaynaklı Kaspaz 8'e bağımlı yol, Kaspaz 8'i ölüm kompleksi aracılığıyla aktive eder ve ardından Bcl-2 proteini aktive edilir. Bcl-2 ailesi protein aktivasyonu

mitokondri membranını değiştirebilir ve salınan kaspaz kaskad reaksiyonunu harekete geçirebilen ve nihayetinde apoptozu indükleyebilen pro-apoptoz sinyal molekülü olan Sitokrom c'yi uyarır. Sitokrom c, Kaspaz 9 ile Kaspaz 3 aktivasyonunu tetikler. Sonunda, substratlar aktivasyon kaspazları tarafından bölünür ve hücreler apoptoza girer (Hongmei, 2012). AIF / Endo G yolu olarak bilinen kaspaz bağımsız apoptotik yol, mitokondriyal AIF salımını indükleyen BNIP-3 (bcl-2 / adenovirüs E1B 19-kDa etkileşimli protein 3) tarafından aktive edilir. Endonükleaz G (Endo G), bir modölatör görevi görür. Mitokondri, apoptotik hücre ölümünü düzenlemede merkezi bir rol oynar. Çok sayıda pro-apoptotik faktör ve hasar yolları, oksidatif stresi indüklemek için mitokondriye etki eder ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi doğrudan mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneğinin (MPTP) açılmasına neden olabilir, ardından prokaspazlar, Cyt c, AIF ve Endo G gibi apoptojenik sinyal moleküllerinin mitokondriyal salınımı gerçekleşir (Liu vd. , 2016). Memelilerde, dışsal ve içsel yollar, Kaspaz bağımlı apoptoza yol açan ana yollardır (Mazzoni & Falcone, 2008). Dışsal ve içsel apoptotik yollar, P53, Nf-kb, ubiquitin proteozom sistemi ve P13k yolu gibi proteinler tarafından düzenlenir. P13k, hücre hayatta kalması ve çoğalması için önemli sinyal yollarında merkezi rol oynayan bir kinazdır. P13k bir çok kanserde yukarı regüle edilir. Hücre yüzeyi reseptörleri, hücre yüzeyinden sitoplazmaya sinyaller ileten fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat 3 ve fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfat gibi ikinci habercilerin üretimini indükler. İkincil habercilerde Akt'yi aktive eder. Akt aktivasyonu, hücre hayatta kalmasına yol açan bazı proteinlerin fosforilasyonuna yol açar (Ghobrial, Witzig & Adjei, 2005). P53, kanserde en yaygın olarak silinen veya mutasyona uğramış tümör baskılayıcıdır. Genotoksik maruziyetlere yanıt olarak apoptoza neden olur. P53'ün proapoptotik etkisi genellikle, Puma, Noxa ve Bax'ın transkripsiyonunu aktive ettiği transaktive edici özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu proteinler daha sonra, mitokondriyi apoptotik hücre ölümüne yönlendirmek için diğer Bcl-2 ailesi üyeleriyle etkileşime girer. Anti-apoptotik proteinler, proapoptotik proteinleri ayırarak P53 aracılı hücre ölümünü bloke edebilir. Ayrıca sitoplazmik P53, yeni transkripsiyon olmasa bile apoptozu indükleyerek Bcl-2 ailesi ile doğrudan etkileşime girebilir. P53'ün tümör baskılayıcı işlevi genellikle apoptozu indükleme kabiliyetine dayanmaktadır (Letai, 2017). Nükleer faktör kappa B (Nf-kb), her hücrenin sitoplazmasında bulunan ve aktive edildiğinde çekirdeğe yer değiştiren bir transkripsiyon faktörüdür. Aktivasyonu, stres, sigara dumanı, virüsler,

bakteriler, enflamatuar uyarılar, sitokinler, serbest radikaller, kanserojenler, tümör destekleyicileri ve endotoksinler dahil olmak üzere çok çeşitli maddeler tarafından indüklenir. Nf-kb, AIDS, diyabet, alzheimer ve kanser gibi çok çeşitli insan hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir. Nf-kb, doğuştan gelen ve sonradan kazanılan immün cevapların ana düzenleyicileridir (Serasanambati & Chilakapati, 2016). Transkripsiyon faktörü Nf-kb, anti-apoptotik aktivitelere sahiptir. Anti-apoptotik Bcl-2 aile üyelerinin, Bcl-2, Bcl-xl ve Bfl-1/A1'in ekspresyonunu yukarı yönde düzenler. Bunun yanı sıra bazı apoptotik uyarılarla bağlantılıdır. Nf-kb 'nin antikanser ilaçlarına yanıt olarak Nf-kb gen ürünü hücre ölümüne katkıda bulunan FasL'yi doğrudan transaktive ederek apoptozu teşvik edebilir (Vermeulen vd. , 2003). Hem içsel hem de dışsal yollar, hızlı apoptotik hücre temizliği için hücre ölümü gerçekleştiren ve proinflamatuar sinyal yollarının aktivasyonunu baskılayan Kaspaz 3 ve Kaspaz 7'nin aktivasyonu üzerine birleşir (Chen vd. , 2019).



Şekil 2.15. Kaspaz bağımlı ve Kaspaz bağımsız proapoptik faktörlerin çeşitli sinyallere yanıt olarak mitokondrilerden salınması (Cregan, Dawson & Slack, 2004).

BÖLÜM 3

MATERYAL-METOD

3.1. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.1. Gereçler

3.1.1.1. Kullanılan Cihazlar

- Biyo-güvenlik Kabini (Heraeus, Almanya)
- %5 Karbondioksitli inkübatör (Heraeus, Almanya)
- 4°C Buzdolabı (Vestel, Türkiye)
- -20 °C Buzdolabı (Vestel, Türkiye)
- İnverted mikroskop (Nikon eclipse TS100, Japonya)
- Santrifüj (Centurion Scientific, Türkiye)
- Vorteks karıştırıcı (Isolab, Almanya)
- Vorteks karıştırıcı (Wisemix, Çin)
- Tartı (UniBloc-AND, A8D)
- Tali Image Based Cytometer (İnvitrogen, USA)
- Mikroplate okuyucu (Thermo Fisher Scientific-Multiskan™ GO, USA)
- Isıtıcı ve soğutucu karıştırıcı blok (BİOER, Çin)
- Homojenizatör , Tissue lyser (Qiagen, Almanya)
- Nanodrop (OPTİZEN-NanoQ, Kore)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Micro 200R, Almanya)
- PCR Cihazı (Thermo Fisher Scientific-Applied Biosystems-ProFlex, USA)

- Real Time PCR Cihazı (Thermo Fisher Scientific Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 Flex Real-Time PCR System, USA)
- Otomatik Pipet Seti (Mettler Toledo Rainin, ABD-İsviçre),(Eppendorf, Almanya),(Axypet, sviçre)
- Dijital Çok kanallı Pipet (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Blotlama cihazı (Thermo Fisher Scientific-Invitrogen, USA)
- Mini jel Tank (Thermo Fisher Scientific-Life Technologies, USA)
- Görüntüleme sistemi (DNR Bio-İmaging System, Microchemi, İsrail)
- Dijital Çok Kanallı Pipet (Thermo Fisher Scientific-Life Technologies, USA)

3.1.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- DMEM (Multicell (319-020-CL),Almanya)
- HAM'S F-12 (Multicell (318-010-CL),Almanya)
- Fetal Bovine Serum (Capricorn Scientific, Almanya)
- Penicillin Streptomycin (Wisent Bioproducts, Kanada-USA)
- %0,05 Tripsin EDTA (Multicell (352-542-EL),Almanya)
- Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline 10X (DPBS) (ThermoFisher-Gibco-by life Technologies, USA)
- Etanol (MERCK (603-002-00-15), Almanya)
- DMSO (MERCK (67-68-15), Almanya)
- Steril kültür kapları, 25 cm², 75 cm² (NEST, ABD)
- 96 kuyucuklu hücre kültür kabı (NEST, ABD)
- 5 ml, 10 ml serolojik pipet (NEST, ABD)
- Hücre Proliferasyon Ölçüm Kiti (MTT) (BIOMATİK (A-3338-56), USA)
- Temodal/250 mg kapsül (MSD, ABD)
- Paklitaksel, (Roche 300 mg/50 ml, İsviçre)
- Melatonin (Enzo, ABD)
- Ergosterol (ChemCruz, Almanya)
- Rna İzolasyon Kiti (ThermoFisher/PureLink RNA Mini Kit, ABD)
- DNAase/RNAase içermeyen su (Invitrogen, ABD)
- cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems By Life Technologies, ABD)

- Cyber Green Master mix (Applied Biosystems By Life Technologies, ABD)
- 384 kuyucuklu PCR array plate, Applied Biosystems By Life Technologies (ABD)
- Tali® Apoptosis Kit–Annexin V Alexa Fluor® 488 and Propidium Iodide (Applied Biosystems By Life Technologies, ABD)
- Western Blot Kiti (ThermoFisher, Novex-By Life Technologies, USA)

3.1.2. Yöntemler

3.1.2.1. Hücre Kültürü

3.1.2.1.1. Hücre Hatlarının Temini

Çalışmada glioma (C6; (ATCC® CCL-107™), Nöroblastoma (N1E-115; (ATCC® CRL-2263™) ve sağlıklı beyin hücre hattı (C8-D1A; (ATCC® CRL-2541™), kullanılmış olup, Kanser hücre hatları Trakya Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Laboratuvarından temin edilmiş ve kültüre alınmıştır. C6 glioma hücreleri, N-nitrosometilüre kullanılarak sıçan beyinlerinde indüklenen gliyal tümörlerden elde edilmiştir. Sonrasında *Rattus norvegicus* türünün beyin dokusunda klonlanmış ve güçlü adherant yapıda ve fibroblast karakterde tek hücre kültürü oluşturulmuştur (Benda, Lightbody, Sato, Levine & Sweet, 1968; Chen, Maguire & Marks, 1996; JJ, Benda & H, 1968).

N1E-115 hücre hattı, 1971 yılında T. Amano, E. Richelson ve M. Nirenberg tarafından, *Mus musculus* türünün beyin dokusunda nöroblastom tümörü C-1300 hücrelerinin klonlanması ile nöroblast morfolojide ve hücre flaskına gevşek yapışık büyüme özelliğine sahip hücre kültürü oluşturulmuştur (Amano, Richelson & Nirenberg, 1972; Richelson, 1973; Richelson, 1990; Yamamura & Enna, 1990).

Astrositik veya mikrogial özelliklere sahip hücre kültürü, doğumdan 8 gün sonra alınan *Mus musculus* türünün serebellum (beyincik)'undan klonlanmıştır. Nöronal morfolojide, hücre flaskına yapışık büyüme özelliğine sahip ve oldukça yavaş çoğalan

sağlıklı beyin hücreleridir (Alliot, Marty, Cambier & Pessac, 1996; Alliot & Pessac, 1984).

3.1.2.1.2. Hücrelerin Üretilmesi

-80 °C’de saklanan hücreler, 37 °C inkübatörde çözöldükten sonra 25 cm²’lik filtreli hücre költür flasklarına aktarıldı. 1:1 oranında Dulbecco’s Modification of Eagle’s Medium (DMEM) ve Nutrient Mixture F-12 (HAM’s F-12) içeren besi ortamı içerisinde, son konsantrasyon % 6 olacak şekilde 60000 unite/ml Fetal Bovin Serum (FBS) ve son konsantrasyon % 1.2 olacak şekilde 12 mg/ml Penisilin/Streptomisin eklenerek hazırlanmış besiyerinde költüre edildi. Uygun besiyerine alınan tüm hücreler 37 °C sıcaklıkta, % 5 CO₂ ve nem içeren inkübatörde üretildi.

3.1.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

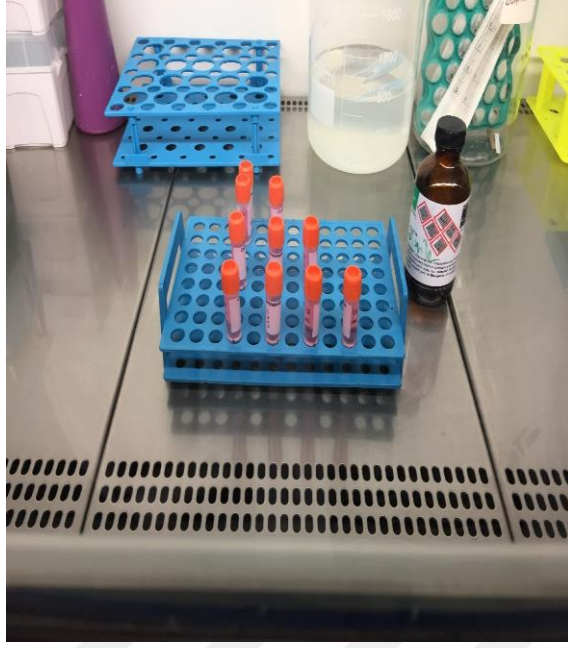
Hücreler, içerisinde bulunduğu flaskın %80-90 oranında yüzey alanının tamamını ya da tamamına yakınına kaplayacak duruma geldiğinde flaskdaki besiyeri serolojik bir pipet yardımıyla çekilerek uzaklaştırıldı. Ardından flask tabanında kalan artık maddelerden hücreyi temizlemek ve hücre pH’ını sabit tutarak izotonik bir ortam yaratmak üzere 5-10 ml steril Fosfat Tamponlu Tuz çözeltisi, 10X, pH 7.4 (PBS) eklendi. 1-2 dk bekleme süresi sonunda yıkama yapılarak PBS dököldü. Hücrelerin tabandan kaldırılması için her bir flaskın boyutuna uygun olarak 1X Tripsin/EDTA (%0.25 tripsin/1mM EDTA) solüsyonu ilave edildi. Tripsin ile muamele edilmiş flasklar 3-5 dk inkübatörde bekletilmeye alındı. Bu süreyi tamamlamış hücrelerin tabandan kalkma seviyelerini kontrol etmek için invert mikroskopta 10x’lik büyütmede kontrolü sağlandı. Tabandan ayrılan ve tripsin içerisinde serbest hale geçen hücreler 15 ml hacimde viallere alındı ve 1250 rpm 1.30 dk metotta santrifüj edilerek tripsinden arındırıldı. Üstte kalan süpernatant dikkatli bir şekilde hücreyi kaybetmeden uzaklaştırıldı. Dipte vialde yapışık halde bulunan hücreler üzerine DMEM-F12 besiyeri ilavesi yapıldı ve hücrelerin yapıştıkları yerden ayrılması sağlandı. Hücre içeren besiyeri yeni steril flasklara ekildi. İnvirt mikroskopta hücre yoğunluklarının kontrolü sağlandı. Ve son olarak yeni ekilen hücreler 37°C sıcaklıkta ve % 5 CO₂ ve nem içeren inkübatörde költüre alındı (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. 37°C sıcaklıkta % 5 CO₂ içeren inkübatör

3.1.2.1.4. Hücrelerin Dondurulması

Tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırılan hücreler bir önceki bölümde anlatıldığı şekilde santrifüj edildikten sonra üstte kalan süpernatant dikkatli bir şekilde hücreyi kaybetmeden uzaklaştırıldı. Dipte vialde yapışık halde bulunan hücreler üzerine taze besiyeri ilavesi yapıldı ve hücrelerin yapıştıkları yerden ayrılması sağlandı. Ardından her bir kriyo tüp için 930 µL hücre içeren besiyeri konulup, sonrasında %5 oranda olacak şekilde her bir kriyo tüpe 70 µL DMSO ilavesi yapıldı. Hücreler serolojik pipet yardımı ile kriotüplere porsiyonlandı (Şekil 3.2.) ve ardından ileri kullanımları için -80 °C dolaba depolandı



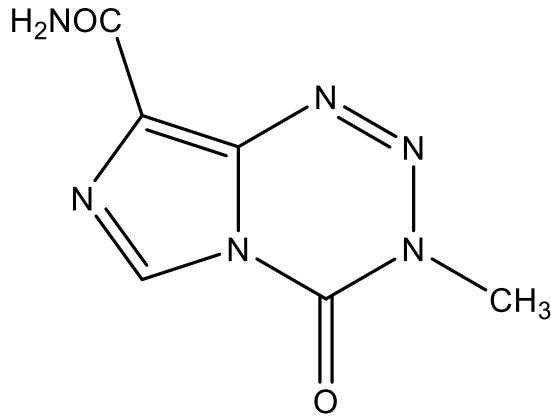
Şekil 3.2. Kryotip viallerde hücre dondurma işlemi

3.2. Moleküllerin Uygulanması Ve Doz Tespiti (Mtt Testi)

3.3. Stok ve Uygulama Solüsyonlarının Hazırlanması

3.3.1. Temozolomid Stok ve Uygulama Solüsyonunun Hazırlanması

TMZ (Temodal, MSD) (Şekil 3.3.) kemoterapötik ilacı için Temodal kapsül formu kullanıldı. İlaç etken madde içeriğine dikkat edilerek, 20 mM stok solüsyon hazırlamak için, Molekül ağırlığı 194,151 gram/mol olan TMZ'den 15,532 mg tartıldı ve hücre hattında son DMSO miktarı %2 oranında olacak şekilde, 2ml %20 DMSO (MERCK (67-68-15)' da vorteksleyerek çözüldü. Uygulandığında 2000 μ M ve son konsantrasyonu %2 DMSO olacak en yüksek doz hazırlanmış oldu. Seri sulandırım ile 2000 μ M, 1000 μ M, 500 μ M, 250 μ M, 215 μ M, 62,5 μ M, 31,25 μ M, 15,62 μ M olacak şekilde 8 doz hazırlandı. Kontrol grubu için ise, tüm ilaç dozları hazırlanırken çözücü olarak kullanılan %20'lik DMSO kullanıldı. Kontrol ve 8 adet yarı yarıya azalan doz, 6 tekrarlı olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekildi. Deney 2 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Plate, 37°C sıcaklık ve % 5 CO₂ ve nem içeren inkübatörde, 72 saat süre boyunca inkübasyona bırakıldı.

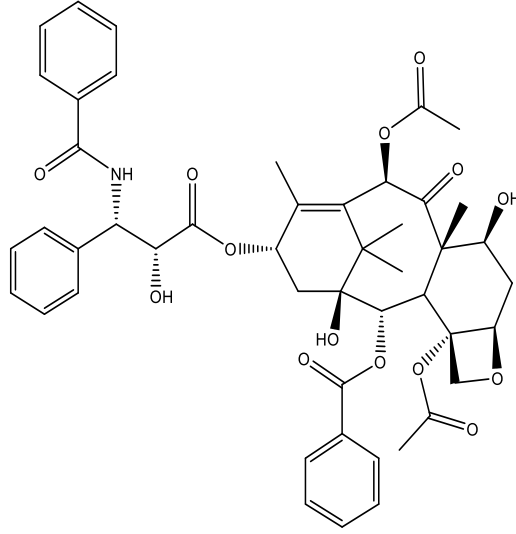


Temozolomide $C_6H_6N_6O_2$

Şekil 3.3. Temozolomid'in Kimyasal Yapısı (Jihong Zhang vd. , 2012).

3.3.2. Paklitaksel Stok ve Uygulama Solüsyonlarının Hazırlanması

Çalışma kapsamında paklitakselin (Roche 300 mg/50 ml, Swiss) (Şekil 3.4.) sıvı formu kullanıldı. Şişe stok solüsyonu 7,04 mM olan paklitakselden ilk uygulama dozu olan 250 nM hazırlamak üzere 3 ara stok hazırlandı. İlk ara stok 700 μ M hazırlamak için 7,04 mM'lik stok solüsyondan 100 μ l alındı ve %20 DMSO ile 1 ml'ye tamamlandı. İkinci ara stok olan 70 μ M için ise, 700 μ M'lık ilk ara stokdan 100 μ l alındı ve 1 ml'ye tamamlandı. Üçüncü ve son ara stok ise 7 μ M olarak hazırlandı. Bunun için, ikinci ara stokdan 100 μ l alınarak 1 ml ye tamamlandı ve her bir ara stok 10'ar kat seyreltilmiş oldu. 7 μ M son stokdan 35,7 μ l alındı ve 1ml tamamlandı. Böylece 250 nM konsantrasyonunda %20 DMSO da çözülmüş paklitaksel ilk uygulama dozu elde edilmiş oldu ve %50 seri sulandırım ile toplamda 8 doz hazırlandı, 6 tekrarlı olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekilen hücrelere uygulama yapıldığında son konsantrasyonları 25nM, 12,5nM, 6,25nM, 3,125nM, 1,56nM, 0,78nM, 0,39nM, 0,19 nM olacak şekilde kuyucuklara ekildi. Deney 2 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Plate, 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren inkübatörde, 72 saat süre boyunca inkübasyona bırakıldı.

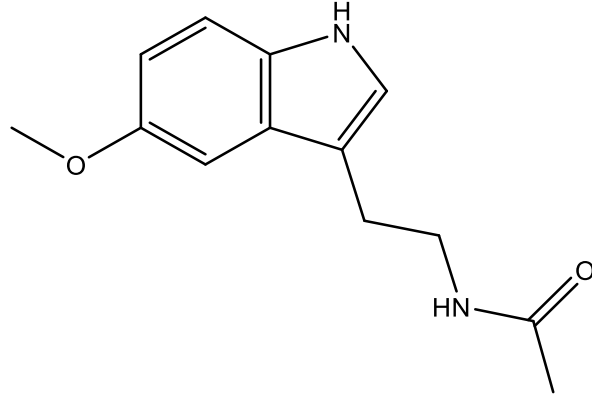


Paclitaxel C₄₇H₅₁NO₁₄

Şekil 3.4. Paklitaksel'in kimyasal yapısı (Paál, Müller & Hegedüs, 2001).

3.3.3. Melatonin Stok ve Uygulama Solüsyonlarının Hazırlanması

232,28 gram/mol molekül ağırlığına sahip melatoninin (Enzo Biochem, ABD) (Şekil 3.5.) 40 mM'lık en yüksek ilk uygulama dozunu hazırlamak üzere, 9.29 mg tartıldı ve 1ml %20 DMSO da çözüldü. 96 kuyulu plakalara ekilen hücelere uygulama yapıldığında son konsantrasyonları 4000 µM, 2000 µM, 1000 µM, 500 µM, 250 µM, 125 µM, 62,5 µM, 31,25 µM olacak şekilde %50 seri sulandırım ile toplamda 8 doz hazırlandı. Taşıt kontrol ve seri sulandırım ile hazırlanan 8 farklı doz konsantrasyonu, 6 tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara ekildi. Deney 2 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Plate, 37°C sıcaklık ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde, 72 saat süre boyunca inkübasyona bırakıldı.

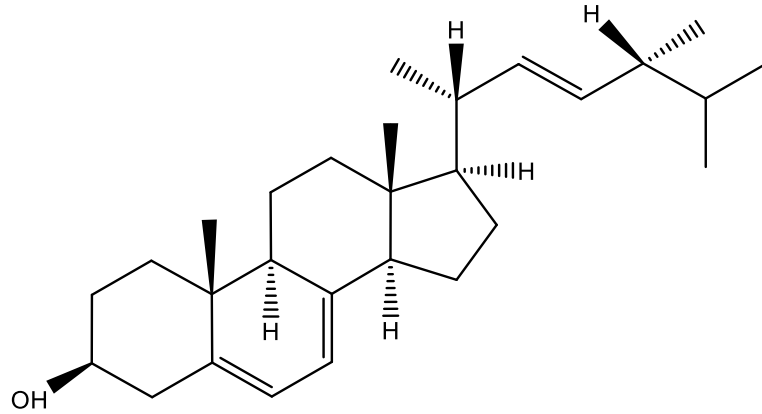


Melatonin $C_{13}H_{16}N_2O_2$

Şekil 3.5. Melatonin'in Kimyasal Yapısı (Di Bella, Mascia, Gualano & Di Bella, 2013)

3.3.4. Ergosterol Stok ve Uygulama Solüsyonlarının Hazırlanması

396.65 gram/mol molekül ağırlığına sahip Ergosterol (ChemCruz, Germany)'den (Şekil 3.6.). 20 mM'lık en yüksek ilk uygulama dozunu hazırlamak üzere 7.933 mg tartıldı ve 1ml %20 DMSO da çözüldü. 96 kuyulu plakalara ekilen hücrelere uygulama yapıldığında son konsantrasyonları 2000 μ M, 1000 μ M, 500 μ M, 250 μ M, 125 μ M, 62,5 μ M, 31,25 μ M, 15,62 μ M olacak şekilde %50 seri sulandırım ile toplamda 8 farklı doz konsantrasyonu hazırlandı ve 6 tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara ekildi. Deney 2 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Plate, 37°C sıcaklık ve % 5 CO_2 içeren inkübatörde, 72 saat süre boyunca inkübasyona bırakıldı.



Ergosterol C₂₈H₄₄O

Şekil 3.6. Ergosterol'ün Kimyasal Yapısı (Kadalkal &Artık, 2004).

3.4. IC₅₀ Dozlarının Belirlenmesi (MTT testi)

Uygulama yapılan pleytler, 72 saat inkübasyon süresinden sonra, metabolik aktivite ölçümüne dayalı MTT proliferasyon testine tabi tutuldu. Hücre proliferasyonu için 75 cm²'lik flasklarda yetiştirilen hücreler, pasajlama kısmında anlatıldığı gibi tripsinize edildi ve 1 adet 96'lık plate için gerekli olan 20 ml besiyeri eklenerek nazıkçe karıştırıldı ve steril hücre ekimi rezervuarına alındı. Çok kanallı dijital pipet yardımıyla her bir kuyucuğa 190 µl ekildi. Her bir hücre hattına özgü, kendini 2 katına çıkarma (dabbling süresi) süreleri göz önünde bulunarak inkübasyona alındı. Yaklaşık 12-14 saatlik inkübasyondan sonra, her bir kuyucuk tabanının homojen bir şekilde tek katmanlı olarak C6 ve N1E-115 hücreleriyle kaplanmış olup olmadığı kontrol edildi. Homojen dağılım gösteren hücreler üzerine, uygulama solüsyonlarının hazırlanışı kısmında anlatıldığı gibi hazırlanan 8 farklı konsantrasyonda doz ve kontrol grubu 6 tekrerr olacak şekilde, 10 µl hacminde uygulandı. 37°C sıcaklıkta ve % 5 CO₂ ve nem içeren inkübatörde 72 saat inkübasyona bırakıldı. 72 saat inkübasyondan sonra, ilaç uygulaması yapılmış pleytin her bir kuyucuğuna 20 µl MTT (5mg/lt) çözeltisi olacak şekilde uygulandı. 2-4 saatlik inkübasyondan sonra, mtt çözeltisi eklenmiş besiyeri pipet yardımıyla çekilerek uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 200 µl %100 konsantrasyonda ultra saf DMSO ilave edildi. Meydana gelen enzimatik boyanın homojen olarak çözünmesi beklendi. (30dk-1 saat) İnkübasyondan sonra, plate'lerin absorbans değerleri, Multiskan GO spektrofotometresi yardımıyla 492 nm'lik bir dalga boyunda okundu. Elde edilen absorbans değerleri yüzde canlılık değerlerine çevrildi. Kontrol grubundan elde edilen

değer %100 canlılık olarak alındı ve diğer dozlar kontrol grubu ile karşılaştırılarak her bir doz için hücre sağ kalım-ölüm oranı tespit edildi ve IC₅₀ değerleri probit analizi ile belirlendi.

3.5. IC₅₀ Değerleri Belirlenen Kombine İlaç gruplarının Uygulanması

TMZ IC₅₀-Paklitaksel IC₅₀, TMZ IC₅₀-Melatonin IC₅₀, TMZ IC₅₀-Ergosterol IC₅₀, TMZ ½ IC₅₀-Paklitaksel IC₅₀, TMZ ½ IC₅₀-Melatonin IC₅₀, TMZ ½ IC₅₀-Ergosterol IC₅₀, kombine gruplarının hücrede yarattığı sitotoksik etki, apoptoz, canlı hücre yüzdesi ve sinyal yollarına etkisini belirlemek amacıyla tez kapsamında çalışılan uygulama grupları aşağıdaki gibidir:

- 1.Grup: Temozolomid IC₅₀ (C6 ve N1E-115)
- 2.Grup: Paklitaksel IC₅₀ (C6 ve N1E-115)
- 3.Grup: Melatonin IC₅₀ (C6 ve N1E-115)
- 4.Grup: Ergosterol IC₅₀ (C6 ve N1E-115)
- 5.Grup: Temozolomid IC₅₀ ve Paklitaksel IC₅₀ (C6 ve N1E-115)
- 6.Grup: Temozolomid IC₅₀ ve Melatonin IC₅₀ (C6 ve N1E-115)
- 7.Grup: Temozolomid IC₅₀ ve Ergosterol IC₅₀ (C6 ve N1E-115)
- 8.Grup: Temozolomid ½ IC₅₀ ve Paklitaksel IC₅₀ (C6 ve N1E-115)
- 9.Grup: Temozolomid ½ IC₅₀ ve Melatonin IC₅₀ (C6 ve N1E-115)
- 10.Grup: Temozolomid ½ IC₅₀ ve Ergosterol IC₅₀ (C6 ve N1E-115)
- 11.Grup: Temozolomid IC₅₀ ve Paklitaksel IC₅₀ (C8 Sağlıklı Hücre Hattı)
- 12.Grup: Temozolomid IC₅₀ ve Melatonin IC₅₀ (C8 Sağlıklı Hücre Hattı)
- 13.Grup: Temozolomid IC₅₀ ve Ergosterol IC₅₀ (C8 Sağlıklı Hücre Hattı)
- 14.Grup: Temozolomid ½ IC₅₀ ve Paklitaksel IC₅₀ (C8 Sağlıklı Hücre Hattı)
- 15.Grup: Temozolomid ½ IC₅₀ ve Melatonin IC₅₀ (C8 Sağlıklı Hücre Hattı)
- 16.Grup: Temozolomid ½ IC₅₀ ve Ergosterol IC₅₀ (C8 Sağlıklı Hücre Hattı)

96 kuyucuklu pleytlere, her bir kuyucuk için 190 µl ekim yapılmış ve ilaç uygulanabilir yoğunluğa gelmiş hücre plakalarına uygulaması yapılacak tüm ilaç kombinasyonları için ayrı ayrı MTT proliferasyon testi ile belirlenen dozlar uygulandı. Uygulama yapılırken

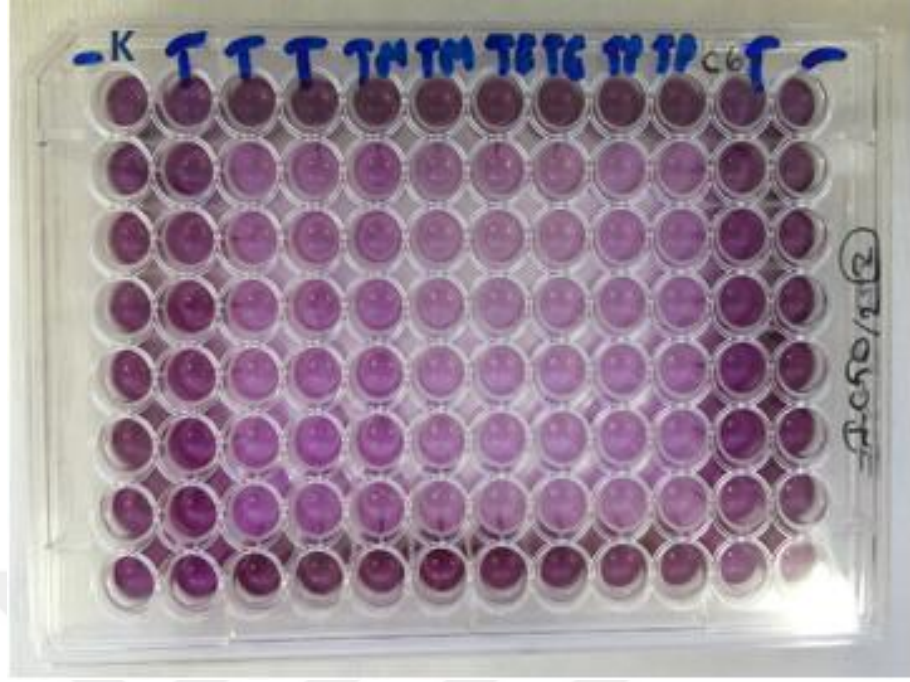
yukarıda ikili kombinasyonları verilen ilaçlardan 1:1 oranında alınarak 10 µl hacimde uygulama yapıldı.

Elde edilen IC₅₀ değerleri Çizelge 3.1.'de sunuldu.

Çizelge 3.1. MTT Testi ile belirlenen IC₅₀ doz çizelgesi

İlaç adı	C6 Glioma		N1E-115 Nöroblastoma	
	IC ₅₀	½ IC ₅₀	IC ₅₀	½ IC ₅₀
Temozolomid	1732,101 µM	866,050 µM	1738,404 µM	869,202 µM
Paklitaksel	6,305 nM	3,152 nM	8,674 nM	4,337 nM
Melatonin	3691,235 µM	1845,617 µM	2571,413 µM	1285,706 µM
Ergosterol	52,731 µM	26,365 µM	31,208 µM	15,604 µM

İlaçların son konsantrasyonları, her bir ilacın bulunan TMZ IC₅₀-PTX IC₅₀, TMZ IC₅₀-MLT IC₅₀, TMZ IC₅₀-ERG IC₅₀, TMZ ½ IC₅₀-PTX IC₅₀, TMZ ½ IC₅₀-MLT IC₅₀, TMZ ½ IC₅₀-ERG IC₅₀, değeri ve Kontrol grubu %2 DMSO içerecek şekilde hesaplandı. IC₅₀ ve ½ IC₅₀ doz pleytleri 2 tekrarlı olarak çalışıldı. Uygulama her bir kombinasyondan 24 kuyucuk tekerrürü olacak şekilde yapıldı (Şekil 3.7.). Uygulama yapılan plakalar 72 saat inkübatörde bekletildi. Daha sonra MTT testi yapıldı. Kontrol grubundan elde edilen değer %100 canlılık olarak alındı ve diğer dozlar kontrol grubu ile karşılaştırılarak her bir doz için hücre sağ kalım-ölüm oranı belirlendi. Elde edilen sonuçlar %100 toplam değer üzerinden hesaplandı, konsantrasyon ve ölüm oranları kullanılarak SPSS istatistik ve analiz programı ile analiz edilerek grafikleri çizildi.



Şekil 3.7. Kombinasyon ilaç uygulama plaka dizaynı TK:Taşıt Kontrol, T:Temozolomid (TMZ), TM:TMZ-Melatonin, TE:TMZ-Ergosterol, TP:TMZ-Paklitaksel

3.6 TALİ Görüntü Tabanlı Sitometre Analizi

C6, N1E-115 Hücre hatlarında kontrol ve deney gruplarında kullanılan TMZ, TMZ-PTX, TMZ-MLT ve TMZ-ERG teropötik maddelerinin apoptotik ve hücre siklus etkileri Tali® Image Cytometer (Life Technologies, USA) ile belirlenmiştir. TALİ sitometri ile apoptoz etkisini belirleme çalışması için, hücreler 25 cm² flasklara 3 tekerrürlü olarak ekildi. MTT testi sonucu belirlenen TMZ ½ IC₅₀'nin uygulanacak diğer maddeler olan paklitaksel IC₅₀, melatonin IC₅₀, ve ergostero IC₅₀ ile 1:1 oranında kombinasyonları her bir hücre hattına uygulandı. 72 saat inkübasyon süresi sonunda bu flasklardaki besiyeri uzaklaştırıldı, 3 ml tripsin EDTA ilave edildi ve 5 dakika boyunca inkübatörde bekletildi ve hücreler tek kullanımlık steril serolojik pipet yardımıyla toplanarak ependorf tüplere alındı. Tali sitometre ile apoptoz tayin çalışmaları Tali® Apoptosis Kit–Annexin V Alexa Fluor® 488 and Propidium Iodide (Life technologies) kullanılarak kit prosedürüne göre yapıldı.

3.6.1. TALİ Sitometri Deney Protokolü

1. 5X Anneksin bağlama tamponu (ABB, Component C) distile su ile seyreltilerek 1X Annexin bağlama tamponu hazırlandı.
2. İnkübasyon süresinden sonra hücreler 1000 rpm devirde 2.5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonunda üstteki tripsin ve süpernatant tamamen çekilerek uzaklaştırıldı ve tüpün dibine çöken hücreler analiz için kullanıldı.
3. Her bir örnek için, 100 µL 1X Annexin bağlama tamponu eklenerek hücreler tekrar süspansiyon haline getirildi.
4. Her 100 µL örneğe 5 µL Annexin V Alexa Fluor® 488 (Bileşen A) eklendi. İyice karıştırıldı.
5. Hücre-Annexin V Alexa Fluor® 488 karışımı oda sıcaklığında karanlıkta 20 dakika inkübe edildi.
7. Hücreler santrifüjlendi ve 100 µL ABB içinde tekrar süspansiyon haline getirildi.
8. Her 100 µL örneğe 1 µL Tali® Propidium İyodür (PI, bileşen B) eklendi. İyice karıştırıldı.
9. Örnekler karanlıkta oda sıcaklığında 1-5 dakika inkübe edildi.
10. Örnek yarım ay şeklindeki örnek yükleme slaytına yaklaşık 80 ° 'lik bir açıyla pipetlenerek Tali® Hücresel Analiz Slaytına 25 µL boyalı hücreler yüklendi. Numunede kabarcıklar oluşmamasına veya geri sıçramamasına dikkat edilerek, örnek kılcal etki yoluyla hazneye yüklendi.
11. Slayt, zorlamadan, durana kadar Tali® Görüntü Tabanlı Sitometrenin slayt bağlantı noktasına yerleştirildi.
12. Tali® Görüntü Tabanlı Sitometrenin Ana ekranında “Cell Health” ve ardından Tali® Apoptoz Testi için “Apoptosis” seçildi.
- 13.” Press to insert new sample” dokunuldu; slayt otomatik olarak cihaza çekildi.
14. Gerektiğinde, cihazın sağ tarafındaki görüntü ayarlama (odaklama) düğmesini kullanarak hücrelere odaklanıldı.
15. Yakalanacak görüntü sayısı menüsünü kullanarak, yakalanacak görüş alanı sayısı her bir hücre hattı her slaytta 9 farklı alan olarak belirlendi ve ardından “Press to run sample” seçildi.

16. Tali® Görüntü Tabanlı Sitometre, numunelerin görüntülerini otomatik olarak yakalayıp analiz etti ve analiz sonuçlarını analiz penceresinde sundu.

3.7. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

TMZ, TMZ-MLT, TMZ-ERG ve TMZ-PTX ilaç uygulamalarının hücredeki önemli moleküler sinyal yollarına etkisini belirlemek için, hücrelerin gen ifade seviyelerini değerlendirmek üzere, C6, N1E-115 ve C8 hücre hatları için, TMZ IC₅₀:PTX IC₅₀, TMZ IC₅₀:MLT IC₅₀ TMZ IC₅₀:ERG IC₅₀, TMZ ½ IC₅₀:PTX IC₅₀, TMZ ½ C₅₀:MLT IC₅₀, TMZ ½ IC₅₀:ERG IC₅₀ oranında uygulandı. Kontrol ve kombinasyon uygulamaları yapılan hücrelerin total RNA izolasyonu için, RNA PureLink® RNA Mini Kit (Life Sciences, USA) kullanıldı ve kit protokolü temel alınarak RNA'lar izolasyon yapıldı. Rna izolasyonu yapmak üzere her bir kombinasyon ilaç uygulaması için C6, N1E-115 ve C8 hücre hattına TMZ IC₅₀-PTX IC₅₀, TMZ IC₅₀-MLT IC₅₀, TMZ IC₅₀-ERG IC₅₀ ve TMZ ½ IC₅₀-PTX IC₅₀ TMZ ½ IC₅₀-MLT IC₅₀ TMZ ½ IC₅₀-ERG IC₅₀ dozları 1:1 oranında, Kontrol grubu, yalnız TMZ uygulaması ayrıca TMZ-MLT, TMZ-ERG ve TMZ-PTX kombinasyonları için 3 tekerrürlü, toplamda 15 adet 75 cm² lik flask ekimi yapıldı. Her bir flaskdaki besiyeri flasktan serolojik pipet yardımı ile çekilerek uzaklaştırıldı. Flask tabanı PBS ile yıkandı. Ardından hücrelerin tabandan ayrılması için 5ml tripsin ilave edildi ve 3-5 dk inkübatörde bekletildi. Süre sonunda tripsin sıvısına geçen her bir 75 cm²'lik flaskdaki hücreler 1.5 ml halinde 2ml lik deney tüplerine alındı. Tripsini hücrelerden uzaklaştırmak için 1250 devir/dk da 1:30 dk santrifüj edildi.

3.7.1. RNA İzolasyon Deney Protokolü

1-2ml lik deney tüplerinde bulunan hücreler üzerine 350 µl Liziz solüsyonu eklenerek, deney tüpleri karıştırıcı blokda, oda sıcaklığında 300 rpm de 10 dk çalkalandı.

2-Deney tüpleri karıştırıcı blok üzerindeyken üzerlerine 350 µl %70 konsantrasyonda Etilalkol (Merck) eklendi.

3- Etanol ekledikten sonra oluşabilecek herhangi bir görünür çökeltiyi dağıtmak için vortekslenerek iyice karıştırıldı.

4- 700 µL'ye kadar numune (kalan çökelti dahil) Spin kolona aktarıldı.

5- Oda sıcaklığında 15 saniye boyunca 12.000 × g'de santrifüjlendi. Süpernatant atıldı ve Döndürme kolonu aynı toplama tüpüne tekrar yerleştirildi.

6-Koleksiyon tüpte biriken sıvı atıldı.

7- Spin Kolona 700 µL yıkama tamponu I eklendi. Oda sıcaklığında 15 saniye $12.000 \times g$ 'de santrifüjlendi. Tüpte biriken sıvı ve toplama tüpünü atıldı. Spin kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.

8- Spin Kolona 500 µL yıkama tamponu II'yi eklendi. Oda sıcaklığında 15 saniye boyunca $12.000 \times g$ 'de santrifüjlendi. Biriken sıvıyı atın ve spin kolonu aynı toplama tüpüne tekrar yerleştirildi.

9- 8. basamak tekrar edildi.

12- RNA bağlı bulunan membranı kurutmak için Spin Kolon $12.000 \times g$ 'de 1-2 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpü atıldı ve Spin kolon bir geri kazanım tüpüne yerleştirildi.

13- Spin Kolonun ortasına 50 µL RNaz içermeyen su eklendi.

14- Oda sıcaklığında 1 dk inkübasyona bırakıldı.

15- RNA'yı membrandan Geri kazanım tüpüne aktarmak için için Spin kolon oda sıcaklığında $\geq 12.000 \times g$ 'de 2 dakika santrifüjlendi.

16- Saflaştırılmış RNA -80°C dolapa depolandı.

RNA izolasyonu sonucunda elde edilen toplam RNA numuneleri, 260-280 nm'de Nanodrop (NaNoQ OPTIZEN, Kore) cihazına 2 µl yüklenerek okundu. İzolasyonu yapılan hücrelerden elde edilen RNA miktarlarının eşitlemesi RNA içermeyen ultra saf su (Sigma, USA) ile yapıldı.

RNA izolasyonu yapılan kontrol, TMZ ve TMZ ile birlikte uygulanan kombinasyon gruplarının RNA miktarları ve RNA saflıkları Çizelge 3.2.'de sunuldu.

Çizelge 3.2. RNA miktarları ve RNA saflıkları

	Astrosit		C6		N1E-115	
Grup	RNA miktarı $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	RNA saflığı	RNA miktarı $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	RNA saflığı	RNA miktarı $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	RNA saflığı
Kontrol ₁	53,4	1,88	178,4	2,04	97	1,88
Kontrol ₂	44,6	2,02	206,1	2,08	41,7	2,03
Kontrol ₃	36,7	2,00	121,7	2,08	77,4	2,07
TMZ ₁	67,5	2,02	190,1	2,12	106,9	2,06
TMZ ₂	53,4	2,02	166,8	2,09	134,2	2,01
TMZ ₃	71	1,85	177,6	2,09	70,9	2,28
TMZ-PTX ₁	68,1	2,05	159,9	2,12	107,5	2,00
TMZ-PTX ₂	66,4	2,08	311,9	2,25	86,9	1,97
TMZ-PTX ₃	71,9	2,05	435,7	2,13	78,6	2,04
TMZ-MLT ₁	62,1	1,80	367,8	2,13	93,2	2,01
TMZ-MLT ₂	63,3	2,08	244,8	2,12	142	2,08
TMZ-MLT ₃	64,4	2,10	80,9	2,11	72,2	1,91
TMZ-ERG ₁	122,7	2,04	217	2,10	151	1,99
TMZ-ERG ₂	89,6	2,04	435,7	2,13	113,7	1,97
TMZ-ERG ₃	154,7	2,11	152,4	2,11	135,8	2,02

3.7.2. cDNA Sentezi

Total RNA'dan cDNA sentezlemek amacıyla High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Eşitlenmesi yapılan RNA'lardan 10 μl (2 μg) ve High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, ABD) protokolüne uygun olarak hazırlanan cDNA mixinden 10 μl olmak üzere toplamda 20 μl son hacim pcr striplerine eklendi (Çizelge 3.3.). Applied Biosystems-ProFlex marka Thermal döngü PCR cihazında PCR şartları Step 1: 25°C, 10 dk; Step 2: 37 °C, 120 dk; Step 3: 85 °C, 5 dk olacak şekilde programlandı ve cDNA sentezi yapıldı. Elde edilen cDNA'lar, -20 C'de saklandı.

Çizelge 3.3. cDNA Mix Protokolü

Cdna PCR Mix Bileşenleri (µl)	1 Örnek için Reaksiyon Hacmi
10X RT Buffer	2,0
25X dNTP Mix	0,8
10X RT Random Primers	2,0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0
Nuclease-free H ₂ O	4,2
Toplam Reaksiyon	10,0

3.7.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Kontrol ve deney grubu arasındaki gen ifade farklılıklarını belirlemek için Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 Flex Real-Time PCR System, 384 cihazı kullanılarak qRT-PCR ekspresyonu yapıldı. cDNA'lar SYBR Green qPCR Mastermix protokolüne uygun olarak Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 Flex Real-Time PCR System, 384 kuyucuklu plakalarda spesifik primerler ile çoğaltıldı. Çoğaltma işlemi esnasında elde edilen piklere ait Ct değerleri gen ekspresyonların belirlenmesinde kullanıldı ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak hesaplandı. Endojen Kontrol gen olarak Gapdh , B-aktin ve 18S kullanıldı.

Gen ifadelerinin belirlenmesi için Çizelge 3.4.'de verilmiş olan 18-24 bazlık toplam 29 adet primerin F ve R primer mixleri hazırlanmıştır.

Tez kapsamında,

Antioksidan sistem: Sod 1 (Cu-Zn-Sod), Sod 2 (Mn-Sod), Cat

Gen tamir mekanizmaları: Mlh1, Neil 2, Exo1, Rad 18, Xrcc 3, Smug 1,

Isı şok ailesi moleküler şaperonlar: Hsp27, Hsp60, Hsp 70, Hsp 90,

NF-κB sinyal yolağı: Nf-kb, Ikb-α, Cox-2, P13k, Akt, mTOR,

İçsel ve dışsal apoptoz yolağı: Bcl-2, Bax, Apaf-1, Tnf-α, Kaspaz 8 genlerinin ekspresyonu kontrol ve uygulama gruplarındada qRT-PCR ile analiz edilmiştir.

qRT-PCR reaksiyonunda kullanılan primer dizileri Çizelge 3.4.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.4. qRT-PCR reaksiyonunda kullanılan primer dizileri

Gen Ailesi	Gen Adı	Baz Dizisi	
Antioksidan sistem			
SOD1 [Cu-Zn]	Superoxide dismutase	Forward	5'GTTTCGGTGACAACACCAATG3'
		Reverse	5'GGAGTCGGTGATGTTGACCT3'
SOD2 [MnSOD]	Superoxide dismutase	Forward	5'GGAGTCGGTGATGTTGACCT'
		Reverse	5'TCTGAAGAAGGCCATCGAGT3'
CAT	Catalase	Forward	5'TACGAGCAGGCGAGAAGTT3'
		Reverse	5'ACCTTGTACGGGCAGTTCAC3'
B-ACTİN	Beta-Actin	Forward	5'CTTTGGGCGGAAGACAGGTC3'
		Reverse	5'TTATTGGCGGCTGTGTAAGAG3'

Gen Ailesi		Gen Adı		Baz Dizisi	
Gen tamir mekanizması					
MLH1	MutL Homolog 1	Forward	5'CTTGGCTCTTCTGGCGCC3'		
		Reverse	5'GAGCGCAAGGCTTTATAGAC3'		
NEİL2	Nei Like DNA Glycosylase2	Forward	5'ATGCTTGGCACCTGTAAAG3'		
		Reverse	5'CCTTCAGAGGAGTATTACC3'		
EXO1	Exonülease	Forward	5'CTTGGCTCTTCTGGCGCC3'		
		Reverse	5'GAGCGCAAGGCTTTATAGAC3'		
RAD18	E3 Ubiquitin Protein Ligase	Forward	5'ATGCTTGGCACCTGTAAAG3'		
		Reverse	5'CCTTCAGAGGAGTATTACC3'		
XRCC3	X-Ray Repair Cross Complementing 3	Forward	5'TTGTGCTTTCTCTGTGTCCA3'		
		Reverse	5'TCCTCCAGCCTTTTCTGATA3'		
SMUG1	Strand-Selective Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase 1	Forward	5'CTTGGCTCTTCTGGCGCC3'		
		Reverse	5'GAGCGCAAGGCTTTATAGAC3'		

Gen Ailesi	Gen Adı	Baz Dizisi
Isı şok ailesi- moleküler şaperonlar		
HSP27	Heat shock protein 27	Forward 5'GCCCCGCAGCCCCATCTACGAG3' Reverse 5'GAGCACGCCATCCGACGACAGC3'
HSP60	Heat shock protein 60	Forward 5'GTCGCGCCCCGTTAGCAC3' Reverse 5'CATCGCGTCCCACCTTCTTCAT3'
HSP70	Heat shock protein 70	Forward 5'CGAGETCGACGCATTGTTTG 3' Reverse 5'GAGTGGATCCGCCGACGAGTA3'
HSP90	Heat shock protein 90	Forward 5'CCGGAGGCTCTTTCACAGTC3' Reverse 5'CTTCTCGCGCTCCTTCTCTAC3'

Gen Ailesi	Gen Adı		Baz Dizisi
Nfk-b Sinyal Yolağı			
NF-κB	Nuclear Factor kappa B	Forward	5'AACAGAGAGGATTTTCGTTTCCG 3'
IκB-α		Reverse	5'TTTGACCTGAGGGTAAGACTTCT3'
COX2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	Forward	5'CTCCGAGACTTTCGAGGAAATAC3'
PI3K	Cyclooxygenase-2	Reverse	5'GCCATTGTAGTTGGTAGCCTTCA3' 5'CAGGATACAGCTCCACAGCA3'
AKT	Phosphoinositide 3-kinases	Forward	5'ATCACAGGCTTCCATTGACC3'
mTOR		Reverse	5'GATTGGTTCTTTCTGTCTCTG3'
	AKT Serine/Threonine Kinase 1	Forward	5'CCACAAATATCAATTTACAACC3'
		Reverse	5'TCTATGGCGCTGAGATTGTG3'
	Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase	Forward	5'CTTAATGTGCCCGTCCTTGT3'
		Reverse	5'GGCCGACTCAGTAGCAT3' 5'CGGGACTCTGCTCTTT3'

Gen Ailesi Hücre Döngüsü Sinyal Yolağı	Gen Adı		Baz Dizisi
P21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1	Forward Reverse	5'GGAAGACCATGTGGACCTGT 3' 5'GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA 3'
P27	Cyclin-dependent kinase inhibitör p27 kip1	Forward Reverse	5'GCCCTCCCCAGTCTCTCTTA 3' 5'TCAAAACTCCCAAGCACCTC 3'
P53	Tumor suppressor Protein P53	Forward Reverse	5'CACGAGCGCTGCTCAGATAGC 3' 5'ACAGGCACAAACACGCACAAA 3'

Gen Ailesi Apoptoz Sinyal Yolağı	Gen Adı		Baz Dizisi
BCL2	BCL2 Apoptosis Regulator,	Forward Reverse	5'CAGCTGCACCTGACG3' 5'ATGCACCTACCCAGC3'
BAX	BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator	Forward Reverse	5'ATGGACGGGTCCGGGGAG3' 5'TCAGCCCATCTTCTTCCA3'
CYTC-C	Cytochrome c-2	Forward Reverse	5'TTTGGATCCAATGGGTGATGTTGAG3' 5'TTTGAATTCTCATTAGTAGCTTTTTT3'
APAF1	Apoptotic Peptidase Activating Factor 1	Forward Reverse	5'GATATGGAATGTCTCAGATGGCC3' 5'GGTCTGTGAGGACTCCCCA3'
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha	Forward	5'TCAGCCTCTTCTCC3'
KASP8	Apoptosis-Related Cysteine Peptidase	Reverse Forward Reverse	5'TCAGCTTGAGGGTT3' 5'AGAGTCTGTGCCCAAATCAAC3' 5'GCTGCTTCTCTCTTTTGCTGAA3'

384 kuyucuklu PCR plak kuyularına, c-DNA, Primer mix ve SYBR® Select Master Mix (Life Technologies, ABD) reaksiyon bileşenlerinden eklenmiştir.

cDNA mix hazırlama protokolü Çizelge 3.5.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.5. cDNA mix hazırlama protokolü.

	Hacim (µl)
Primer Mix	6,5 µl
SYBR Green PCR Master Mix	6,5 µl
cDNA	2 µl

Reaksiyon bileşenleri eklenen PCR plağı Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 Flex Real-Time PCR System, 384-well marka gerçek zamanlı PCR cihazına yüklenmiştir.

qRT-PCR döngüsü:

Enzimlerin tutunması ve Denatürasyon: 1 döngü 50 °C 2 dk ve 95 °C 10 dk

Denatürasyon: 95 °C 10 sn

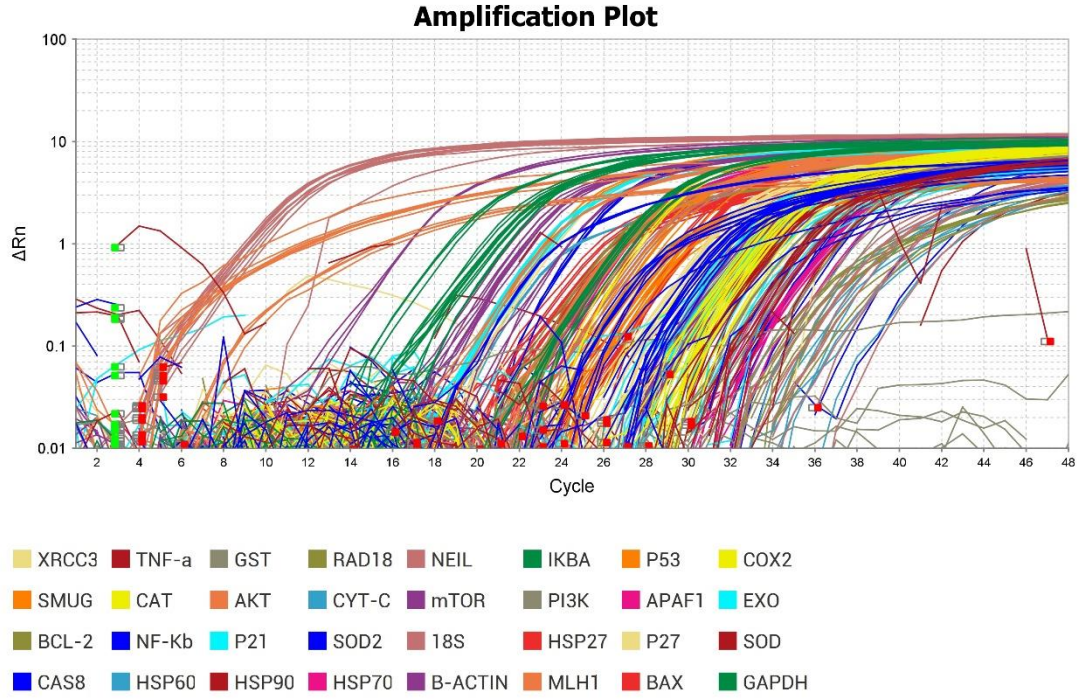
Annealing (Primer eşleşmesi):

Döngü

Elongasyon (Primer uzaması): 60 °C 1 dk

aşamaları ile DNA'lar çoğaltılmış ve (Şekil 3.8.)'daki gibi bir amplifikasyon eğrisi elde edilmiştir.

48



Şekil 3.8. QuantStudio™ 5 qRT-PCR cihazında kontrol ve uygulama gruplarının amplifikasyon görüntüsü

qRT-PCR sonucu elde edilen veriler $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak B-aktin endojen kontrole göre normalize edilip kontrol ile kıyaslanarak oransal ifade edilmiştir.

3.8. Protein Çalışmaları

3.8.1. Western Blot Analizi

Hücre kültürü çalışmaları sonucu qRT-PCR array verilerinde önemli bulunan sekiz adet gen ifadesinin son ürünü protein ekspresyon analizi ile incelenmiştir.

Gen ifadeleri belirlendikten sonra, aday molekül ile doğrudan etkileşimi olacağı tahmin edilen Nf-kb, Ikb- α , P13k, Akt, Bcl-2, Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 proteinlerinin ekspresyonları western blot yöntemi ile analiz edildi. Kullanılan proteinler ve özellikleri Çizelge 3.6.'da sunuldu.

Çizelge 3.6. Western Blot Analizinde kullanılan proteinler

Antikor adı	Marka	Lot Numarası	Host	Konsantrasyon
BCL-2 (N-19)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-492 # A1915	Rabbit polyclonal IgG	200 µg/ml
BAX (B-9)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-7480 # H1914	Mouse monoclonal IgG	200 µg/ml
Kaspaz 3 (4.1.18)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-65497 # G1514	Mouse monoclonal IgG	200 µg/ml
Kaspaz 8 (NB100-56116)	NovusBio	AR-1050613	Rabbit polyclonal IgG	0.05 ml
NF-κB p65 (A)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-109 B2715	Rabbit polyclonal IgG	200 µg/ml
p-IKB-α (B-9)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-8404 # H1909	Mouse monoclonal IgG	200 µg/ml
p-Akt 1/2/3 (Ser 473)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-101629 D0113	Rabbit polyclonal IgG	100 µg/ml
NBP2-22212 (anti P13 Kinaz p85) alpha (6G10)	NovusBio	# 120413	Mouse monoclonal IgG	1 mg/ml

3.8.1.1. Protein İzolasyon Protokolü

- 1) 25 ml’lik flasklarda hücre kültürleri hazırlandı ve uygulama yapılmış olan hücreler 72 saat inkübe edildikten sonra flasklardaki besiyeri uzaklaştırıldı.
- 2) Flasklara 3 ml Tripsin-EDTA eklendi ve 10 dk hücrelerin kalkması beklendi.
- 3) Tabandan kalkan hücreler 15 ml’lik falkonlara alınarak 2000 rpm’de 2,5 dakika santrifüj edildi.
- 4) Süpernatant uzaklaştırıldı.
- 5) 15 ml’lik falkonda 10 ml Tissue Extraction Buffer (Life Technologies, ABD) ve 1 ml Protease Inhibitor Cocktail I (Merck, Almanya) konularak vortekslendi.
- 6) Bu karışımdan supernatantı uzaklaştırılmış olan falkonlardaki hücreler üzerine 150 µl eklendi ve vortexlendi.
- 7) Protein miktarı Nanodrop (NanoQ Optizen, Kore)’da ölçüldü.
 - a) Denatürasyon:
 - 1) Proteinlerin miktarları su ile seyreltilerek eşitlendi.
 - 2) Striplere eşitlenen proteinlerden 6,5 µl konuldu.
 - 3) Üzerlerine 2,5 µl LDL Sample Buffer (4x) NuPAGE™ (Life Technologies, ABD) ve 1 µl Sample Reducing Agent (10x) Bolt™ eklendi.

- 4) Hazırlanan numuneler PCR cihazında 80°C’de 12 dakika denatüre edildi.
- 5) Denatürasyondan sonra örnekler soğuk blok üzerine alındı ve bir süre soğumaları için beklendi.
- b) Jele yükleme ve elektroforez:
 - 1) Running Buffer (20x) çözeltisi 950 ml deiyonize su ve 50 ml Running Buffer (20x) karıştırılarak 1x Running Buffer elde edildi.
 - 2) Elektroforez tankının içine 1x Running Buffer dolduruldu.
 - 3) Jel paketten çıkarıldı ve taraklar her iki taraftan tutularak dikkatlice çıkarıldı.
 - 4) Jel tank içerisine yerleştirildi.
 - 5) Marker olarak Magic Marker XP’den 7 µl ve See Blue Plus 2’den 5 µl olacak şekilde standartlar ilk kuyucuğa yüklendi.
 - 6) Daha sonra denatüre edilmiş olan protein örneklerinden 10 µl diğer kuyucuklara sırayla yüklendi.
 - 7) 60 V’da yaklaşık 90 dakika yürütüldü.
- c) Jelden membrana aktarma:
 - 1) Yürütme işleminden sonra jel kasetleri tanktan alınarak spatula ile yanlarından kaldırılarak açıldı. Jelin üst ve alt kısmı düzgün bir şekilde kesilerek atıldı.
 - 2) Jelin kurumaması için kasetin alt kısmıyla beraber jel saf su içerisine alındı.
 - 3) Blotlama cihazı açılarak kapak kısmına sünger metal kısmı sağ üst köşeye gelecek şekilde yerleştirildi.
 - 4) NC Anade Stack Bottom Regular’ın üstü açıldı ve cihaza tablasıyla yerleştirildi.
 - 5) Jel kasedi jelle beraber su içinde hafifçe çalkalanarak jel ve kaset arasına hava girmesi sağlanarak kolay ayırım gerçekleştirilmesi sağlandı.
 - 6) Ayrılan jel yavaşça alınarak Bottom üzerine yerleştirildi ve rulo ile tek yönlü rulo yapılarak hava kabarcıkları uzaklaştırıldı.
 - 7) Filtre kağıdı suda ıslatılarak jelin üzerine serildi ve rulo ile kabarcıklar uzaklaştırıldı.
 - 8) Cathode Stack Top filtre kağıdının üzerine konularak kapatıldı. Blotlama işlemi iBlot (Life Technologies, ABD) ile başlatıldı ve 7 dakika sonra işlem tamamlandı.
 - 9) Bu süreç sonunda proteinler membrana geçmiş oldu. Bottom plaka alınarak jel atıldı.
 - 10) Membran belirlenen yerlerden bistüri ile kesilerek ayrıldı ve kurumaması için suya konuldu.
- d) Bloklama aşaması ve birincil antikor bağlanması:

- 1) Blocking Solution 14 ml ultra saf su, 4 ml Blocking Diluent Past A ve 2 ml Blocking Diluent Past B karıştırılarak hazırlandı.
- 2) Memran içerisindeki su boşaltılarak Blocking Solution eklendi.
- 3) 300 devirde çalkalayıcı inkübatörde 1 saat çalkalandı.
- 4) Birkaç kez ultra saf su ile yıkama yapıldı.
- 5) Nf-kb, Ikb- α , P13k, Akt, Bcl-2, Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 antikorları 1:100 oranında B-aktin antikoruna ise 1:2000 oranında Blocking Solution ile seyreltilerek 10 ml birincil antikorlar hazırlandı.
- 6) Membran üzerine birincil antikor dökülerek bir gece +4 °C’de en düşük devirde çalkalandı.
- e) Yıkama ve ikincil antikor bağlanması:
 - 1) Yıkama solusyonu 150 ml ultra saf su ve 10 ml Antibody Wash Solution (16x) karıştırılarak hazırlandı.
 - 2) Bir gece birincil antikorda bekleyen membranlar 3 kere 5 dakika çalkalayıcı üzerinde yıkama solusyonuyla yıkandıktan sonra bir kere 5 dakika ultra saf su ile yıkandı.
 - 3) İkincil antikor çözeltisi membran üzerine döküldükten sonra oda sıcaklığında 1 saat 300 devirde inkübe edildi. İşlem sonrası ikincil antikor falkona toplandı.
 - 4) Membranlar 3 kere 5 dakika çalkalayıcı üzerinde yıkama solusyonuyla yıkandıktan sonra bir kere 5 dakika ultra saf su ile yıkandı.
- f) Kemilüminesans bağlanması ve görüntüleme:
 - 1) Bir membran için 2,375 ml Chemiluminescen Substrat ve 0,125 ml Enhancers karıştırılarak hazırlandı ve alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korundu.
 - 2) Membran karanlık bir yere alındıktan sonra kemilüminesans çözeltisi tüm yüzeye yayılarak uygulandı.
 - 3) 4 dakika beklendikten sonra Micro Chemi kemolüminesans görüntüleme gerçekleştirildi.

3.9. İstatiksel Değerlendirme

MTT Testi sonucu tekli molekül uygulamalarının IC₅₀ değerlerini belirlemek üzere mikrolaka okuyucudan alınan spektrofotometrik sonuçlar PROBIT analizi ile belirlendi. Kombinasyon uygulamaların hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi spektrofotometrik yöntemle mikrolaka okuyucudan alınan sonuçları, Tali analizi sonucu tali sitometri yazılımından alınan canlı-ölü ve apoptotik hücre değerleri, qRT-PCR ile B-aktin endojen kontrol geni referans alınarak, $\Delta\Delta C_t$ metodu ile elde edilen ekspresyon değerlerinin ortalamaları arasındaki fark, Kontrol ve deney grupları arasında protein seviyesi değerlerindeki göreceli kat değişimi farklılıkları değerlendirmek üzere tek yönlü ANOVA analizi yapıldı ve *Tukey HSD* sonuçlarına göre uygulama yapılan kombinasyonlar arasındaki ilişki belirlendi. Çalışmada istatistik analizler SPSS 20, Üniversite Lisanslı (IBM, ABD) ve Graphpad Prism 5. istatistik programları ile yapılmış, $p \leq 0.05$ olarak kullanılmıştır.

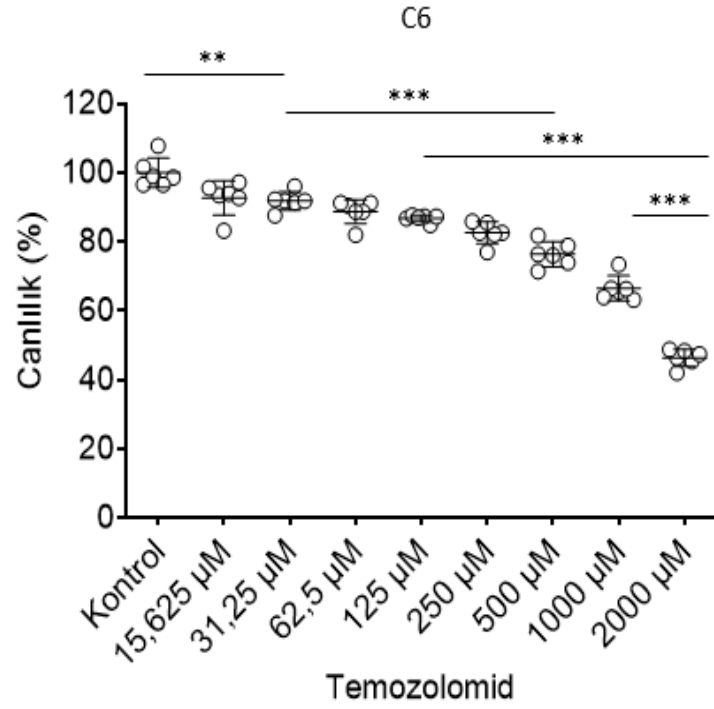
BÖLÜM 4

BULGULAR

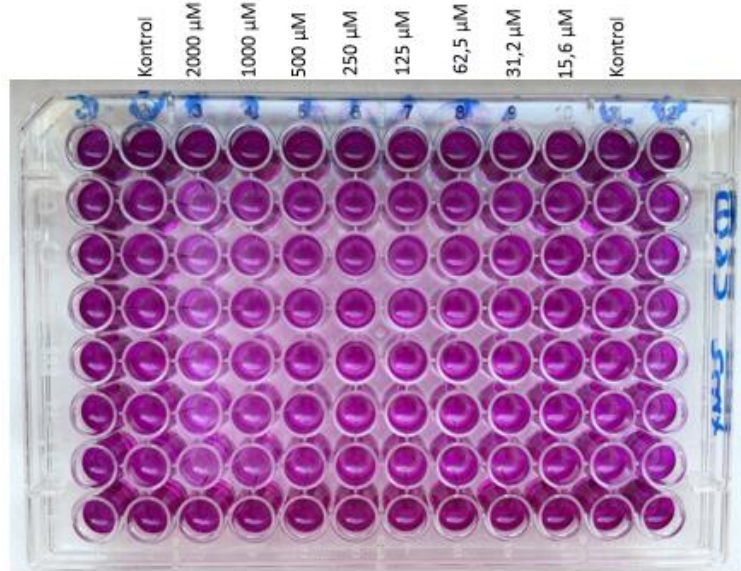
4.1. Moleküllerin IC₅₀ Dozlarının Belirlenmesi (MTT Testi)

4.1.1. Temozolomid

TMZ'in C6 rat beyin kanser hücre serisi üzerinde doza ve zamana bağlı sitotoksik etkisi MTT analizi ile değerlendirilerek elde edilen veriler Şekil 4.1.'de sunuldu. Metod kısmında ifade edildiği haliyle 96 kuyulu plakalara ekimi gerçekleştirilen hücrelere, 15,63-2000 µM olarak 8 farklı doz uygulandı (Şekil 4.2.). Madde uygulanmış C6 hücre serileri karbondioksitli inkübatörde kültüre alınarak TMZ'in C6 hücre serilerinde 72 saat süresince hücre canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirildi. TMZ'in hücre canlılığını düşürdüğü ayrıca gerçekleşen değişimin istatistiksel açıdan anlamlı olduğu tespit edildi ($F_{72 \text{ Saat}}=137,128$; $sd=8-45$; $p<<0.0001$) (Şekil 4.3.). 72 saatlik uygulama sonrasında sonuçlar kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında, en yüksek canlı hücre oranı 15,625 µM konsantrasyonda $\%92,6 \pm 4,9$ şeklinde belirlenirken, 2000 µM TMZ doz konsantrasyonunda ortamda bulunan hücrelerin yalnızca $\% 46,3 \pm 2,4$ 'ü canlı kaldı.

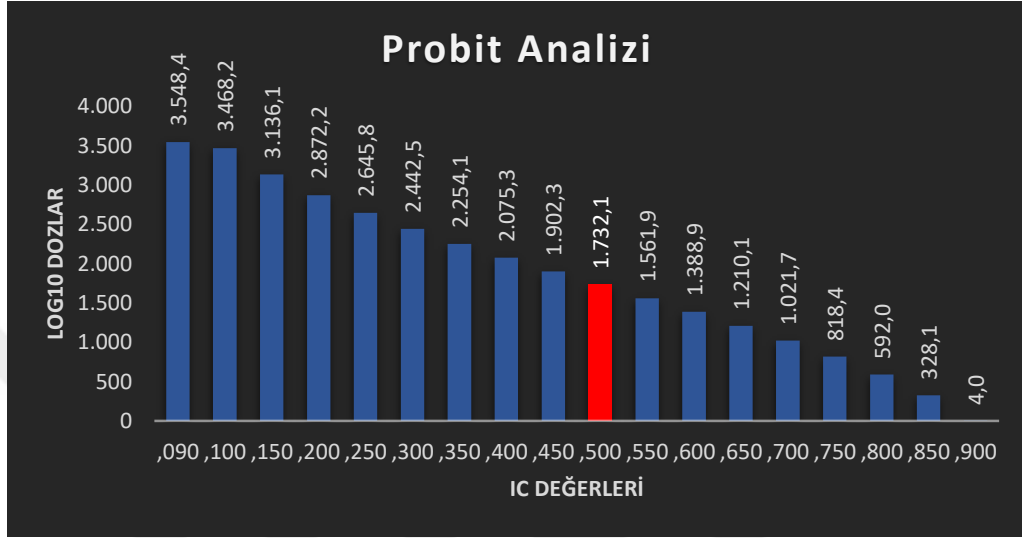


Şekil 4.1. C6 hücre serisinde 72 saat süreyle 15,625-2000 µM doz aralıklarında Temozolomid uygulamasının hücre canlılığına etkisi. n=6, veriler; % Canlılık ortalama ± standart sapma # veriler istatistiksel açıdan farklıdır, One way-ANOVA, Tukey HSD testi Kontrol ve Temozolomid Deney grubu, * gruplar arası karşılaştırma *P ≤0.05; ** P ≤0.01; *** P ≤0.001, **** P ≤0.0001 (IC₅₀: 1732,101 µM)



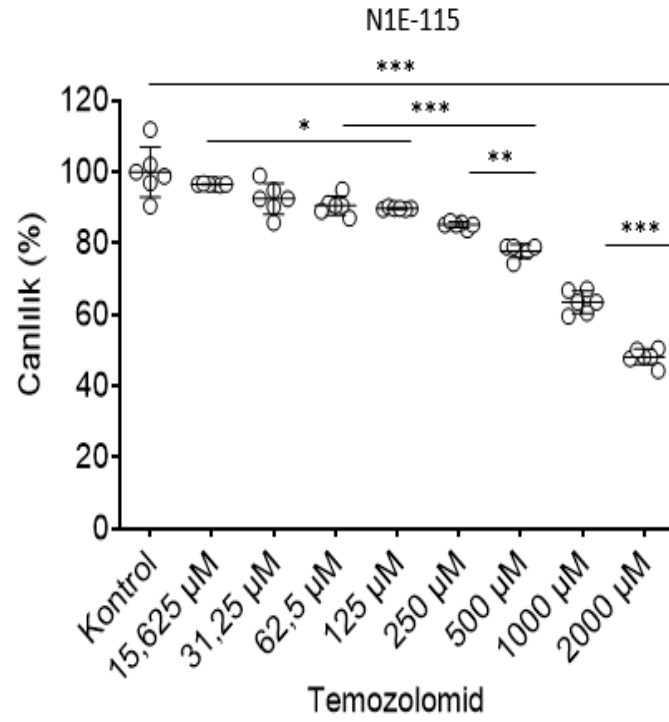
Şekil 4.2. C6 hücre serisi 15,625-2000 µM doz aralıklarında Temozolomid uygulamasına ait MTT test görüntüsü

72 saat süre boyunca TMZ uygulaması sonucu belirlenen yüzde canlılık verileri, kontrolle kıyaslandı ve her bir doz için ölüm oranları belirlendi. Bu ölüm oranları kullanılarak probit analizi yapıldı ve TMZ'in Rat C6 hücre serisi için IC₅₀ değeri 1732,101 μ M olarak belirlendi (Şekil 4.3.).

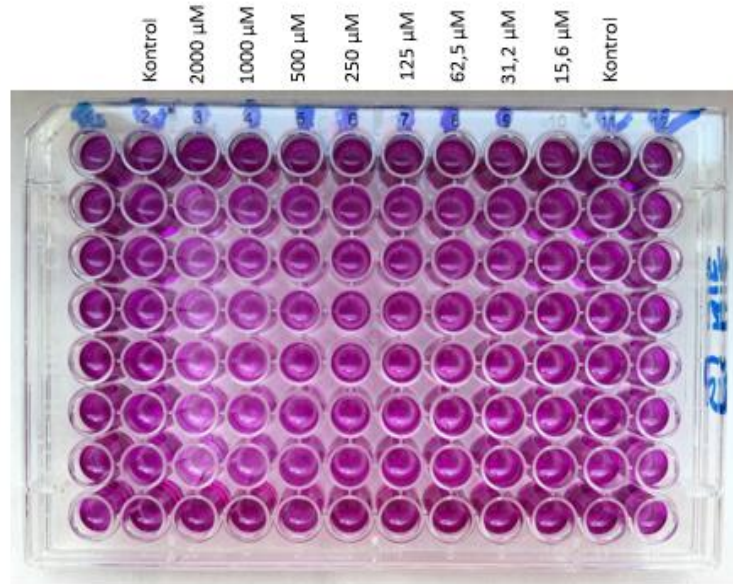


Şekil 4.3. C6 hücre serisinde 72 saat süre boyunca Temozolomid uygulaması sonrasında MTT test verileri kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri (F₇₂ Saat=137,128; sd=8-45; p<<0.0001)

N1E-115 hücre serisi üzerinde 72 saat süre sonucunda TMZ uygulamasının hücre canlılığına etkisi değerlendirilerek elde edilen veriler Şekil 4.4.'de sunuldu. 96 kuyucuklu pleytlere metod kısmında belirtildiği şekilde ekilen hücrelere, TMZ 15,63-2000 μ M doz aralıklarında 8 farklı konsantrasyonda uygulandı (Şekil 4.5.). TMZ'in en düşük konsantrasyondan başlayarak hücrelerde istatistik olarak önemli düzeyde bir ölüm oluşturduğu tespit edildi. (F₇₂ Saat=163,013; sd=8-45; p<0.0001) (Şekil 4.6.). MTT test verileri kontrolle kıyaslandı ve en az hücre canlılığı, en yüksek doz olan 2000 μ M konsantrasyonda % 48,1 $\pm$ 2,2 olarak belirlendi. En düşük konsantrasyon 15,625 μ M'da ise % 3,4 $\pm$ 0,1 bir inhibisyon oluşturduğu gözlemlendi.

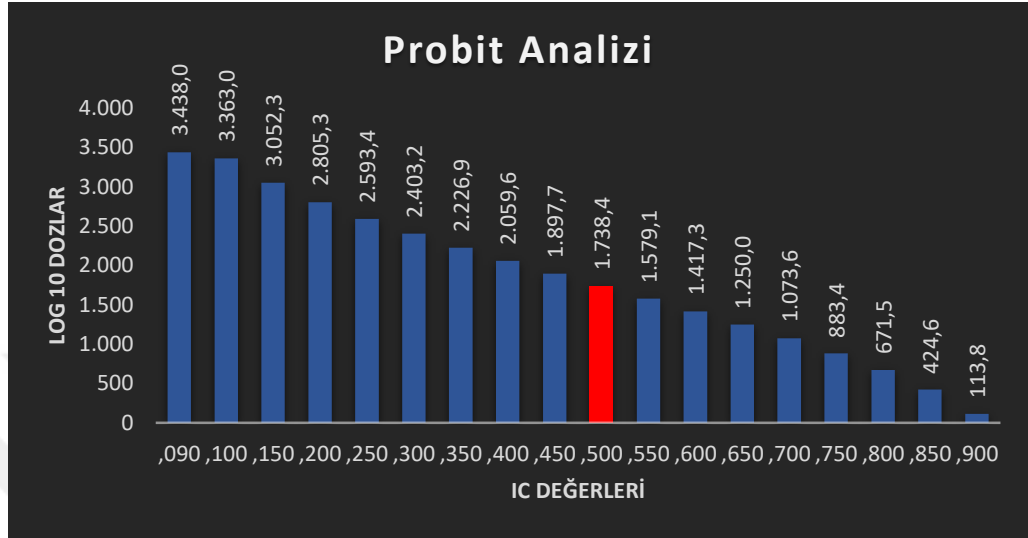


Şekil 4.4. N1E-115 hücre serisinde 72 saat süreyle 15,625-2000 µM doz aralıklarında Temozolomid uygulamasının hücre canlılığına etkisi. n=6, veriler; % Canlılık ortalama ± standart sapma # veriler istatistiksel açıdan farklıdır, tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi Kontrol ve Temozolomid Deney grubu, * gruplar arası karşılaştırma *P ≤0.05; ** P ≤0.01; *** P ≤0.001, **** P ≤0.0001 (IC₅₀: 1738,404 µM)



Şekil 4.5. N1E-115 hücre serisi 15,625-2000 µM doz aralıklarında Temozolomid uygulamasına ait MTT test görüntüsü (Temozolomid: TMZ)

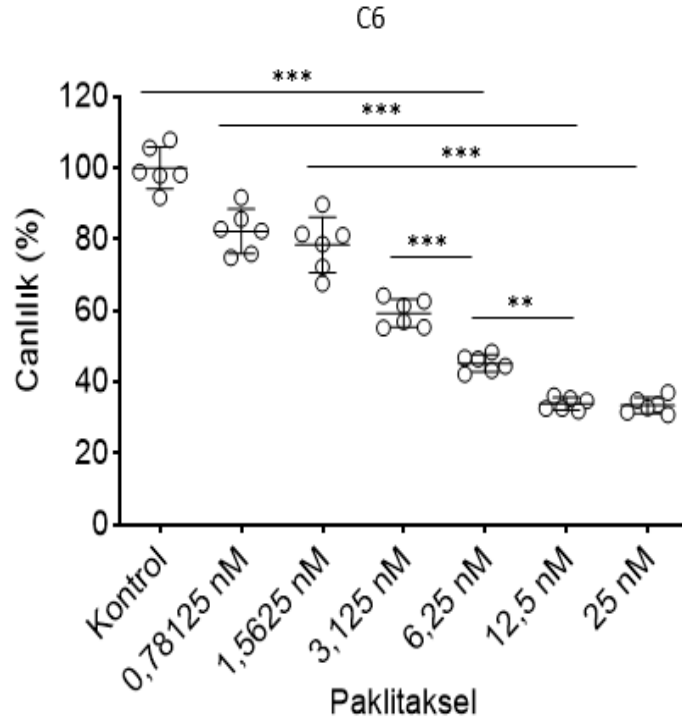
Yapılan çalışmada 72 saat süre boyunca TMZ uygulanması sonucunda kontrolle kıyaslanarak belirlenen % ölüm oranları ile yapılan probit analizinde IC₅₀ değeri 1738,404 µM olarak belirlendi (Şekil 4.6.)



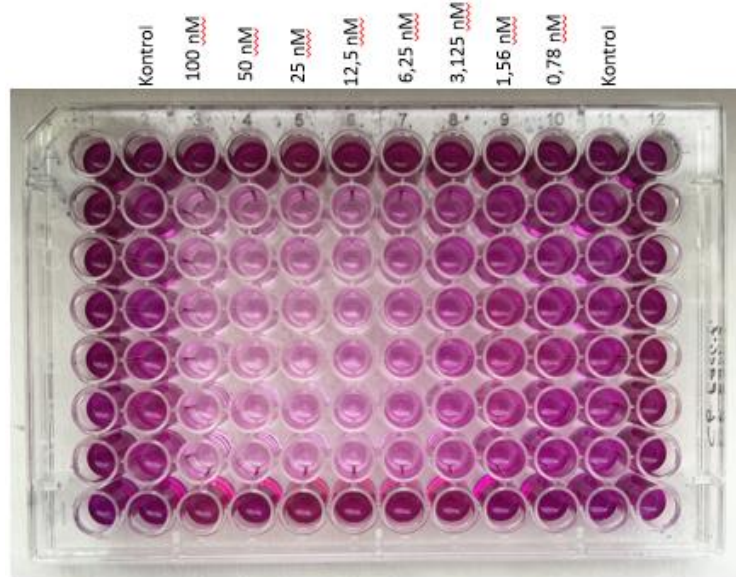
Şekil 4.6. N1E-115 hücre serisinde 72 saat süre boyunca Temozolomid uygulaması sonrasında MTT test verileri kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri (F₇₂ Saat=163,013; sd=8-45; p<0.0001)

4.1.2. Paklitaksel

Paklitakselin sitotoksik etkisi, C6 rat beyin kanser hücre serisi üzerinde MTT analizi ile değerlendirildi ve elde edilen veriler Şekil 4.7.'de sunuldu. Paklitaksel, 96 kuyucuklu pleytlere metod kısmında belirtildiği şekilde ekilen hücrelere 0,78 nM-25 nM doz aralıklarında 8 farklı konsantrasyonda uygulandı (Şekil 4.8.) ve 72 saat süre sonunda paklitakselin etkisi değerlendirildiğinde hücre canlılığının istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşüş gösterdiği belirlendi. (F₇₂ Saat=171,977; sd=6-35; p<<0.0001) (Şekil 4.9.). Yapılan çalışmada kontrol ile kıyaslandığında canlı hücre oranı en yüksek 0,781 nM uygulama konsantrasyonunda %82,2 ± 6,2 olarak belirlenirken, en yüksek doz olan 25 nM paklitaksel konsantrasyonunda ise ortamdaki hücrelerin sadece % 33,3 ± 2,2'sinin canlı kaldığı tespit edildi.

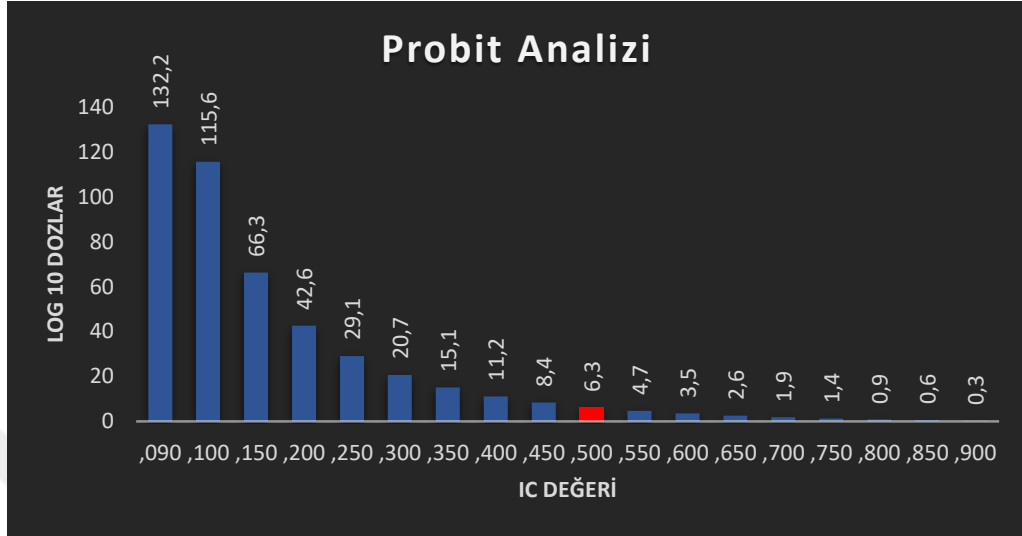


Şekil 4.7. C6 hücre serisinde 72 saat süreyle 15,625-2000 μ M doz aralıklarında Temozolomid uygulamasının hücre canlılığına etkisi. n=6, veriler; % Canlılık ortalama $\pm$ standart sapma # veriler istatistiksel açıdan farklıdır, tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi Kontrol ve Temozolomid Deney grubu, * gruplar arası karşılaştırma *P $\leq$ 0.05; ** P $\leq$ 0.01; *** P $\leq$ 0.001, **** P $\leq$ 0.0001 (IC₅₀: 6,305 nM).



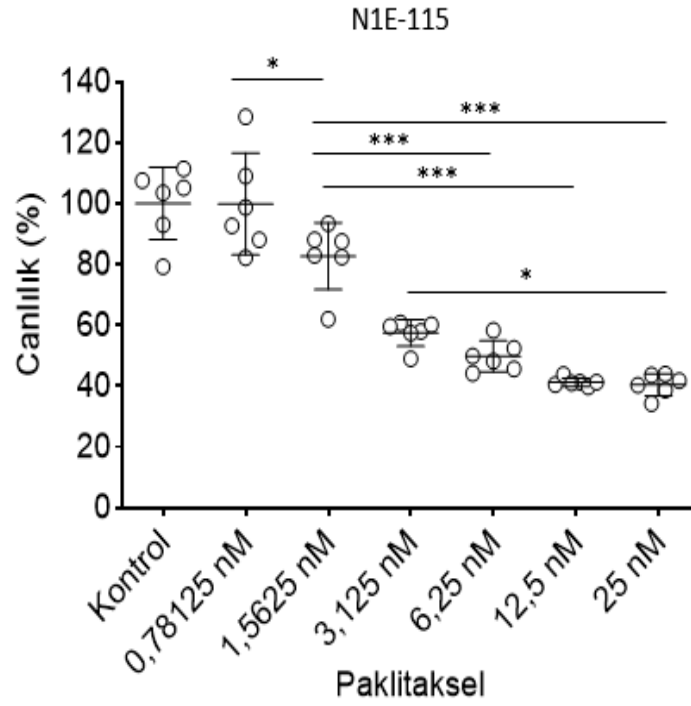
Şekil 4.8. C6 hücre serisi 0,78 nM -25 nM doz aralıklarında Paklitaksel uygulamasına ait MTT test görüntüsü

Yapılan çalışmada 72 saat süre boyunca TMZ uygulanması sonucunda kontrolle kıyaslanarak belirlenen % ölüm oranları ile yapılan probit analizinde IC₅₀ değeri 6,305 nM olarak belirlendi (Şekil 4.9.).

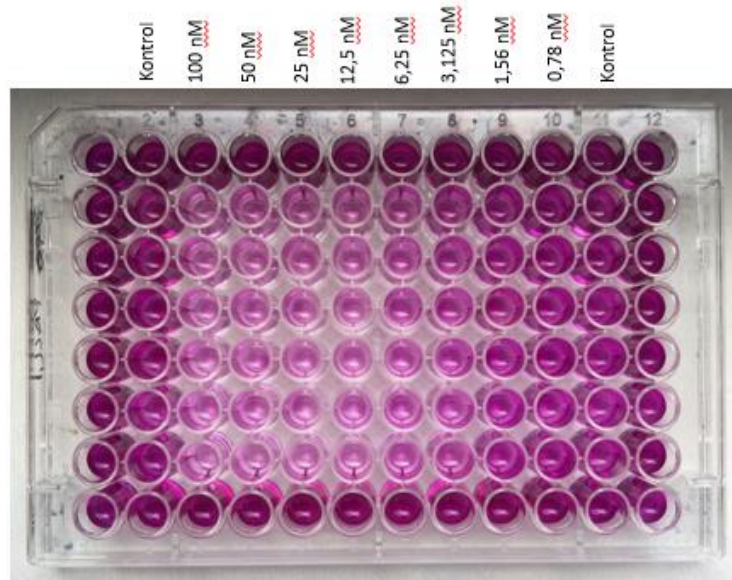


Şekil 4.9. C6 hücre serisinde 72 saat süre boyunca Paklitaksel uygulaması sonrasında MTT test verileri kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri (F₇₂ Saat=171,977; sd=6-35; p<<0.0001)

Paklitakselin N1E-115 rat beyin kanser hücre serisi üzerinde oluşturduğu sitotoksik etkinin MTT analizi ile değerlendirilmesi sonucu elde edilen veriler Şekil 4.10.'de sunuldu. N1E-115 hücre serisi üzerine paklitakselin 0,78 nM-25 nM doz aralıklarında 8 farklı konsantrasyonda uygulandı (Şekil 4.11.) ve 72 saat süre sonunda paklitakselin etkisi değerlendirildiğinde hücre canlılık oranını istatistiksel açıdan anlamlı seviyede düşürdüğü tespit edildi (F₇₂ Saat=48,492; sd=6-35; p<<0.0001) (Şekil 4.12.). Yapılan çalışmada 72 saat boyunca uygulama sonunda kontrolle kıyaslanarak bulunan en yüksek canlı hücre oranı 0,781 nM konsantrasyonda %99,8 ± 16,7 olarak belirlenirken, 25 nM paklitaksel konsantrasyonunda hücre canlılığı % 40,3 ± 3,6 olarak tespit edildi.

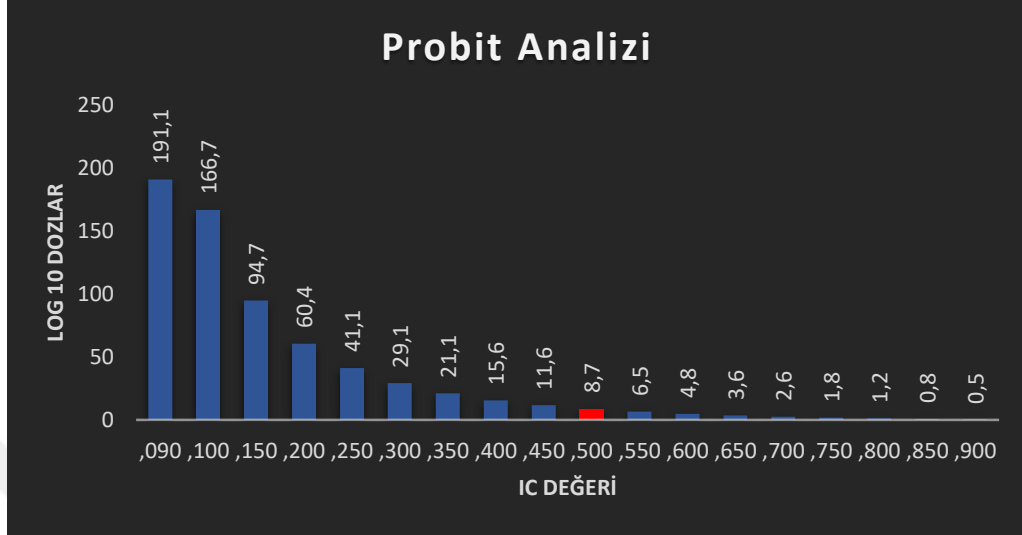


Şekil 4.10. N1E-115 hücre serisinde 72 saat süreyle 0,78 nM-25 nM doz aralıklarında paklitaksel uygulamasının hücre canlılığına etkisi. n=6, veriler; % Canlılık ortalama $\pm$ standart sapma # veriler istatistiksel açıdan farklıdır, One-way-ANOVA, Tukey HSD testi Kontrol ve Paklitaksel Deney grubu, * gruplar arası karşılaştırma *P $\leq$ 0.05; ** P $\leq$ 0.01; *** P $\leq$ 0.001, **** P $\leq$ 0.0001 (IC₅₀: 8,674 nM).



Şekil 4.11. N1E-115 hücre serisi 0,78 nM -25 nM doz aralıklarında Paklitaksel uygulamasına ait MTT test görüntüsü

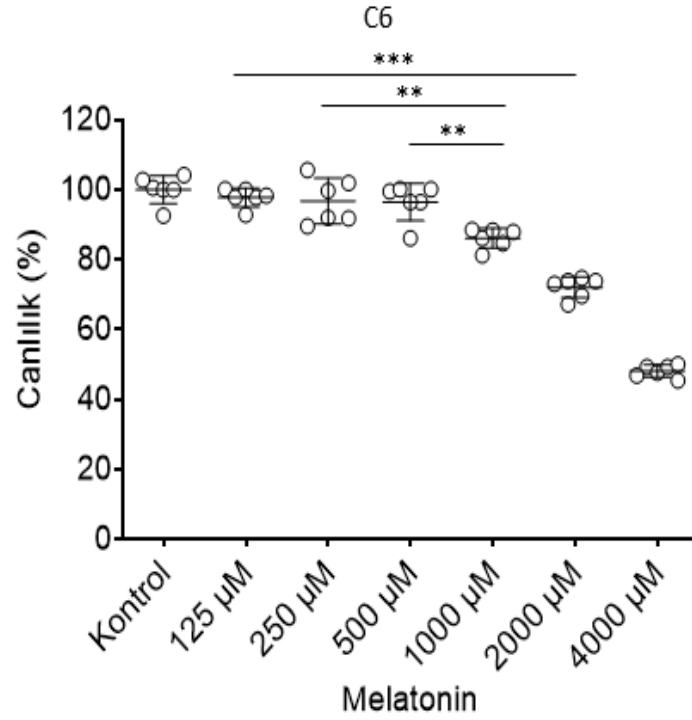
Yapılan çalışmada 72 saat süre boyunca Melatonin uygulaması sonucunda kontrolle kıyaslanarak belirlenen % ölüm oranları kullanılarak yapılan probit analizinde IC₅₀ değeri 8,674 nM olarak belirlendi (Şekil 4.12).



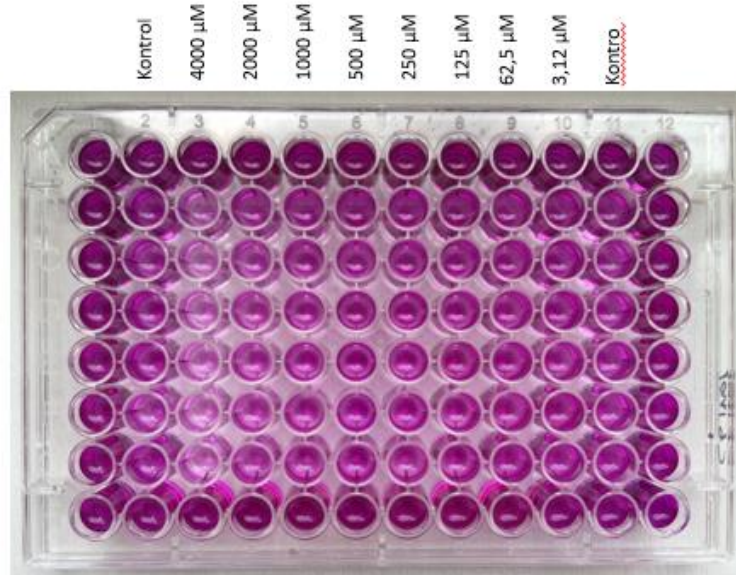
Şekil 4.12. N1E-115 hücre serisinde 72 saat süre boyunca Paklitaksel uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri (F₇₂ Saat=48,492; sd=6-35; p<<0.0001)

4.1.3. Melatonin

C6 rat beyin kanser hücre serisi üzerinde Melatoninin doza ve zamana bağlı sitotoksik etkisi MTT analizi ile belirlendi ve elde edilen veriler Şekil 4.13.'de sunuldu. Yapılan denemede 96 kuyucuklu pleytlere metod kısmında belirtildiği şekilde ekilen hücrelere, Melatonin 125-4000 µM doz aralıklarında 8 farklı konsantrasyonda uygulandı (Şekil 4.14.). Melatonin'in C6 hücre serisinde 72 saat süre sonrasında, hücreler üzerinde, en düşük konsantrasyon dahil olmak üzere istatistik olarak önemli seviyede ölüm oluşturduğu tespit edildi (F₇₂ Saat=133,628; sd=6-35; p<0.0001) (Şekil 4.15.). Yapılan MTT testi sonucunda kontrolle kıyaslanarak en az hücre canlılığı 4000 µM Melatonin konsantrasyonunda % 48,0 ± 1,7 olarak belirlenirken, 125 µM konsantrasyonda ise 72 saat Melatonin uygulamasının C6 hücre serileri üzerinde % 2,3 ± 2,6 bir inhibisyon oluşturduğu gözlemlendi.

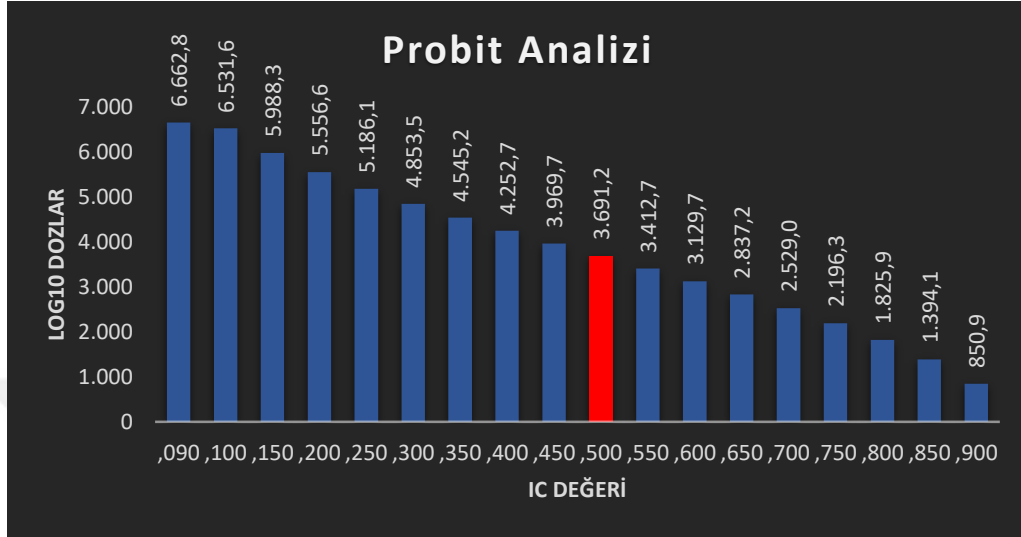


Şekil 4.13. C6 hücre serisinde 72 saat süreyle 31,25 µM-4000 µM doz aralıklarında Melatonin uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi. n=6, veriler; % Canlılık ortalama $\pm$ standart sapma # veriler istatistiksel açıdan farklıdır, tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi Kontrol ve Melatonin Deney grubu, * gruplar arası karşılaştırma *P $\leq$ 0.05; ** P $\leq$ 0.01; *** P $\leq$ 0.001, **** P $\leq$ 0.0001 (IC₅₀: 3691,235 µM).



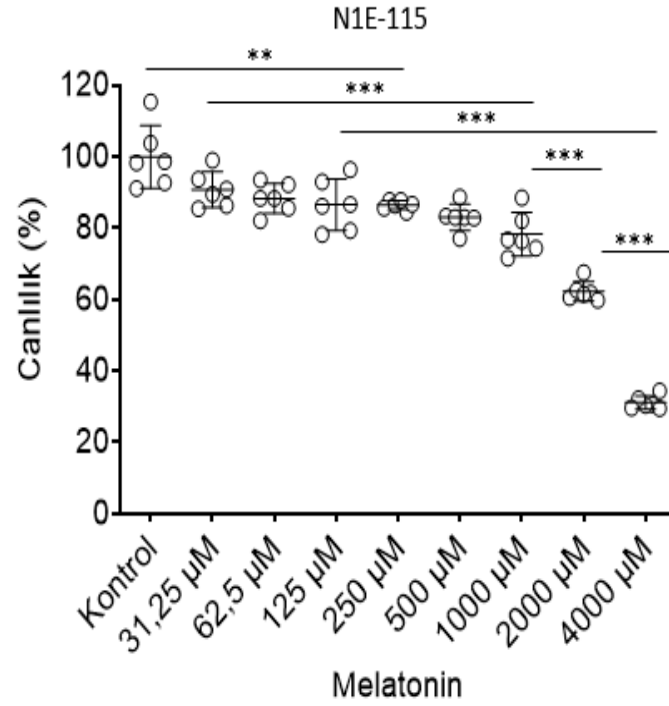
Şekil 4.14. C6 hücre serisi 31,25 µM-4000 µM doz aralıklarında Melatonin uygulamasına ait MTT test görüntüsü

Yapılan çalışmada 72 saat süre sonrasında melatonin uygulaması sonucu kontrolle kıyaslanarak belirlenen % ölüm oranları kullanılarak yapılan probit analizinde IC₅₀ değeri 3691,235 µM olarak belirlendi (Şekil 4.15.)

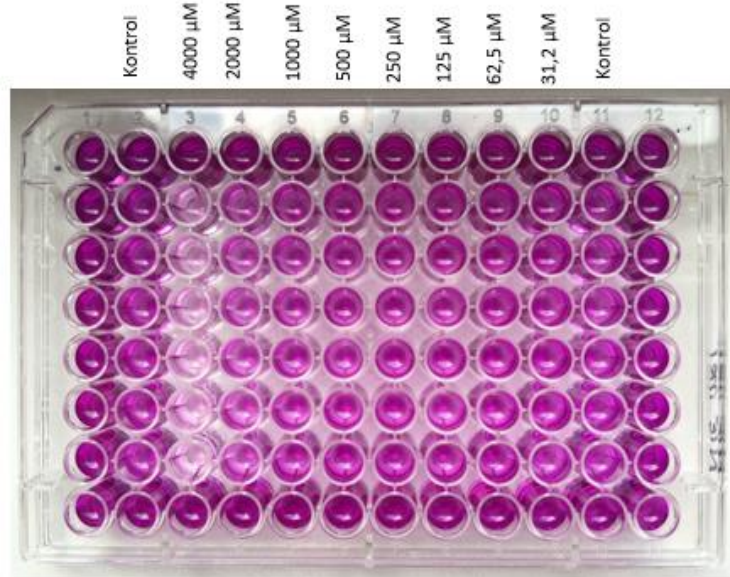


Şekil 4.15. C6 hücre serisinde 72 saat sonunda Melatonin molekülünün MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri (F₇₂ Saat=133,628; sd=6-35; p<0.0001)

Melatonin'ın N1E-115 rat beyin kanser hücre serisinde canlılık üzerindeki etkisi MTT analizi ile değerlendirilerek elde edilen veriler Şekil 4.16'da sunuldu. Yapılan denemede 96 kuyucuklu pleytlere metod kısmında belirtildiği şekilde ekilen hücrelere, Melatonin 125-4000 µM doz aralıklarında 8 farklı konsantrasyonda uygulandı (Şekil 4.17.) Melatonin'ın N1E-115 hücre serisi üzerinde 72 saat süre sonrasında, hücreler üzerinde, en düşük konsantrasyon dahil olmak üzere istatistik olarak önemli seviyede ölüm oluşturduğu tespit edildi (F₇₂ Saat=148,452; sd=5-30; p<0.0001) (Şekil 4.18.). Yapılan MTT testi sonucunda kontrolle kıyaslanarak en az hücre canlılığı 4000 µM Melatonin konsantrasyonunda % 31,1 ± 1,8 olarak belirlenirken, 31,25 µM konsantrasyonda ise 72 saatlik Melatonin uygulamasının N1E-115 serileri üzerinde % 9,2 ± 5,0 bir inhibisyon oluşturduğu gözlemlendi.

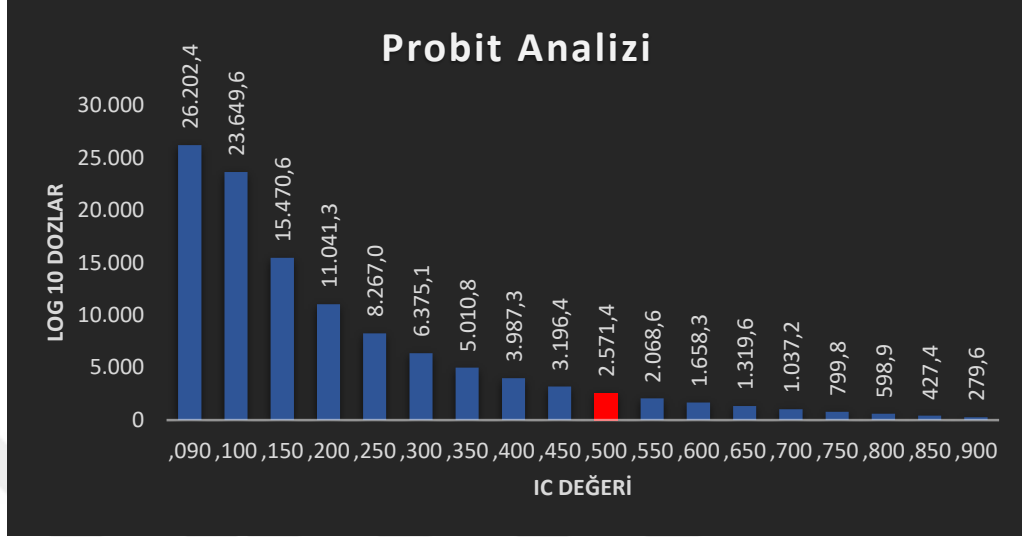


Şekil 4.16. N1E-115 hücre serisinde 72 saat süreyle 31,25 µM-4000 µM doz aralıklarında Melatonin uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi. n=6, veriler; % Canlılık ortalama $\pm$ standart sapma # veriler istatistiksel açıdan farklıdır, tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi Kontrol ve Melatonin Deney grubu, * gruplar arası karşılaştırma *P $\leq$ 0.05; ** P $\leq$ 0.01; *** P $\leq$ 0.001, **** P $\leq$ 0.0001 (IC₅₀: 2571,413 µM).



Şekil 4.17. N1E-115 hücre serisi 31,25 µM-4000 µM doz aralıklarında Melatonin uygulamasına ait MTT test görüntüsü

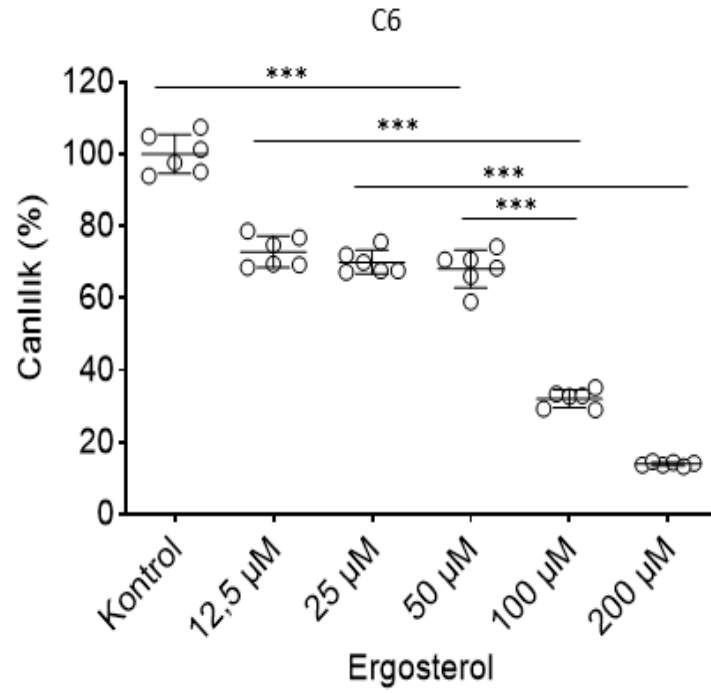
Yapılan çalışmada 72 saat süre sonrasında melatonin uygulaması sonucu kontrolle kıyaslanarak belirlenen % ölüm oranları kullanılarak yapılan probit analizinde IC₅₀ değeri 2571,413 µM olarak belirlendi (Şekil 4.18.)



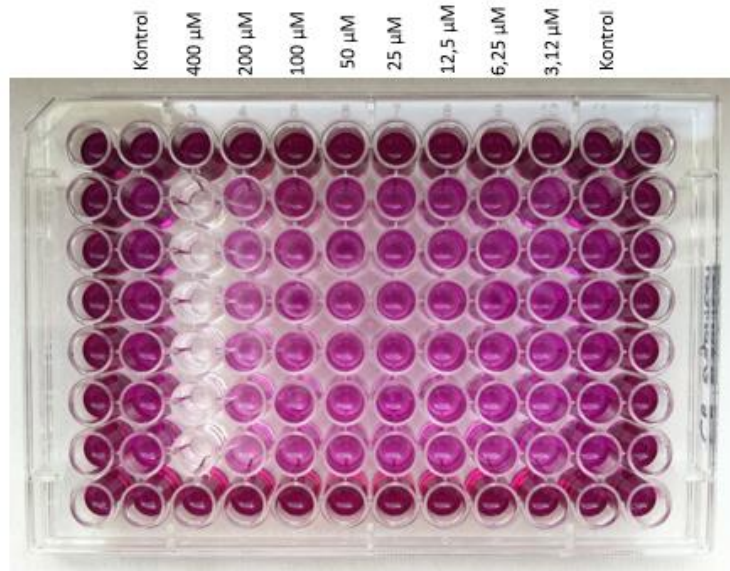
Şekil 4.18. N1E-115 hücre serisinde 72 saat sonunda Melatonin molekülünün MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri (F₇₂ Saat=148,452; sd=5-30; p<0.0001)

4.1.4. Ergosterol

Ergosterol'ün C6 rat beyin kanser hücre serisi üzerinde doza ve zamana bağlı sitotoksik etkisi MTT analizi ile değerlendirilerek elde edilen veriler Şekil 4.19.'da sunuldu. Yapılan denemede 96 kuyucuklu pleytlere metod kısmında belirtildiği şekilde ekilen hücrelere, ergosterol 12.5-200 µM doz aralıklarında 8 farklı konsantrasyonda uygulandı (Şekil 4.20.). 72 saat uygulama sonunda hücre canlılığını istatistiksel açıdan anlamlı seviyede düşürdüğü tespit edildi (F₇₂ Saat=372,511; sd=5-30; p<<0.0001) (Şekil 4.21.). Yapılan çalışmada 72 saat uygulama sonrasında kontrolle kıyaslanarak en yüksek canlı hücre oranı 12,5 µM konsantrasyonda %72,8 ± 4,3 olarak belirlenirken, 200 µM ergosterol konsantrasyonunda ise % 13,9 ± 0,5 olarak tespit edildi.

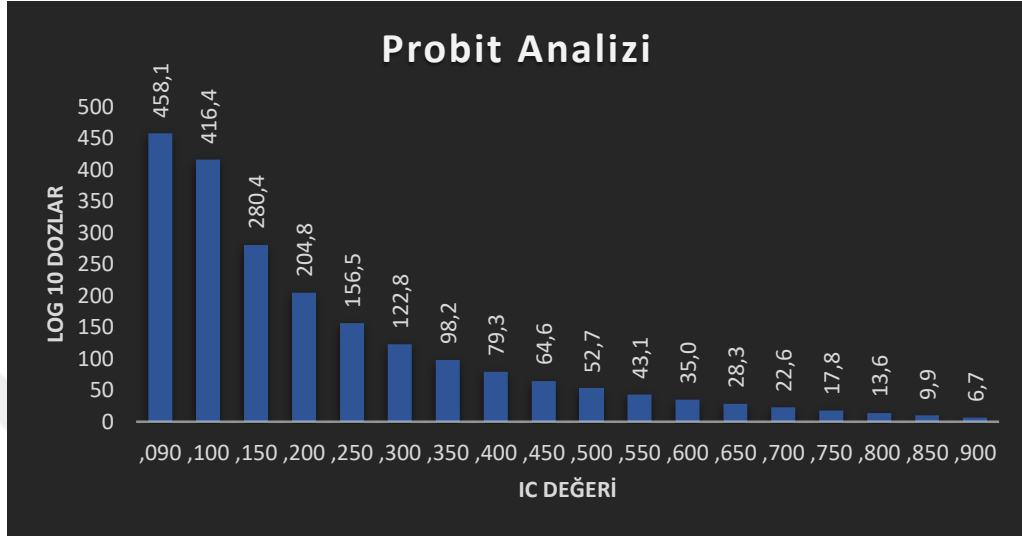


Şekil 4.19. C6 hücre serisinde 72 saat süreyle 3,125 µM-400 µM doz aralıklarında Ergosterol uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi. n=6, veriler; % Canlılık ortalama $\pm$ standart sapma # veriler istatistiksel açıdan farklıdır, tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi Kontrol ve Ergosterol Deney grubu, * gruplar arası karşılaştırma *P $\leq$ 0.05; ** P $\leq$ 0.01; *** P $\leq$ 0.001, **** P $\leq$ 0.0001 (IC₅₀: 52,731 µM).



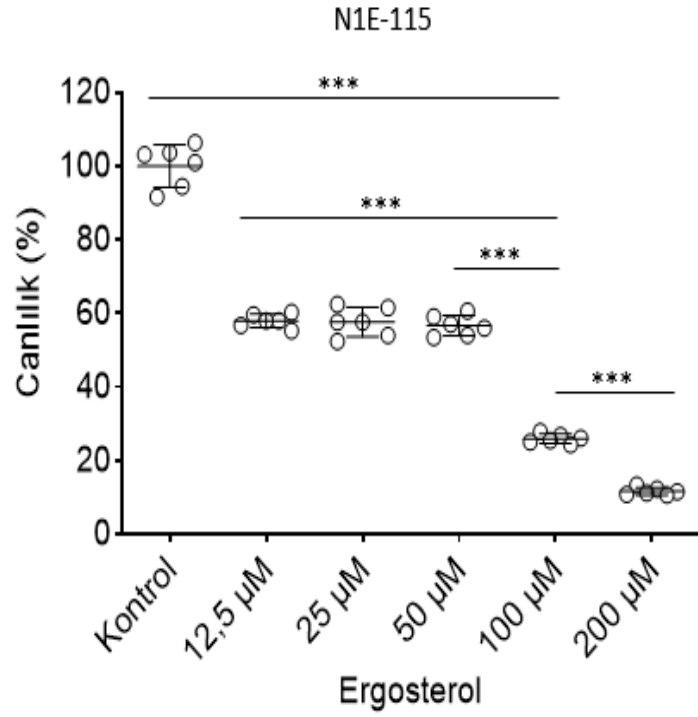
Şekil 4.20. C6 hücre serisi 3,125 µM-400 µM doz aralıklarında Ergosterol uygulamasına ait MTT test görüntüsü

Yapılan çalışmada 72 saat süre sonrasında melatonin uygulaması sonucu kontrolle kıyaslanarak belirlenen % ölüm oranları kullanılarak yapılan probit analizinde IC₅₀ değeri 52,731 μ M olarak belirlendi (Şekil 4.21.).

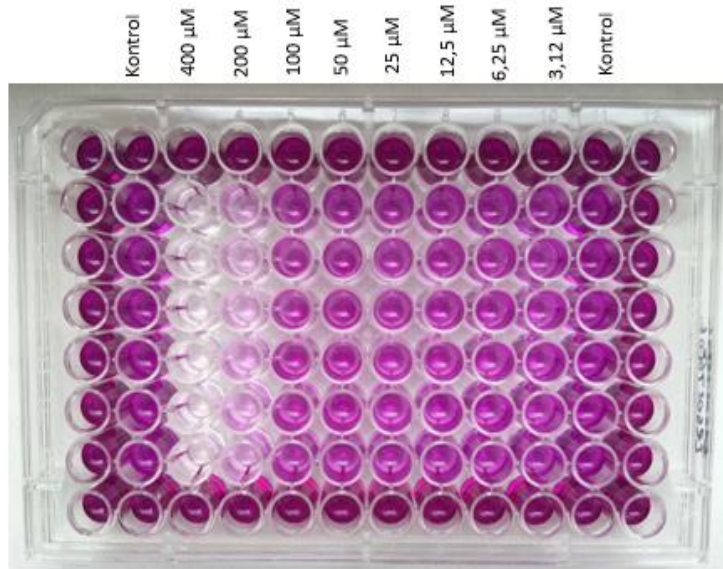


Şekil 4.21. C6 hücre serisinde 72 saat süre sonunda Ergosterol molekülünün MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri (F₇₂ Saat=372,511; sd=5-30; p<<0.0001)

Ergosterol'ün N1E-115 rat beyin kanser hücre serisinde canlılık üzerindeki etkisi MTT analizi ile değerlendirilerek elde edilen veriler Şekil 4.22.'de sunuldu. Yapılan denemede 96 kuyucuklu pleytlere metod kısmında belirtildiği şekilde ekilen hücrelere, Ergosterol 12.5-200 μ M doz aralıklarında 8 farklı konsantrasyonda uygulandı (Şekil 4.23.). N1E-115 hücre serisi üzerinde, Ergosterol 72 saat süre sonrasında hücre canlılığını istatistiksel açıdan anlamlı seviyede düşürdüğü belirlendi (F₇₂ Saat=537,667; sd=5-30; p<<0.0001) (Şekil 4.24.). Yapılan çalışmada kontrolle kıyaslanarak bulunan en yüksek canlı hücre oranı 12,5 μ M konsantrasyonda %57,9 $\pm$ 1,8 olarak belirlenirken, 200 μ M konsantrasyonda ise % 11,6 $\pm$ 1,0 olarak belirlendi.

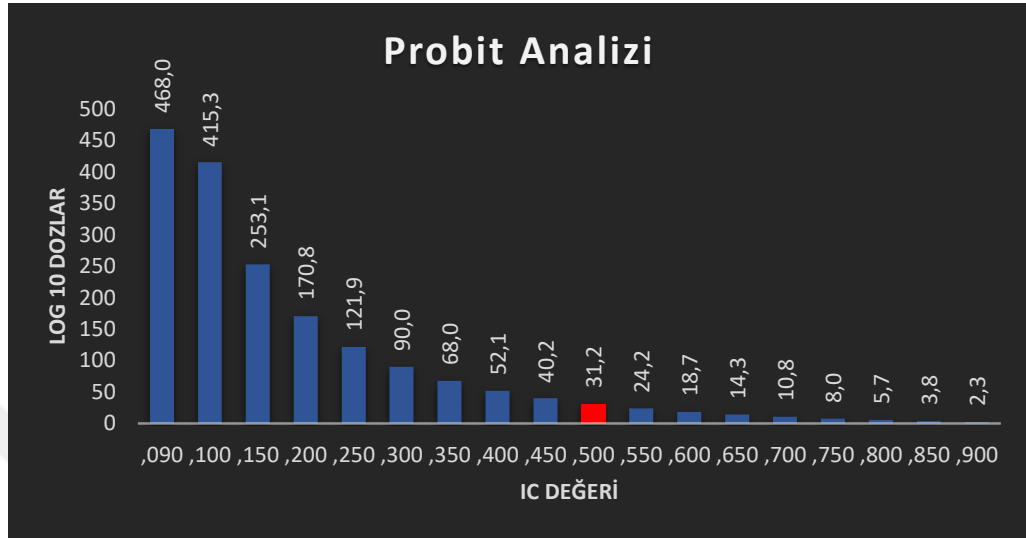


Şekil 4.22. N1E-115 hücre serisinde 72 saat süreyle 3,125 µM-400 µM doz aralıklarında Ergosterol uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi. n=6, veriler; % Canlılık ortalama $\pm$ standart sapma # veriler istatistiksel açıdan farklıdır, tek-yönlü ANOVA, Tukey HSD testi Kontrol ve Ergosterol Deney grubu, * gruplar arası karşılaştırma *P $\leq$ 0.05; ** P $\leq$ 0.01; *** P $\leq$ 0.001, **** P $\leq$ 0.0001 (IC₅₀: 31,208 µM).



Şekil 4.23. N1E-115 hücre serisi 3,125 µM-400 µM doz aralıklarında Ergosterol uygulamasına ait MTT test görüntüsü

Yapılan çalışmada 72 saat süre sonrasında melatonin uygulaması sonucu kontrolle kıyaslanarak belirlenen % ölüm oranları kullanılarak yapılan probit analizinde IC₅₀ değeri 31,208 µM olarak belirlendi (Şekil 4.24.).



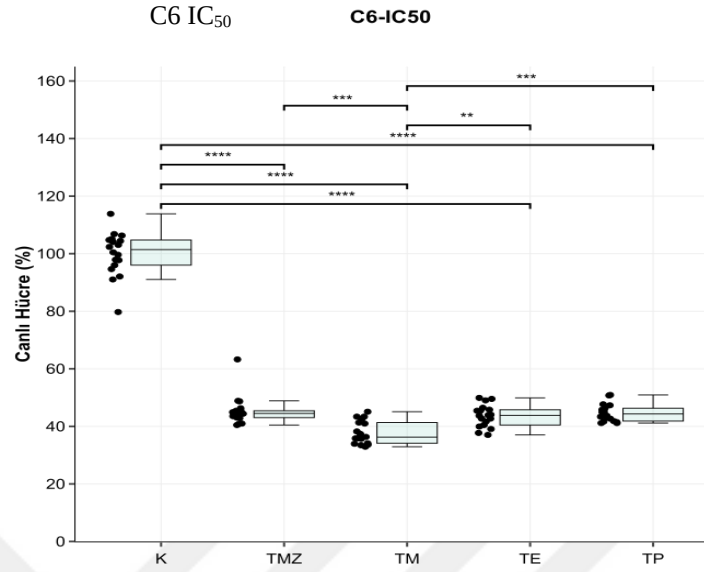
Şekil 4.24. Ergosterol molekülünün N1E-115 hücre serisi üzerinde 72 saat uygulama sonrasında MTT testi verileri kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri (F₇₂ Saat=537,667; sd=5-30; p<<0.0001).

4.2. Kombinasyon İlaç Uygulamaları

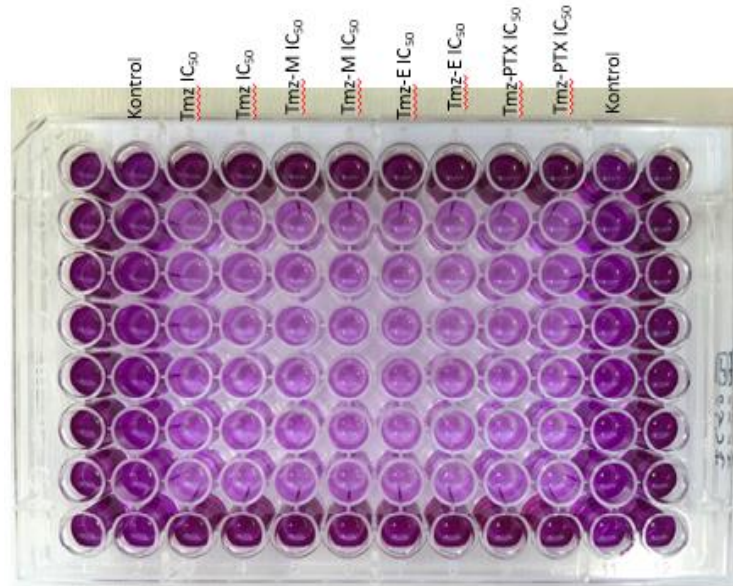
4.2.1. Temozolomid, Paklitaksel, Melatonin ve Ergosterol ile Oluşturulan Kombinasyon Tedavilerinin Kanser ve Sağlıklı Hücrelerde Etkinliği

Tez kapsamında her bir ajana ait IC₅₀ değerleri belirlenmiş ve bu değerler kullanılarak kombinasyon tedavileri oluşturulmuştur. Bu kapsamda hücreler 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarına ekilmiş ve sırasıyla TMZ IC₅₀- meatonin, ergostrol, paklitaksel IC₅₀ ve TMZ ½ IC₅₀ meatonin, ergostrol, paklitaksel IC₅₀ kombinasyonu C6, N1E-115 ve Astrosit hücre serilerinde 72 saat süreyle uygulanmıştır. Deneme 3 kez tekrar edilmiş ve toplamda 18 tekerrürlü çalışılmıştır. Bu süre sonunda MTT testi yapılmış ve çalışmaya ait bulgular Şekil 4.26.'de sunulmuştur.

4.2.1.1. C6 Hücre Hattına Temozolomid IC₅₀ Dozu Uygulanması

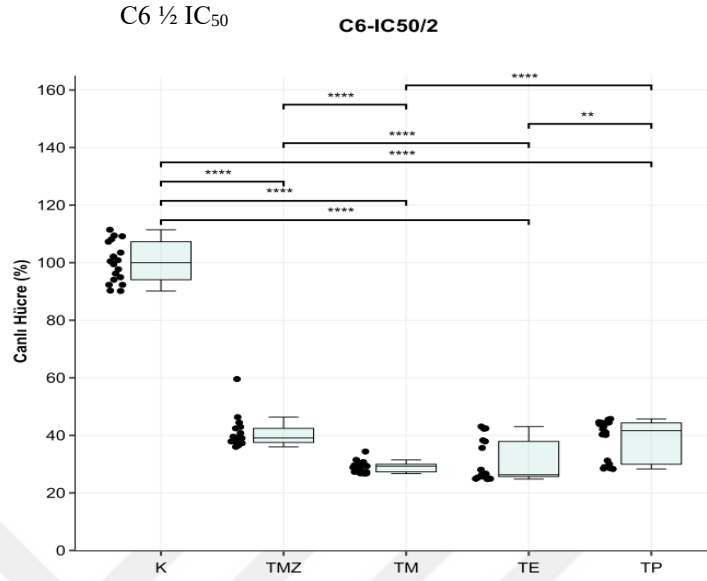


Şekil 4.25. C6 Hücre serisi Temozolomid IC₅₀ ve kombinasyon uygulamaları. Glioma C6 hücre serisinde 72 saat süre ile Temozolomid ve Temozolomid kombinasyonları uygulaması sonrasında MTT testi ile belirlenen % canlı hücre oranları. K: taşıt kontrol: Temozolomid: TMZ, 1732,101 μ M; TM: Temozolomid+Melatonin, 1732,101+3691,235 μ M; TE: Temozolomid+Ergosterol, 1732,101+52,731 μ M; TP: Temozolomid+Paklitaksel, 1730+0.006305 μ M. Veriler ortalama+Standart hata, n:18, * Veriler istatistiksel açıdan farklıdır, Tek-Yönlü ANOVA, Tukey, HSD test, $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ (TMZ: Temozolomid)

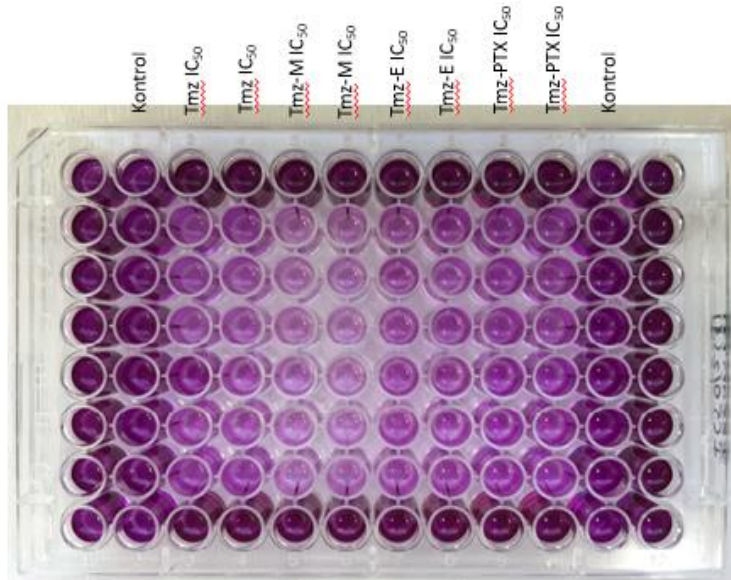


Şekil 4.26. C6 Hücre serisi Temozolomid IC₅₀ ve kombinasyon uygulamalarına ait MTT testi görüntüsü. TMZ:Temozolomid, M: Melatonin, E: Ergosterol, PTX: Paklitaksel

4.2.1.2. C6 Hücre Hattına Temozolomid ½ IC₅₀ Dozu Uygulanması



Şekil 4.27. Glioma C6 hücre serisinde 72 saat süre ile ½ IC₅₀ Temozolomid ve Temozolomid kombinasyonları uygulaması sonrasında MTT testi ile belirlenen % canlı hücre oranları. K: taşıt kontrol. TMZ: Temozolomid, 866,05 µM; TM: TMZ+Melatonin, 866,05+1845,61 µM; TE: TMZ+Ergosterol, 866,05+26,365 µM; TP: TMZ+Paklitaksel, 866,05+0.00315 µM. Veriler ortalama+Standart hata, n:18, * Veriler istatistiksel açıdan farklıdır, Tek-Yönlü ANOVA, Tukey, HSD test, P≤0.05, ** P≤0.01, *** P≤0.001, **** P≤0.0001

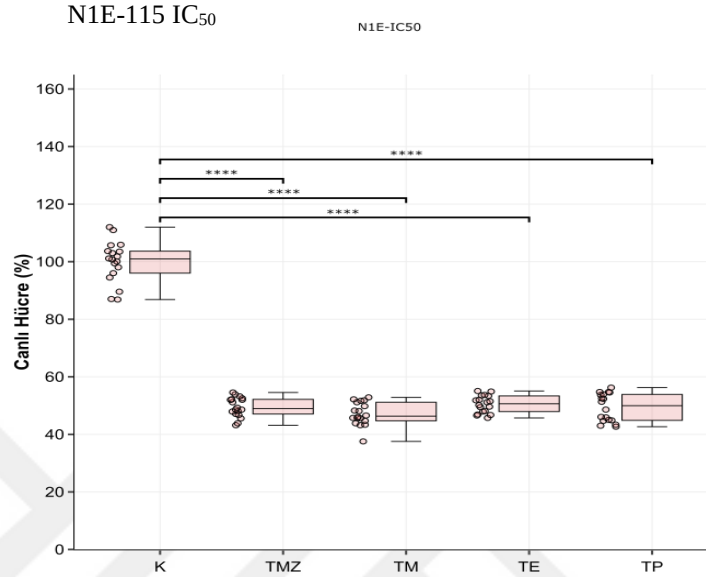


Şekil 4.28. C6 Hücre serisi Temozolomid ½ IC₅₀ ve kombinasyon uygulamalarına ait MTT testi görüntüsü. TMZ: Temozolomid, M: Melatonin, E: Ergosterol, PTX: Paklitaksel

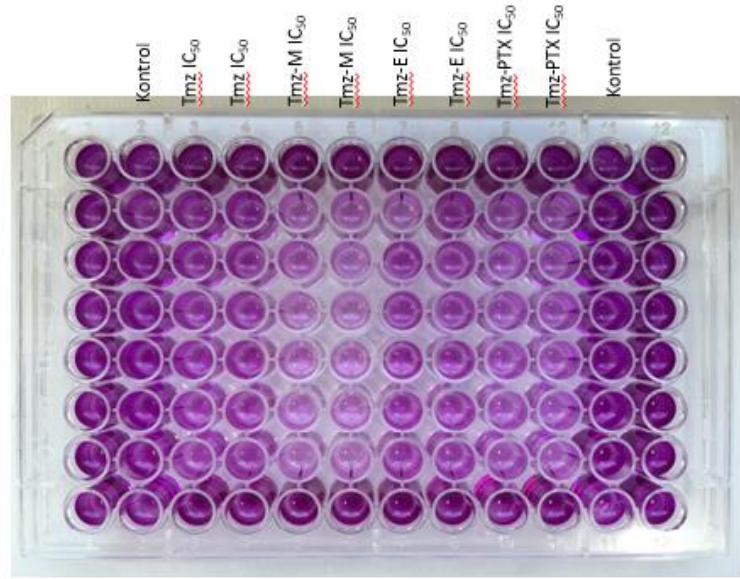
Yapılan çalışmada glioma C6 hücre serisinde IC_{50} dozlarında TMZ uygulaması sonucunda hücre canlılığı $\% 45.3 \pm 1.1$ olarak belirlenmiş, $IC_{50}:IC_{50}$ kombinasyonlarında TE ve TP uygulamalarında ise hücre canlılığı sırasıyla $\% 43.5 \pm 0.9$ ve $\% 44.6 \pm 0.7$ olmuştur. TMZ ve TMZ ile birlikte uygulanan IC_{50} dozlarında ergesterol ve paklitaksel istatistik olarak anlamlı seviyede bir etki oluşturmamış ve ölüm oranı TMZ ile aynı grupta yer almıştır. Ancak TM $IC_{50}:IC_{50}$ doz kombinasyonu hücre canlılığını hem kontrol hemde TMZ tek başına uygulanan gruplara kıyasla istatistik olarak anlamlı seviyede düşürmüş ve en düşük hücre canlılığı $\% 37.7 \pm 0.9$ ile bu kombinasyonda belirlenmiştir (Şekil 4.29). Tez kapsamında sinerjistik etki analizi yapabilmek için deneyler aynı zamanda TMZ için belirlenen IC_{50} dozunun yarısı kullanılarak tekrar edilmiştir. Yapılan çalışmada TMZ $\frac{1}{2}$ IC_{50} dozuyla kombine edilen paklitaksel (IC_{50} dozu) tek başına uygulanan TMZ ile istatistik olarak hücre canlılığı açısından bir fark oluşturmamıştır. Ancak hem ergesterol hem de melatoninle birlikte TMZ uygulanan gruplarda uygulamadan 72 saat sonra TMZ ve TP gruplarına kıyasla hücre canlılığı istatistik olarak anlamlı seviyede azalmış melatonin kombinasyonunda $\% 29.1 \pm 0.4$, Ergesterol kombinasyonunda $\% 30.5 \pm 1.6$ olarak belirlenmiştir. Yarım doz TMZ ile yapılan MTT deneyi melatonin ve ergesterol'un TMZ ile glioma C6 hücre serilerinde sinerjistik bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Nöroblastoma N1E hücre serisinde ise IC_{50} dozlarında tek başına TMZ uygulaması ve aynı zamanda TMZ kombinasyonları hücre canlılığını taşıt uygulanan kontrole kıyasla tüm uygulama gruplarında istatistik olarak anlamlı seviyede düşürmüştür.

N1E-115 Hücre Hattına IC₅₀ VE ½ IC₅₀ Dozlarının Uygulanması

4.2.1.3. Temozolomid IC₅₀ Dozu



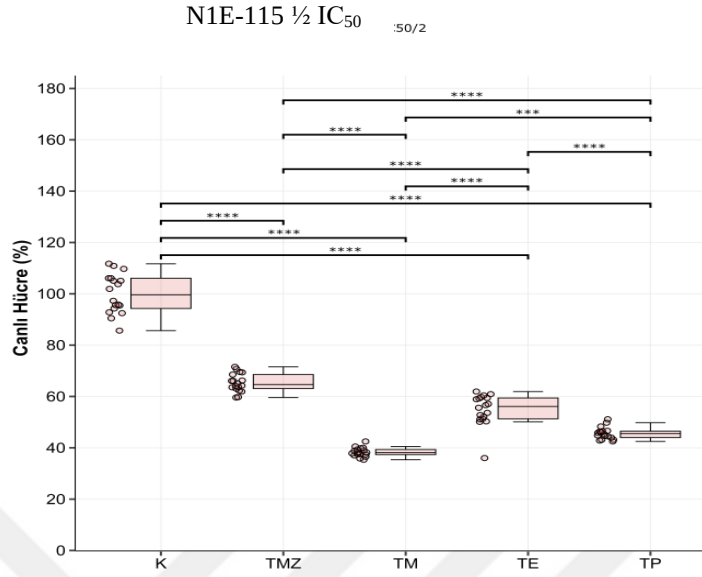
Şekil 4.29. Nöroblastoma N1E-115 hücre serisinde 72 saat süre ile Temozolomid ve Temozolomid kombinasyonları uygulaması sonrasında MTT testi ile belirlenen % canlı hücre oranları. K: taşıt kontrol: TMZ: Temozolomid, 1738,404 μ M; TM: TMZ+Melatonin, 1738,404 +2571,413 μ M; TE: TMZ+Ergosterol, 1738,404+31,208 μ M; TP: TMZ+Paklitaksel, 1738,404+0.008674 μ M. Veriler ortalama+Standart hata, n:18, * Veriler istatistiksel açıdan farklıdır, Tek-Yönlü ANOVA, Tukey, HSD test, $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P < 0.0001$



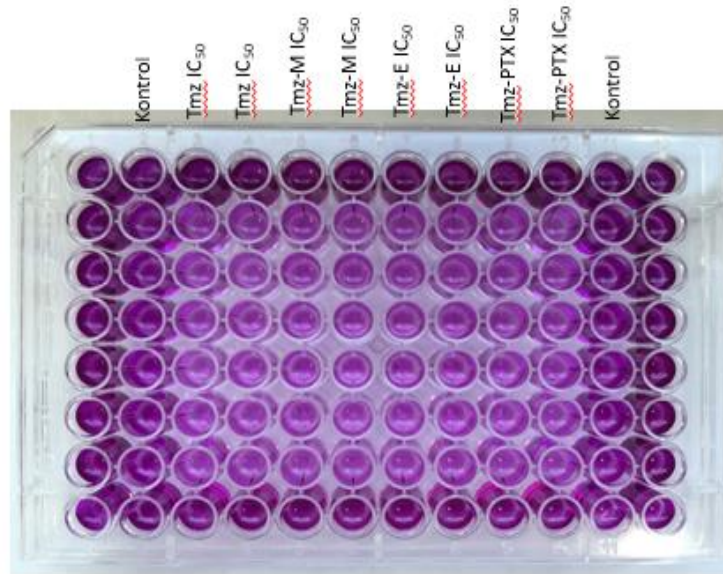
Şekil 4.30. N1E-115 Hücre serisi TMZ IC₅₀ ve kombinasyon uygulamalarına ait MTT testi görüntüsü. TMZ: TMZ, M: Melatonin, E: Ergosterol, PTX: Paklitaksel

Ancak bu dozlarda tek başına IC₅₀ dozunda TMZ ve IC₅₀:IC₅₀ TMZ-MLT, TMZ-ERG, TMZ-PTX uygulamaları sonrasında hücre canlılıkları sırasıyla % 49.4±0.8, % 47.1±0.9, % 50.4±0.7 ve % 49.3±1.1 olarak belirlenmiş ve uygulama grupları arasında istatistik olarak anlamlı bir fark oluşmamıştır. Nöroblastoma hücre serisinde TMZ için belirlenen IC₅₀ dozun yarısı uygulandığında, uygulamadan 72 saat sonra % 65.2 ±0.8 canlı hücre belirlenmiş, ½ IC₅₀ TMZ ile IC₅₀ melatonin, ergesterol ve paklitaksel uygulamalarında canlı hücre oranları sırasıyla % 38.3±0.4, %54.8±1.4 ve % 45.6±0.5 olarak tespit edilmiştir. (Şekil 4.31).

4.2.1.4. Temozolomid ½ IC₅₀



Şekil 4.31. Nöroblastoma N1E-115 hücre serisinde 72 saat süre ile Temozolomid ve Temozolomide kombinasyonları uygulaması sonrasında MTT testi ile belirlenen % canlı hücre oranları. K: taşıt kontrol: TMZ: Temozolomid, 869,202; TM: TMZ+Melatonin, 869,202+1285,706 μ M; TE: TMZ+Ergosterol, 869,202+15,604 μ M; TP: TMZ+Paklitaksel, 869,202+0.00433 μ M. Veriler ortalama+Standart hata, n:18, * Veriler istatistiksel açıdan farklıdır, Tek-Yönlü ANOVA, Tukey, HSD test, $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$

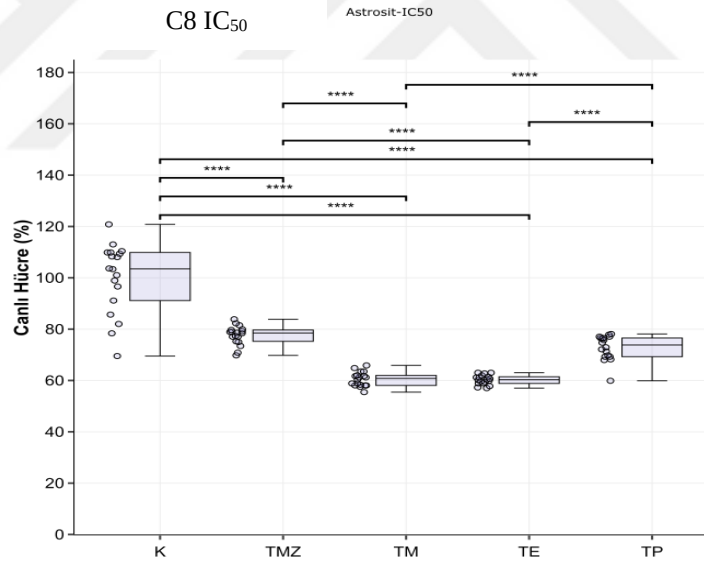


Şekil 4.32. N1E-115 Hücre serisi Temozolomid ½ IC₅₀ ve kombinasyon uygulamalarına ait MTT testi görüntüsü. Temozolomid: TMZ, M: Melatonin, E: Ergosterol, PTX: Paklitaksel

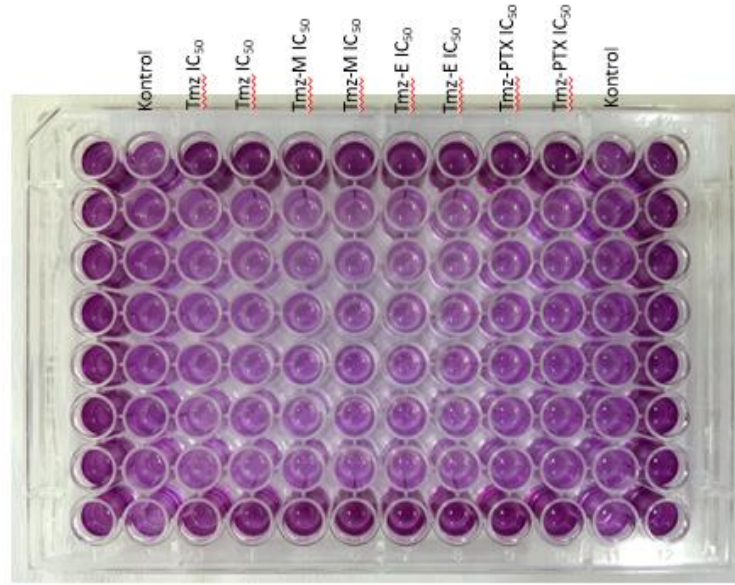
Sonuçlar özellikle melatonin ve ergosterol uygulamalarının TMZ ile güçlü bir sinerjistik etki oluşturduğunu, her iki ajanın N1E-115 nöroblastoma hücre serilerinde tedavi için gerekli TMZ dozunu yarı yarıya düşürebildiğini göstermektedir. Özellikle melatonin uygulanan gruplarda IC₅₀:IC₅₀ TMZ-MLT uygulanan gruplardan anlamlı seviyede daha düşük hücre canlılığı belirlenmesi ve bu canlılığın diğer tüm uygulama grupları ve aynı zamanda taşıt kontrol grubundan istatistik olarak anlamlı seviyede düşük olması Melatoninin nöroblastoma hücre serilerinde TMZ kombinasyonu için kullanılan ajanlar arasında en uygun ajan olduğunu düşündürmektedir.

Tez kapsamında TMZ ve TMZ ile birlikte melatonin, ergosterol ve paklitaksel tedavilerinin sağlıklı hücreler üzerindeki etkisi Astrosit hücrelerinde belirlenmiştir.

4.2.1.5. Astrosit Temozolomid IC₅₀



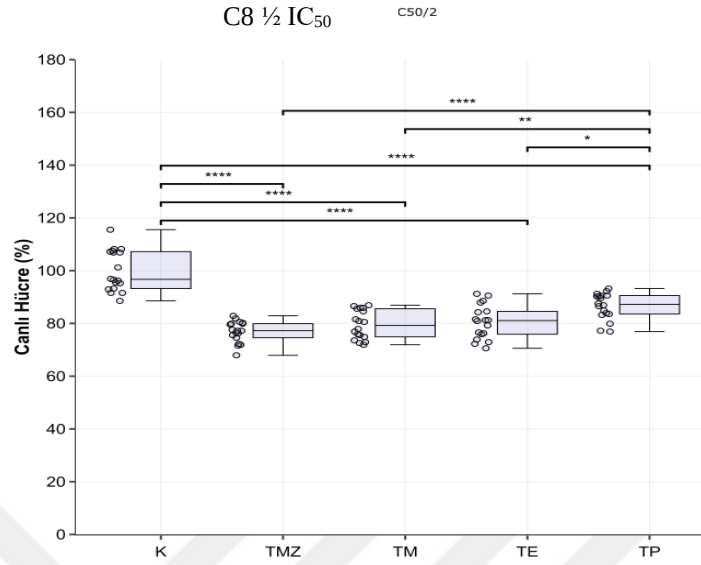
Şekil 4.33. Astrosit C8 hücre serisinde 72 saat süre ile Temozolomid ve Temozolomid kombinasyonları uygulaması sonrasında MTT testi ile belirlenen % canlı hücre oranları. K: taşıt kontrol: TMZ: Temozolomid, 1738,404µM; TM: TMZ+Melatonin, 1738,404+2571,413 µM; TE: TMZ+Ergosterol, 1738,404+52,731µM; TP:TMZ+Paklitaksel,1730+0.0086µM. Veriler ortalama+Standart hata, n:18, * Veriler istatistiksel açıdan farklıdır, Tek-Yönlü ANOVA, Tukey, HSD test, P≤0.05, ** P≤0.01, *** P≤0.001, **** P≤0.0001



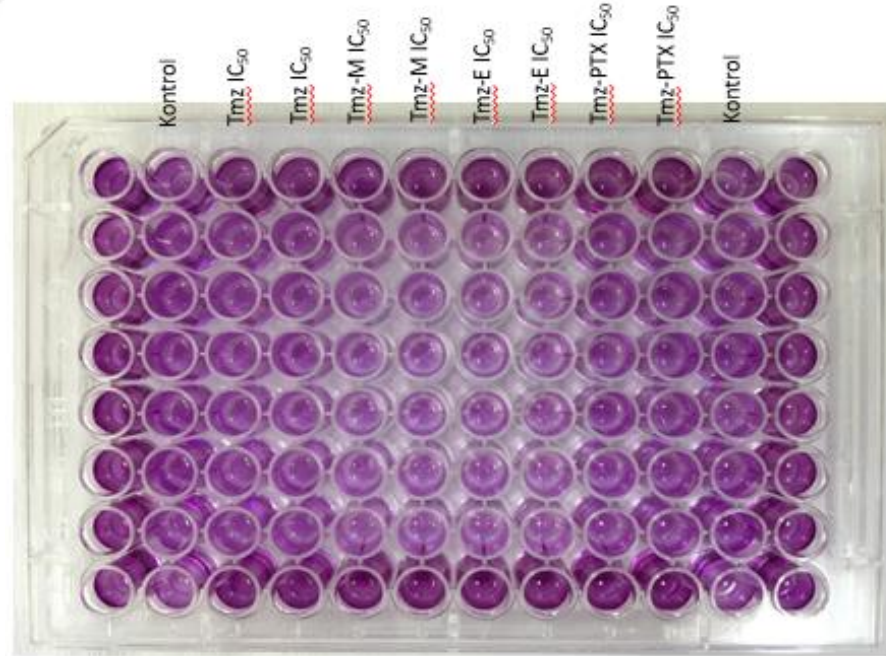
Şekil 4.34. Astrosit C8 Hücre serisi TMZ IC₅₀ ve kombinasyon uygulamalarına ait MTT testi görüntüsü. TMZ: Temozolomid, M: Melatonin, E: Ergosterol, PTX: Paklitaksel

Yapılan çalışmada Astrosit hücre serilerinde IC₅₀ dozunda TMZ uygulamasından 72 saat sonra hücre canlılığı taşıt uygulanan kontrol hücrelerine kıyasla % 77.6 ± 0.8 seviyesine düşmüştür. Sağlıklı hücreler üzerinde IC₅₀:IC₅₀ kombinasyonlarında en düşük ölüm etkisi TMZ-PTX uygulanan grupta % 72.8 ± 1.1 hücre canlılık oranıyla belirlenmiştir. TMZ-MLT ve TMZ-PTX gruplarında ise hücre canlılığı hem TMZ hemde TMZ-PTX gruplarına kıyasla istatistik olarak anlamlı seviyede azalmış ve sırasıyla % 60.5 ± 0.6 ve % 60.2 ± 0.4 olarak saptanmıştır. Her iki oran da sağlıklı hücreler için potansiyel bir risk olarak değerlendirilmiştir. Ancak kullanılan TMZ dozu yarı yarıya düşürüldüğünde sağlıklı hücreler üzerindeki ölüm baskısının anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür (Şekil 4.35.).

4.2.1.6. Temozolomid $\frac{1}{2}$ IC₅₀



Şekil 4.35. Astrosit C8 hücre serisinde 72 saat süre ile Temozolomid ve Temozolomid kombinasyonları uygulaması sonrasında MTT testi ile belirlenen % canlı hücre oranları. K: taşıt kontrol: TMZ: Temozolomid, 869,202 μ M; TM: TMZ+Melatonin, 869,202+1285,706 μ M; TE:



Şekil 4.36. C8 Hücre serisi Temozolomid $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ve kombinasyon uygulamalarına ait MTT testi görüntüsü. TMZ: Temozolomid, M: Melatonin, E: Ergosterol, PTX: Paklitaksel

Yapılan çalışmada 72 saat süre ile $\frac{1}{2}$ IC₅₀ dozunda TMZ uygulanan Astrosit hücrelerinde % 76.8 $\pm$ 0.9 hücre canlılığı saptanmıştır. $\frac{1}{2}$ IC₅₀ dozunda TMZ ile kombine edilen IC₅₀ dozlarında melatonin, ergosterol ve paklitaksel TMZ'ye kıyasla hücrelere daha az toksik olmuş ve 72 saatlik uygulamalar sonrasında hücre canlılığı sırasıyla % 79.4 $\pm$ 1.2, % 80.5 $\pm$ 1.5, % 86.5 $\pm$ 1.1 olarak belirlenmiştir. Çalışma bulgularımız, özellikle $\frac{1}{2}$ IC₅₀ TMZ ile melatonin, ergosterol ve paklitaksel kombinasyonlarının sağlıklı hücrelerde ölüm etkisinin kabul edilebilir seviyelerde olduğunu göstermiş, ve özellikle kanser hücrelerinde başarılı bir şekilde oluşan ölüm etkisi göz önüne alındığında, özellikle $\frac{1}{2}$ IC₅₀ TMZ+ IC₅₀+Melatonin kombinasyonunun, tedavide tek başına TMZ ve TMZ-ERG ve TMZ-PTX tedavilerine kıyasla daha etkili ve sağlıklı hücreler üzerinde ölüm etkisi daha düşük bir tedavi olabileceği düşünülmüştür.

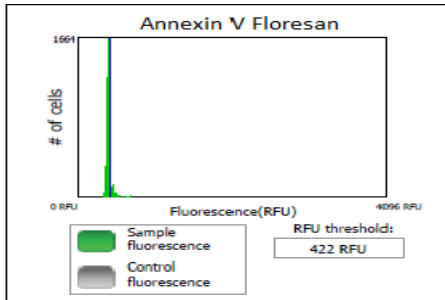
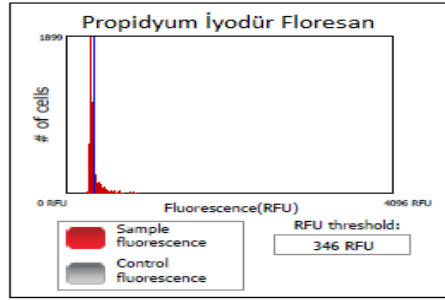
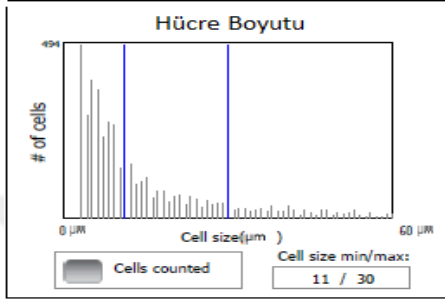
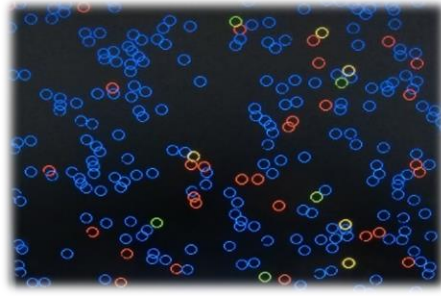
4.3. TALİ Görüntü Tabanlı Sitometri Analizi

4.3.1. Temozolomid'in Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

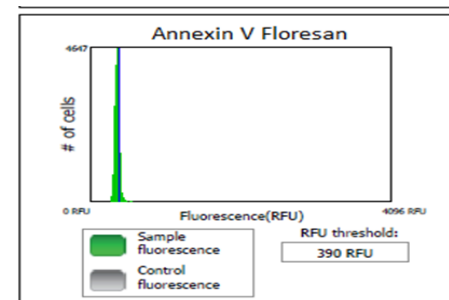
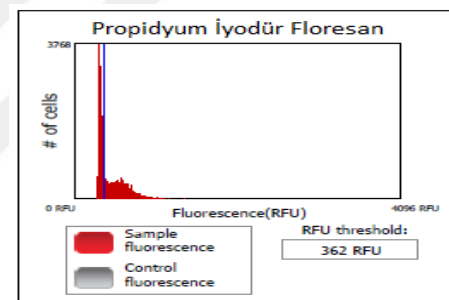
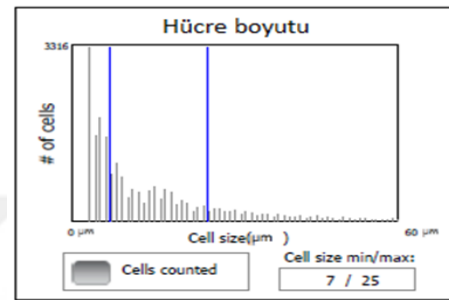
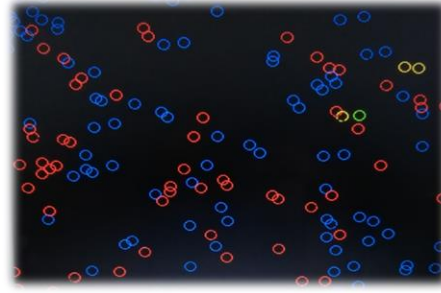
TMZ'in C6 ve N1E-115 hücre hatları üzerine apoptotik etkisini incelemek için, MTT analizi sonucu belirlenen TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀-Paklitaksel IC₅₀, TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀-Melatonin IC₅₀, TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀-Ergosterol IC₅₀ uygulaması yapıldı ve 72 saat süre sonundaki değerlendirmede, C6 hücre serisinde, PI ve Anneksin V-PI ölü ve geç apoptotik hücrelerde sırasıyla 2.2 $\pm$ 2.4 1.4 $\pm$ 3.6 ve 1.5 $\pm$ 5.5 kat artış görülürken (F_{72 Saat}=6,536; sd=3-20; p<0.003) Anneksin V pozitif apoptotik hücrelerde sırasıyla, 1.2 $\pm$ 2.6, 3.4 $\pm$ 4.1 ve 3,3 $\pm$ 5.3 kat oranında (F_{72 Saat}=3,310; sd=3-20; p<0.041) artış tespit edildi (Şekil 4.36.). TMZ-MLT ve TMZ-ERG uygulama gruplarının C6 hücre hattına olan apoptotik etkisi incelendiğinde, istatistiksel olarak TP grubuna kıyasla bu hücrelerde daha fazla apoptotik ölüm belirlendi. TM grubunda anlamlı seviyede en yüksek artış tespit edildi.

TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ve Paklitaksel IC₅₀, TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ve Melatonin IC₅₀, TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ve Ergosterol IC₅₀ uygulanan gruplar için, hücre görüntüleri, hücre boyutu ve Annexin V, Propidyum İyodid (PI) floresan yoğunluğu histogramları C6 hücre serisi için Şekil 4.37. ve 4.38.'de sunuldu.

a)

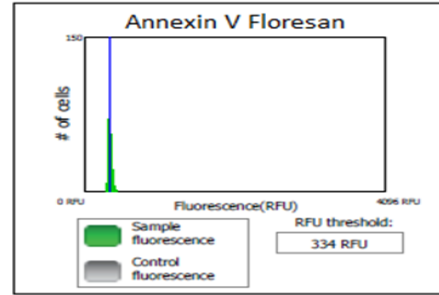
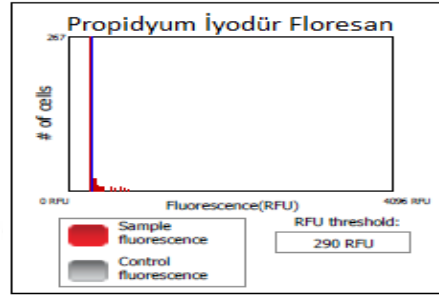
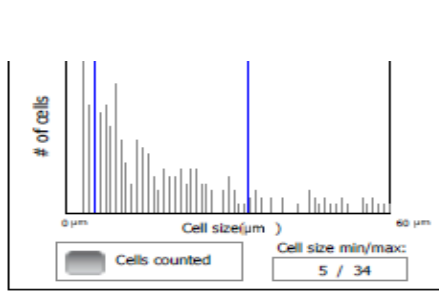
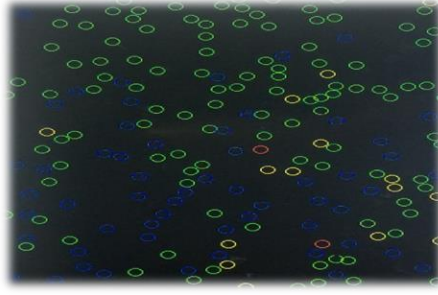


b)

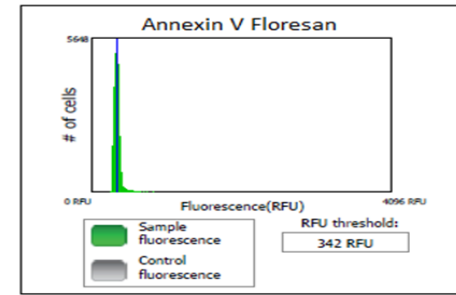
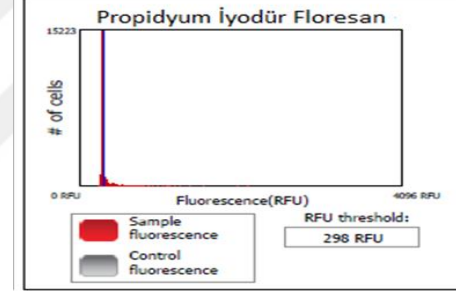
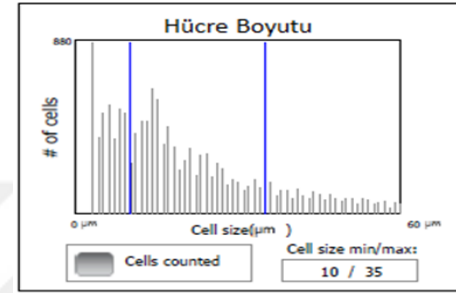
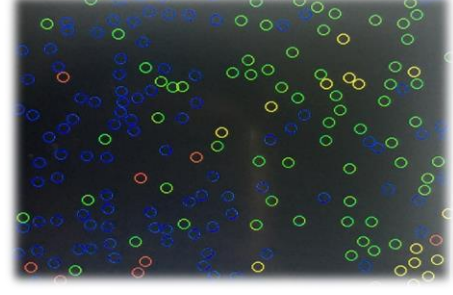


Şekil 4.37. C6 hücre serisi TALİ sitometre canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri Annexin V ve Propidyum İyodid (PI) floresan yoğunluğu ve hücre boyutu histogramları
a) C6 Kontrol b) C6 Temozolomid-Paklitaksel IC₅₀

c)

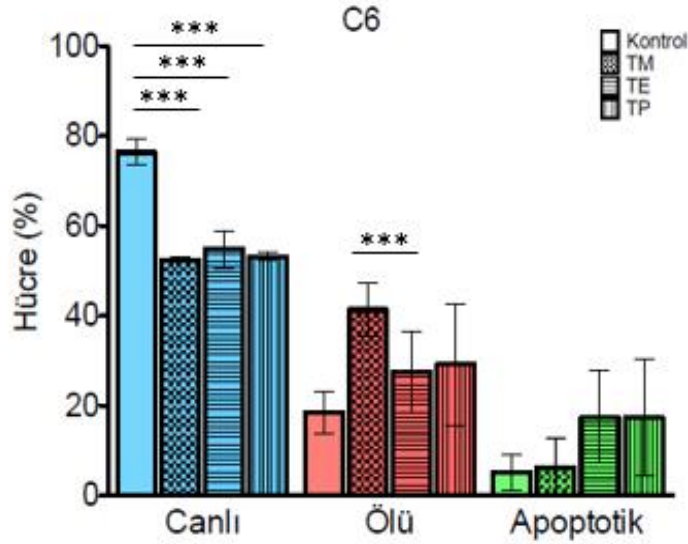


d)



Şekil 4.38. N1E-115 hücre serisi TALİ sitometre canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri. Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu ve hücre boyutu histogramları c) C6 Temozolomid-Melatonin IC₅₀ d) C6 Temozolomid-Ergosterol IC₅₀

C6 hücre serisi üzerinde, Tali görüntü tabanlı sitometri kullanılarak Annexin V/Propidyum İyodid ile boyandıktan sonra saptanan canlı hücrelerin yüzdesi Şekil 4.39.'da sunulmuştur.



Şekil 4.39. C6 hücre serisinde, Tali görüntü tabanlı sitometri kullanılarak Annexin V/Propidyum İyodid ile boyanarak saptanan canlı hücrelerin yüzdesi. Veriler % Canlılık ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur, * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$ N = 3; Anova-Tukey HSD Test $p \leq 0.05$ (TMZ:Temozolomid TM:Temozolomid-Melatonin, TE: Temozolomid-Ergosterol, TP:Temozolomid-Paklitaksel)

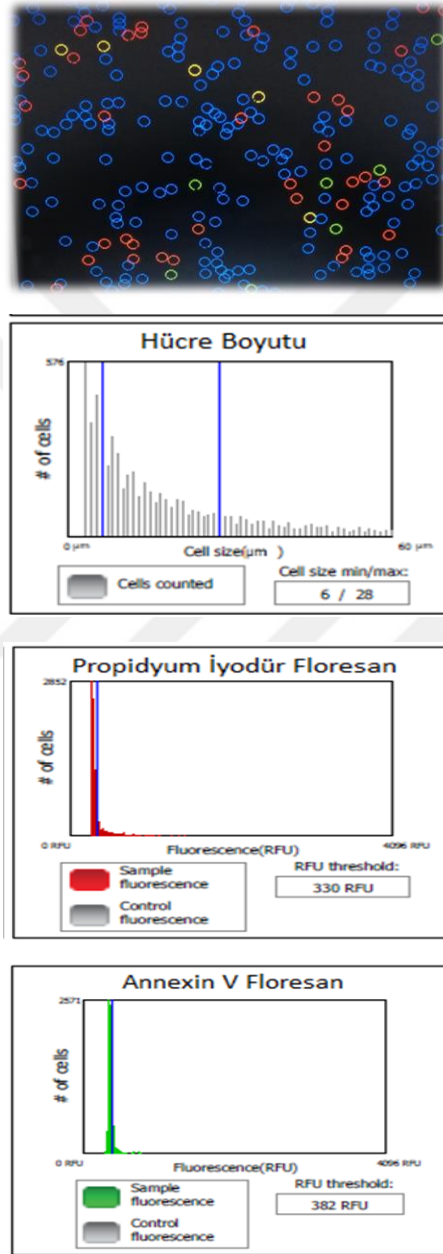
C6 hücre serisinde 72 saat süreyle TMZ-Paklitaksel, TMZ-Melatonin, TMZ-Ergosterol molekül uygulamaları sonucunda TALİ sitometre kullanılarak belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları ve yüzdeleri Çizelge 4.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. C6 hücre serisinde 72 saat süreyle Temozolomid-Paklitaksel, Temozolomid-Melatonin, Temozolomid-Ergosterol uygulaması sonucunda TALİ sitometre ile belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları ve yüzdeleri.

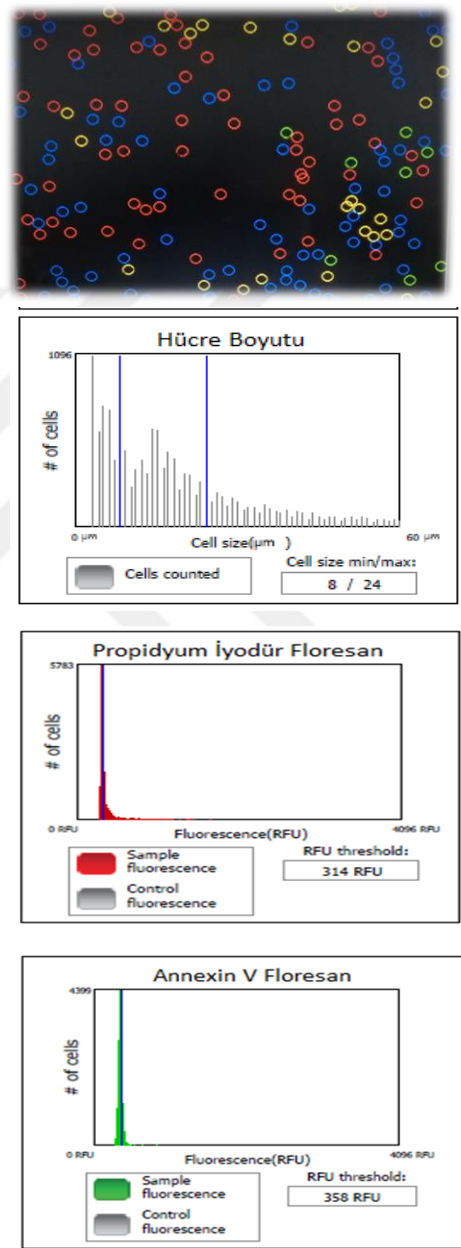
	KONTROL	TM	TE	TP
Canlı (%)	76,3±1,1 ^b	54,8±1,6 ^a	53,1±0,4 ^a	52,5±0,2 ^a
Ölü (%)	18,5±1,9 ^a	27,5±3,6 ^{ab}	29,1±5,5 ^{ab}	41,3±2,4 ^b
Apoptotik (%)	5,1±1,5 ^a	17,5±4,1 ^a	17,3±5,3 ^a	6,3±2,6 ^a

TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ve Paklitaksel IC₅₀, TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ve Melatonin IC₅₀, TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ve Ergosterol IC₅₀ uygulanan gruplar için, hücre görüntüleri, hücre boyutu ve Annexin V, Propidyum İyodid (PI) floresan yoğunluğu histogramları N1E-115 hücre serisi için Şekil 4.40. ve 4.41.'de sunuldu.

a)

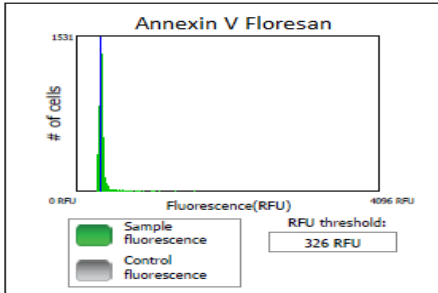
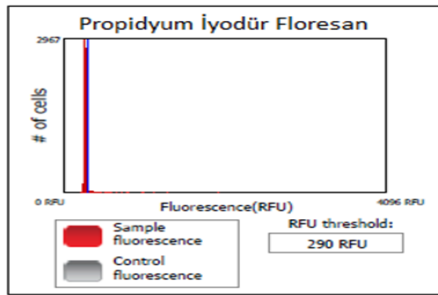
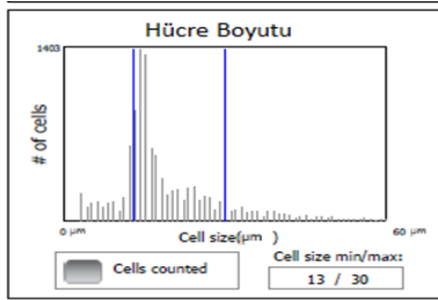
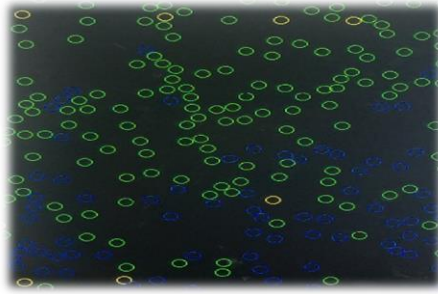


b)

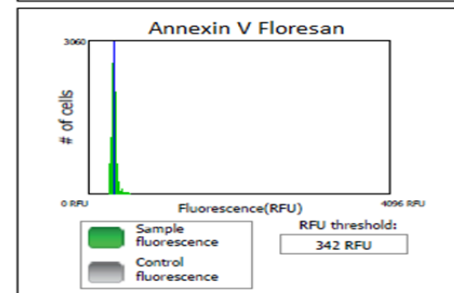
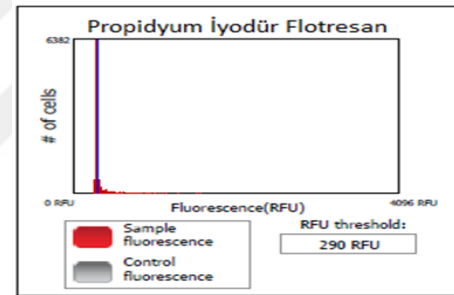
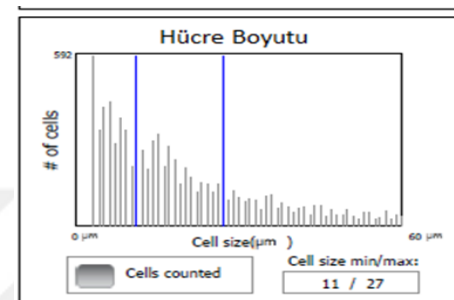
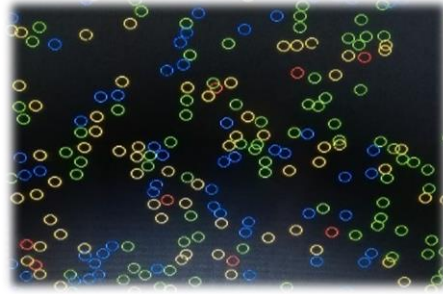


Şekil 4.40. TALİ sitometre canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri. Annexin V ve Propidyum İyodid (PI) floresan yoğunluğu ve hücre boyutu histogramları a) N1E-115 Kontrol b) N1E-115 Temozolomid-Paklitaksel IC₅₀

c)



d)

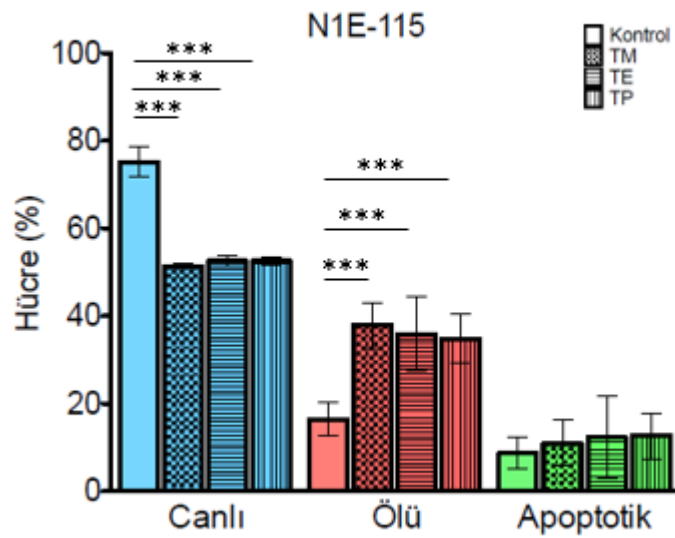


Şekil 4.41. TALİ sitometre canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri. Annexin V ve Propidyum İyodid (PI) floresan yoğunluğu ve hücre boyutu histogramları c) N1E-115 Temozolomid-Melatonin d) N1E-115 Temozolomid-Ergosterol IC₅₀

TMZ'in N1E-115 hücre hatları üzerine apoptotik etkisini incelemek için, yapılan değerlendirmede, PI ve Anneksin V-PI ölü ve geç apoptotik hücrelerde sırasıyla 2.3 ± 2.1 2.1 ± 3.7 ve 2.1 ± 2.3 kat artış görülürken (F_{72} Saat=24,939; sd=3-20; $p < 0.0001$) Anneksin V pozitif apoptotik hücrelerde sırasıyla, 1.2 ± 2.1 , 1.4 ± 3.4 ve 1.9 ± 2.1 kat oranında (F_{72}

$s_{aat}=27,23$; $sd=3-20$; $p<<0.0001$) artış tespit edildi (Şekil 4.42.). TMZ-Melatonin ve TMZ-Ergosterol uygulama gruplarının N1E-115 hücre hattına olan apoptotik etkisi incelendiğinde, istatistiksel olarak TMZ-Paklitaksel grubuna kıyasla bu hücrelerde daha fazla apoptotik ölüm belirlendi. TMZ-Melatonin grubunda anlamlı seviyede en yüksek artış tespit edildi.

Kullanılan kemoterapi ajanı ve teropötik maddelerinin C6 ve N1E-115 hücre serilerinde önemli bir bölümünün apoptoz kaynaklı ölüme sebep olduğu belirlendi. Apoptoz % oranları ile kullanılan IC_{50} konsantrasyonlarının paralel olduğu görüldü. C6 ve N1E-115 Hücre serilerine 72 saat süreyle uygulanan TMZ-Melatonin IC_{50} ve TMZ Ergosterol IC_{50} dozları, TMZ-Paklitaksel IC_{50} ve kontrol grubu ile kıyaslandığında hücreleri anlamlı seviyede apoptoza götürdüğü tespit edildi. (F_{72} Saat=24,939; $sd=3-20$; $p<0.0001$, F_{72} Saat=27,23; $sd=3-20$; $p<0.0001$)



Şekil 4.42. N1E-115 hücre serisi üzerinde, Tali görüntü tabanlı sitometri kullanılarak Annexin V/Propidyum İyodid ile boyanarak saptanan canlı hücrelerin yüzdesi. Veriler % Canlılık ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur, * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$ N = 3; Anova- Tukey HSD Test $p \leq 0.05$ (TMZ:Temozolomid TM:Temozolomid-Melatonin, TE: Temozolomid-Ergosterol, TP:Temozolomid-Paklitaksel)

N1E-115 hücre serisinde 72 saat süreyle TMZ-Paklitaksel, TMZ-Melatonin, TMZ-Ergosterol molekül uygulamaları sonucunda TALİ sitometre ile belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları ve yüzdelere Çizelge 4.2.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. N1E-115 hücre serisinde 72 saat süreyle Temozolomid-Paklitaksel, Temozolomid-Melatonin, Temozolomid-Ergosterol uygulaması sonucunda TALİ sitometre ile belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları ve yüzdelere.

	KONTROL	TM	TE	TP
Canlı (%)	75.1±1.4 ^b	52.5±0.5 ^a	52.5±0.3 ^a	51.3±0.2 ^a
Ölü(%)	16.3±1.5 ^a	35.8±3.4 ^a	34.8±2.3 ^b	37.8±2.1 ^b
Apoptotik(%)	8.6±1.4 ^a	12.3±3.7 ^b	12.6±2.1 ^a	11.0±2.1 ^a

Sonuç olarak, çalışılan tüm gruplarda canlı, ölü ve apoptotik hücre oranları belirlendi. Kullanılan IC₅₀ dozlarının hücreler üzerinde, ölüm şeklinin apoptoz kaynaklı olup olmadığını belirlemek amacı ile yaptığımız TALİ sitometri analizi sonucunda, hücreler üzerinde apoptoza en fazla neden olan uygulama grubunun her iki hücre serisinde de, TMZ-Melatonin IC₅₀ uygulama grubu olduğu tespit edildi.

4.4. İlaç Kombinasyon Uygulamalarının Hücre Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkisi

4.4.1. İlaç Kombinasyon Uygulamasının C6 Hücre Serisine Etkisi

C6 hücre serisinde, kontrol ve deney gruplarında tez kapsamında çalışılan, antioksidan, dna tamir, ısı şok, hücre döngüsü kontrolü, yaşam sinyal ve apoptoz yolağı genlerinin göreceli kat değişimi qrt-pcr analizi ile belirlendi, veriler Çizelge 4.3.'de sunuldu.

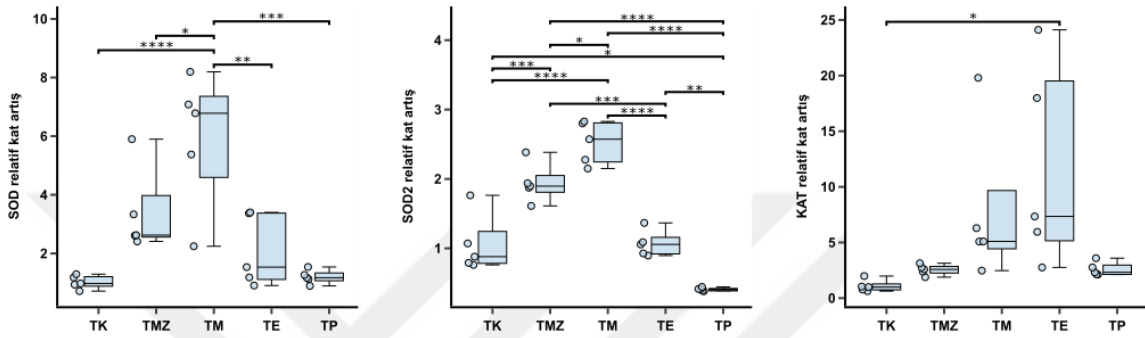
Çizelge 4.3. C6 hücre serisinde, Kontrol ve deney gruplarında Antioksidan, DNA Tamir, Isı Şok, Hücre Döngüsü Kontrolü, Yaşam Sinyal ve Apoptoz yolları genlerinin göreceli kat değişimi qRT-PCR analizi(TMZ: Temozolomid, TM: TMZ-Melatonin, TE:TMZ-Ergosterol

Gene ID	Kontrol	TMZ		TM		TE		TP		P
Antioksidan										
SOD1	1.02±0.22 ^a	3.37±1.45 ^a	▲	5.93±2.29 ^b	▲	2.07±1.21 ^a	▲	1.20±0.23 ^a	▶	<0.0001
SOD2	1.05±0.41 ^b	1.94±0.27 ^c	▲	2.52±0.30 ^d	▲	1.06±0.18 ^b	▶	0.40±0.02 ^a	▼	<0.0001
KAT	1.08±0.52 ^a	2.54±0.46 ^{ab}	▲	7.75±6.87 ^{ab}	▲	11.63±9.02 ^b	▲	2.58±0.61 ^{ab}	▲	0.019
DNA Tamir										
MLH1	1.08±0.44 ^a	1.89±0.27 ^a	▲	10.37±3.61 ^c	▲	9.97±1.91 ^{bc}	▲	6.23±1.85 ^b	▲	<0.0001
NEIL2	1.08±0.53 ^{ab}	1.38±0.28 ^{ab}	▶	3.71±0.98 ^c	▲	2.07±0.48 ^b	▲	0.88±0.86 ^a	▶	<0.0001
EXO	1.14±0.52 ^a	6.35±0.31 ^c	▲	5.89±0.35 ^c	▲	4.54±0.31 ^b	▲	3.70±0.66 ^b	▲	<0.0001
RAD18	1.22±0.98 ^a	5.06±0.90 ^c	▲	2.20±0.67 ^{ab}	▲	2.75±0.41 ^b	▲	3.27±0.29 ^b	▲	<0.0001
XRCC3	1.03±0.29 ^a	2.68±0.43 ^b	▲	3.20±0.69 ^b	▲	0.70±0.11 ^a	▶	0.94±0.09 ^a	▶	<0.0001
SMUG	1.08±0.44 ^a	1.19±0.40 ^a	▶	2.28±0.74 ^a	▲	1.78±0.81 ^a	▶	5.40±5.75 ^b	▲	0.013
Isı Şok										
HSP27	1.22±0.68 ^c	1.94±0.20 ^d	▲	0.88±0.13 ^{bc}	▶	0.45±0.14 ^{ab}	▼	0.16±0.00 ^a	▼	<0.0001
HSP60	1.06±0.47 ^b	2.34±0.61 ^c	▲	2.43±0.51 ^c	▲	0.83±0.12 ^{ab}	▶	0.18±0.03 ^a	▼	<0.0001
HSP70	1.05±0.41 ^{ab}	1.30±0.73 ^b	▶	0.98±0.30 ^{ab}	▶	0.97±0.54 ^{ab}	▶	0.17±0.13 ^a	▼	0.015
HSP90	1.03±0.33 ^{bc}	1.33±0.82 ^c	▶	0.69±0.17 ^{abc}	▶	0.27±0.18 ^{ab}	▼	0.11±0.02 ^a	▼	0.001
Hücre Döngüsü										
P21	1.08±0.49 ^a	12.28±0.81 ^d	▲	3.61±0.21 ^b	▲	7.63±0.57 ^c	▲	6.98±0.29 ^c	▲	<0.0001
P27	1.06±0.39 ^{ab}	1.54±0.12 ^c	▶	1.22±0.12 ^{bc}	▶	0.77±0.07 ^a	▶	1.08±0.18 ^{ab}	▶	<0.0001
P53	1.07±0.45 ^a	2.74±0.29 ^b	▲	2.34±0.19 ^b	▲	1.23±0.27 ^a	▶	1.21±0.10 ^a	▶	<0.0001
Yaşam Sinyal										
NF-κB	1.10±0.43 ^a	3.46±0.19 ^c	▲	2.05±0.13 ^b	▲	2.70±0.11 ^b	▲	2.03±0.70 ^b	▲	0.001
IκB-α	1.07±0.42 ^a	1.52±0.06 ^b	▶	1.27±0.11 ^{ab}	▶	1.05±0.06 ^a	▶	1.09±0.11 ^a	▶	0.008
COX2	1.05±0.44 ^a	1.12±0.31 ^{ab}	▶	3.45±1.22 ^c	▲	1.24±0.25 ^{ab}	▶	2.26±0.36 ^{bc}	▲	<0.0001
PI3K	1.02±0.27 ^a	0.85±0.79 ^a	▶	2.64±1.34 ^b	▲	1.28±0.23 ^{ab}	▶	1.54±0.42 ^{ab}	▶	0.009
AKT	1.07±0.42 ^a	2.27±0.10 ^{cd}	▲	2.45±0.13 ^d	▲	1.76±0.09 ^b	▲	1.90±0.15 ^{bc}	▲	<0.0001
MTOR	1.08±0.45 ^a	3.34±0.18 ^c	▲	3.11±0.20 ^c	▲	2.12±0.13 ^b	▲	2.00±0.24 ^b	▲	<0.0001
Apoptoz										
BCL2	1.04±0.35 ^{ab}	2.17±0.21 ^c	▲	1.86±0.97 ^{bc}	▲	0.71±0.19 ^a	▶	0.81±0.17 ^a	▼	<0.0001
BAX	1.06±0.41 ^a	2.57±0.32 ^a	▲	3.10±0.68 ^a	▲	3.48±3.92 ^a	▲	2.96±1.63 ^a	▲	0.355
Apaf1	1.01±0.22 ^a	2.01±0.45 ^b	▲	2.21±0.72 ^b	▲	0.80±0.32 ^a	▶	0.41±0.06 ^a	▼	<0.0001
TNF-α	1.05±0.44 ^{bc}	1.53±0.21 ^{cd}	▶	1.63±0.36 ^d	▶	0.59±0.22 ^{ab}	▼	0.20±0.02 ^a	▼	<0.0001
KASP8	1.06±0.41 ^a	3.44±0.21 ^c	▲	3.24±0.21 ^c	▲	2.52±0.19 ^b	▲	2.33±0.17 ^b	▲	<0.0001

▲: artmış, ▶: kararlı (istatistiksel olarak önemli bir değişiklik yok), ▼: azalmış gen ifade değişikliklerini gösterir. Tüm veriler GAPDH ifadesi ile normalize edildi ve kontrole göre verildi; n = 4, ortalama ± SE. Önemli ölçüde farklı değerleri gösteren aynı satırdaki farklı harfler tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD testi ile analiz edildi ($p \leq 0.05$)

4.4.1.1. Antioksidan Sinyal Yolağı

Çalışma kapsamında, C6 Hücre serisi üzerinde TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ile birlikte paklitaksel melatonin ve ergosterol IC₅₀ uygulaması yapılan grupların, antioksidan savunma sistemi elemanlarından Sod, Sod 2 ve Kat enzimlerinin ekspresyonuna etkisi incelendi ve Şekil 4.43’de sunuldu.



Şekil 4.43. Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C6 hücre serisi üzerinde Sod, Sod 2 ve Cat Antioksidan sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi q RT-PCR analizi. Tüm veriler B-aktin ifadesine göre normalize edildi ve Kontrole göre verildi (kontrol=1); n=5. * önemli ölçüde farklı değerlerin tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD Testi ile analiz edildiğini gösterir P≤0.05, ** P≤0.01, *** P≤0.001, **** P≤0.0001 (TMZ: Temozolomid, M: Melatonin, E: Ergosterol, P: Paklitaksel)

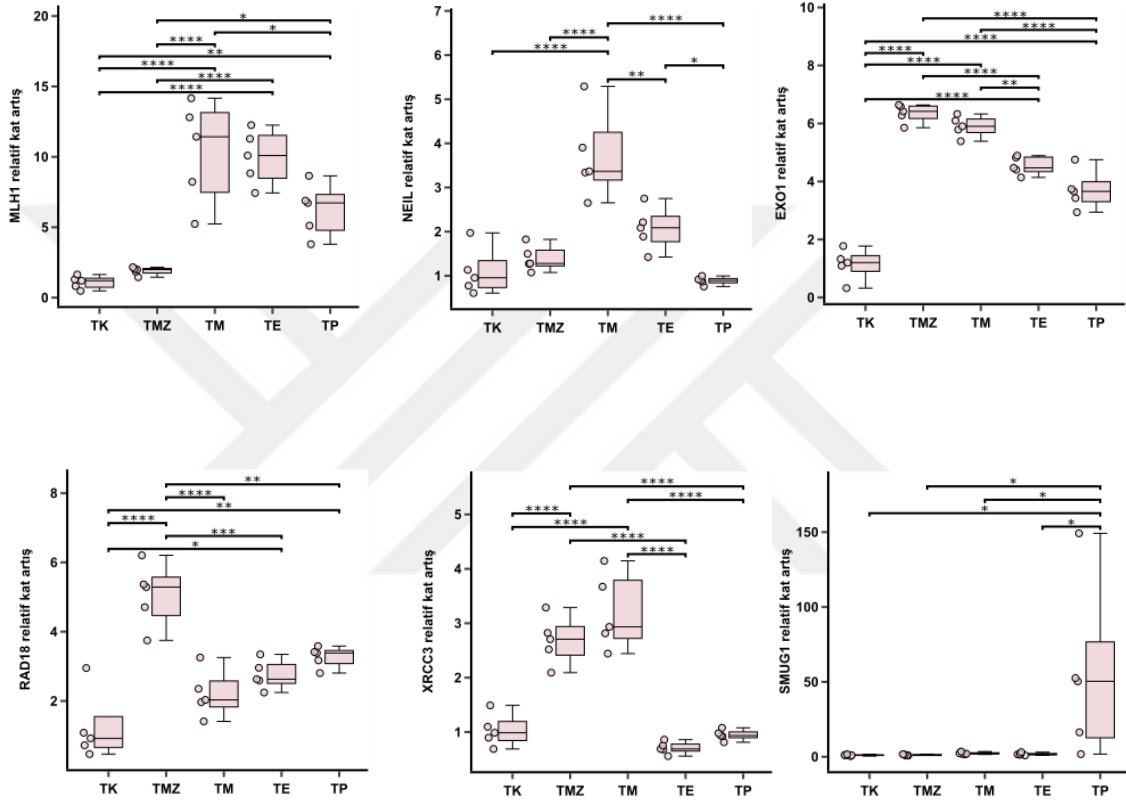
Yapılan çalışmada, Sod 1 gen ifadesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TMZ, TMZ-MLT ve TMZ-ERG uygulama gruplarında anlamlı düzeyde artış göstermiştir. Ayrıca gen ifadesi TMZ-MLT grubunda daha yüksek seviyede ifade edilerek diğer gruplara kıyasla anlamlı bir fark oluşturmuş, TMZ-PTX grubunda ise kontrol seviyesinde kalmıştır.

Sod 2 geni, TMZ ve TMZ-MLT uygulamalarında kontrole kıyasla anlamlı seviyede artmıştır. TMZ-MLT grubundaki artış TMZ grubundan daha yüksek seviyede belirlenmiştir. TMZ-ERG grubunda gen ifadesi kontrol seviyesinde kalırken, TMZ-PTX grubunda ise kontrole kıyasla anlamlı bir düşüş sergilemiştir.

Kat geni ifadesi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tüm uygulama gruplarında anlamlı seviyede artmıştır. Ayrıca, TMZ-MLT ve TMZ-ERG uygulama gruplarında daha yüksek seviyede ifade edilmiş ve diğer gruplarla anlamlı seviyede istatistiksel bir fark oluşturmuştur.

4.4.1.2. Dna Tamir Sinyal Yolağı

Çalışma kapsamında, C6 Hücre serisi üzerinde TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ile birlikte paklitaksel melatonin ve ergosterol IC₅₀ uygulaması yapılan grupların, DNA tamir sinyal yolağı onarım enzimlerinden, Mlh 1, Neil 2, Exo 1, Rad 18, Xrcc 3, Smug 1 genlerinin ekspresyonuna etkisi incelendi ve Şekil 4.44’de sunuldu.



Şekil 4.44. Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C6 hücre serisi üzerinde Mlh 1, Neil 2, Exo 1, Rad 18, Xrcc 3, Smug 1 DNA Tamir sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi q RT-PCR analizi. Tüm veriler B-aktin ifadesine göre normalize edildi ve Kontrole göre verildi (kontrol=1); n=5. * önemli ölçüde farklı değerlerin tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD Testi ile analiz edildiğini gösterir P≤0.05, ** P≤0.01, *** P≤0.001, **** P≤0.0001 (TMZ:Temozolomid, M:Melatonin, E:Ergosterol, P:Paklitaksel)

Çalışma kapsamında, Mlh 1 gen ifadesi, kontrol ile karşılaştırıldığında, tüm gruplarda anlamlı seviyede artış göstermiştir. Özellikle TM ve TE uygulama gruplarında diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı seviyede fark oluşturmuştur.

Neil 2 ifadesi, TMZ-MLT ve TMZ-ERG gruplarında kontrole kıyasla anlamlı seviyede artmış, TMZ ve TMZ-PTX uygulama gruplarında anlamlı bir fark oluşturmamıştır.

Exo 1 geni, tüm uygulama gruplarında kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek ifade edilmiştir. TMZ uygulama grubunda ifade seviyesi diğer kombinasyon grupları ile karşılaştırıldığında daha fazla artış sergilemiştir.

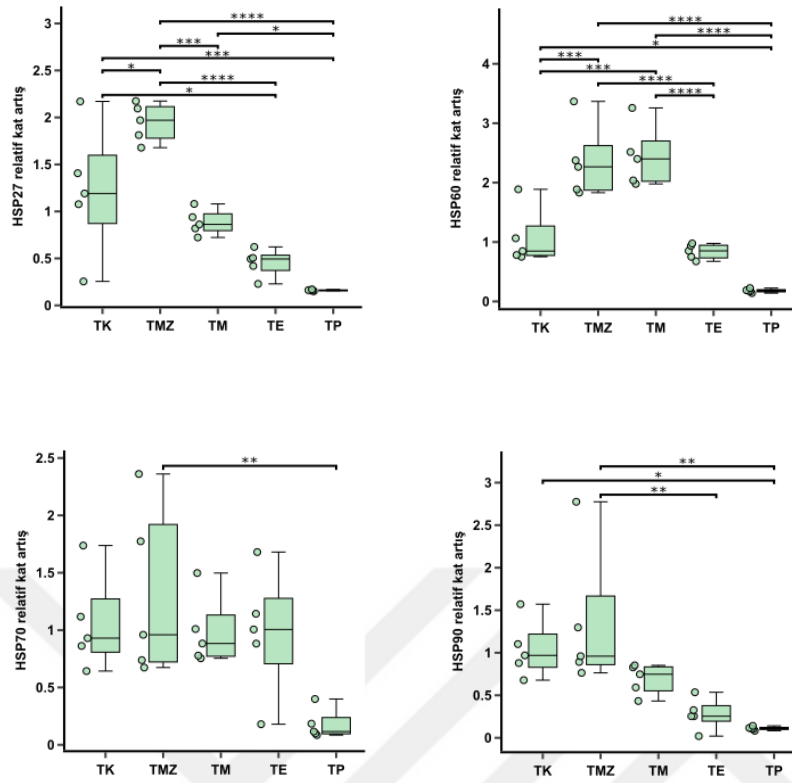
Rad 18 gen ifadesi, kontrole kıyasla tüm uygulama gruplarında atılmıştır. Ayrıca, TMZ grubunda yüksek Rad 18 seviyesi diğer tüm kombinasyon grupları ile anlamlı düzeyde bir fark oluşturmuştur, en düşük gen ifadesi TMZ-MLT grubunda belirlenmiştir.

Xrcc 3, TMZ ve TMZ-MLT gruplarında kontrole kıyasla anlamlı seviyede yüksek ifade edilmiştir. TMZ-ERG ve TMZ-PTX gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişim belirlenmemiştir.

Smug geni, kontrole kıyasla TMZ-MLT, TMZ-ERG ve TMZ-PTX kombinasyon gruplarında istatistiksel olarak anlamlı seviyede artmış, TMZ-PTX grubunda en yüksek seviyede ifade edilmiştir. TMZ grubunda ise kontrole kıyasla gen ifadesinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

4.4.1.3. Isı Şok Sinyal Yolağı

Çalışma kapsamında, C6 Hücre serisi üzerinde TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ile birlikte paklitaksel melatonin ve ergosterol IC₅₀ uygulaması yapılan grupların, Isı şok sinyal yolağı enzimlerinden, Hsp 27, Hsp 60, Hsp 70, Hsp 90 genlerinin ekspresyonuna etkisi incelendi ve Şekil 4.45’de sunuldu.



Şekil 4.45. Temozolomid, Temozolomid - Melatonin, Temozolomid - Ergosterol, Temozolomid - Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C6 hücre serisi üzerinde Hsp 27, Hsp 60, Hsp 70, Hsp 90 Isı şok moleküler şaperon sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi q RT-PCR analizi. Tüm veriler B-aktin ifadesine göre normalize edildi ve Kontrole göre verildi (kontrol=1); n=5. * önemli ölçüde farklı değerlerin tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD Testi ile analiz edildiğini gösterir $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ (TMZ:Temozolomid, M:Melatonin, E:Ergosterol, P:Paklitaksel)

Yapılan çalışmada küçük molekül ağırlıklı Hsp 27 gen ifadesi yalnız TMZ uygulanan grupta kontrole kıyasla anlamlı düzeyde artmış, TMZ-MLT grubunda anlamlı bir değişim görülmezken, TMZ-ERG ve TMZ-PTX uygulamalarında kontrole kıyasla anlamlı seviyede azalış belirlenmiştir. Aynı zamanda TMZ grubunda yüksek HSP27 seviyeleri, diğer tüm kombinasyon grupları ile anlamlı düzeyde bir fark oluşturmuştur, en düşük gen ifadesi TMZ-PTX grubunda belirlenmiştir.

Mitokondrial Hsp 60 TMZ ve TMZ-MLT uygulamalarında kontrole kıyasla anlamlı seviyede yüksek ifade edilmiştir. Aynı zamanda bu iki grup, diğer tüm deney gruplarından istatistik olarak anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur. TMZ-ERG grubunda Hsp 60 ifadesi kontrole kıyasla anlamlı bir değişim göstermezken, TMZ-PTX grubunda en

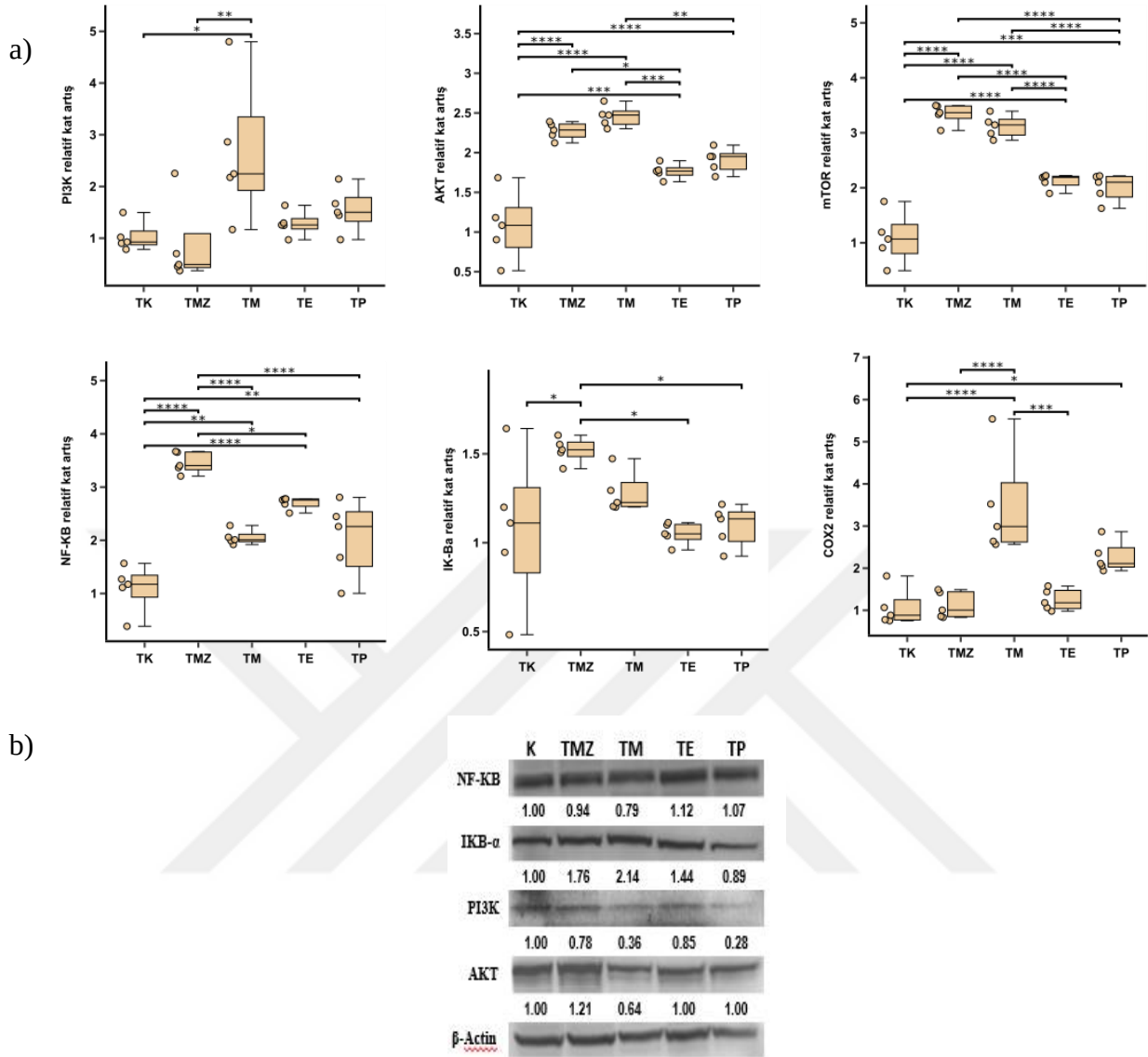
düşük ifade belirlenmiş ve diğer tüm gruplardan istatistik olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur.

Yapılan çalışmada Hsp 90 ifadeleri kontrole kıyasla değişmemiş, Hsp 70 gen ifadesi yalnız TMZ-PTX grubunda kontrole kıyasla anlamlı bir düşüş sergilemiştir.

4.4.1.4. NF-KB, PI3K, AKT, mTOR Sinyal Yolağı

Çalışma kapsamında, C6 Hücre serisi üzerinde TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ile birlikte paklitaksel melatonin ve ergosterol IC₅₀ uygulaması yapılan grupların, Yaşam Sinyal Yolağı enzimlerinden, Nf-kb, Ikb- α , P13k, Akt, mTOR genlerinin ekspresyonuna etkisi incelendi ve Şekil 4.46'da sunuldu.





Şekil 4.46. a) Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C6 hücre serisi üzerinde Nf-kb, Ikb-α, P13k, Akt Cox 2 ve mTOR yaşam sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi q RT- PCR analizi. Tüm veriler B-aktin ifadesine göre normalize edildi ve Kontrole göre verildi (kontrol=1); n=5. * önemli ölçüde farklı değerlerin tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD Testi ile analiz edildiğini gösterir $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ b) TMZ, TMZ-MLT, TMZ-ERG, TMZ-PTX tedavilerinden sonra, C6 hücrelerinde, Nf-kb, Ikb-α, P13k, Akt proteinlerinin ifadesi. B-aktine göre normalize edildi ve kontrole göre verildi (kontrol=1). Veriler ortalama $\pm$ SD olarak sunuldu. (K:Kontrol, TMZ:Temozolomid (866,05 μ M), M:Melatonin (3691,23 μ M) E:Ergosterol (52,73 μ M), P:Paklitaksel (6,30 nM)

Nf-kb gen ifadesi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tüm uygulama gruplarında istatistiksel olarak anlamlı seviyede artış belirlenmiştir. TMZ grubunda diğer kombinasyon grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde bir fark oluşturmuştur, TP

grubunda ise gen ifadesi en düşük seviyede ifade edilmiştir. IκB-α gen seviyelerinde, kontrole kıyasla anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

Cox 2 gen ifadesi kontrol grubu ile kıyaslandığında yalnız TM ve TP uygulama gruplarında anlamlı bir artış sergilemiştir. Ayrıca, TMZ-MLT grubunda diğer tüm gruplardan istatistik olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. TMZ ve TMZ-ERG gruplarında anlamlı bir değişim belirlenmemiştir.

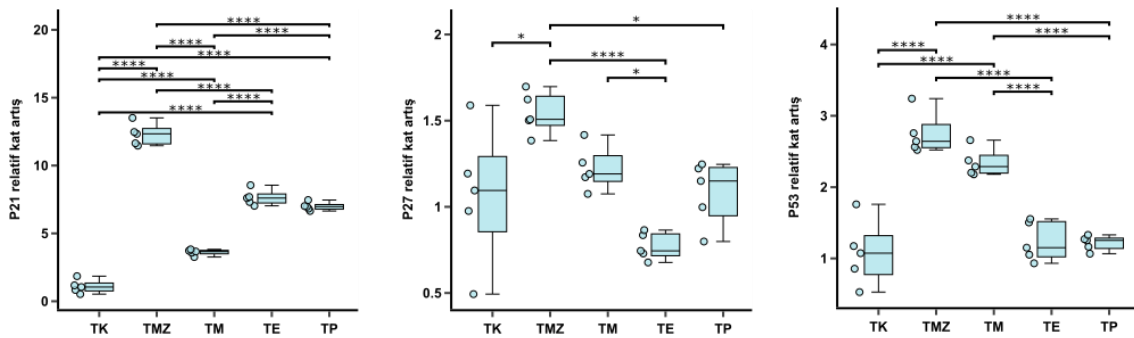
P13k, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yalnız TMZ-MLT grubunda anlamlı seviyede artmıştır.

Akt geni kontrole kıyasla tüm uygulama gruplarında anlamlı seviyede yüksek ifade edilmiş, TMZ-MLT grubunda, diğer tüm kombinasyon grupları ile anlamlı düzeyde bir fark oluşturmuştur.

mTOR geni ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm gruplarda anlamlı seviyede artış göstermiş, en yüksek olarak TMZ grubunda ifade edilmiştir.

4.4.1.5. Hücre Döngüsü Düzenleyici Sinyal Yolağı

Çalışma kapsamında, C6 Hücre serisi üzerinde TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ile birlikte paklitaksel melatonin ve ergosterol IC₅₀ uygulaması yapılan grupların, Hücre Döngüsü enzimlerinden, P21, P27, P53 genlerinin ekspresyonuna etkisi incelendi ve Şekil 4.47’de sunuldu.



Şekil 4.47. Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C6 hücre serisi üzerinde P21, P27, P53 hücre döngüsü sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi qRT-PCR analizi. Tüm veriler B-aktin ifadesine göre normalize edildi ve Kontrole göre verildi (kontrol=1); n=5. * önemli ölçüde farklı değerlerin tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD Testi ile analiz edildiğini gösterir $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ (K:Kontrol,

TMZ: Temozolomid (866,05µM), M: Melatonin (3691,23µM) E: Ergosterol (52,73 µM), P: Paklitaksel (6,30 nM)

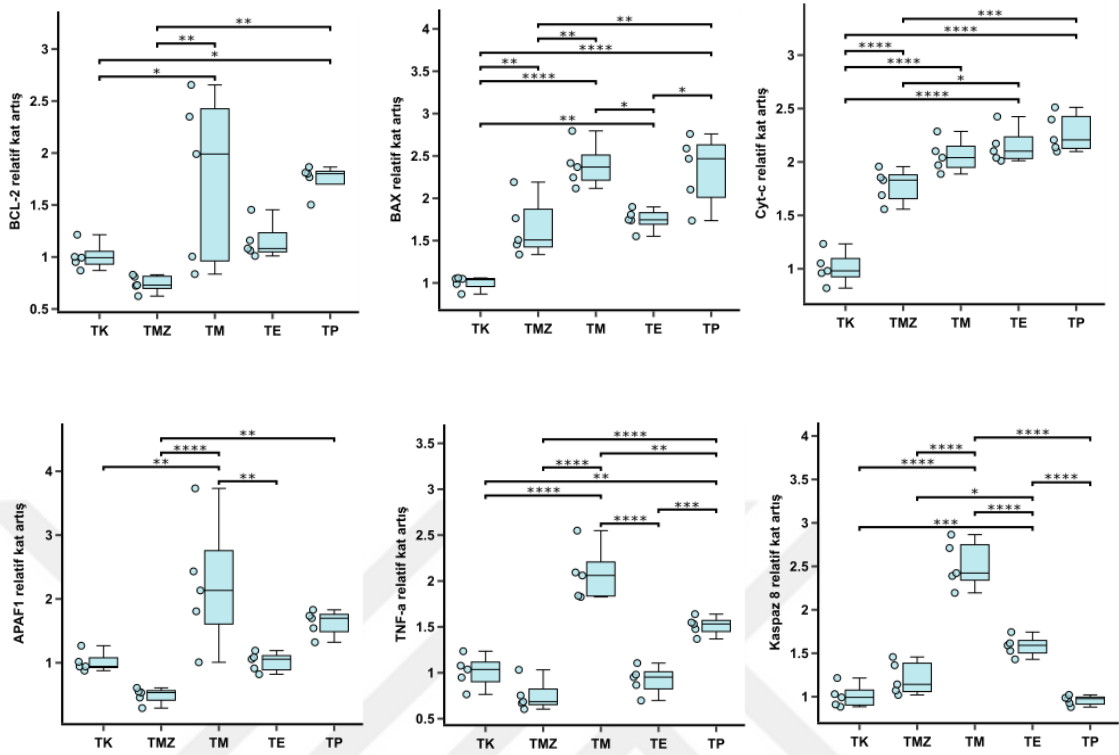
Yapılan çalışmada, P21 gen ifadesi kontrol ile kıyaslandığında tüm uygulama gruplarında anlamlı seviyede artmıştır. TMZ grubunda diğer tüm gruplara ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmuştur. TP grubunda ise en düşük seviyede ifade edilmiştir.

P27 gen ifadesi kontrole kıyasla anlamlı bir değişim göstermezken, P53 geni TMZ ve TM gruplarında anlamlı seviyede artış göstermiştir.

4.4.1.5. Apoptoz Sinyal Yolağı

Çalışma kapsamında, C6 Hücre serisi üzerinde TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ile birlikte paklitaksel melatonin ve ergosterol IC₅₀ uygulaması yapılan grupların, apoptoz sinyal yolağı enzimlerinden, Bcl2, bax, Cyt-c, Apaf1, Tnf- α , Kaspaz 8 genlerinin ekspresyonuna etkisi incelendi ve Şekil 4.48’de sunuldu.

a)



b)



Şekil 4.48. a) Temozolomid, Temozolomid-Melatonin, Temozolomid-Ergosterol, Temozolomid-Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C6 hücre serisi üzerinde Bcl-2, Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 8, apaf1, Tnf- α ve Cyt-c yaşam sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi q RT-PCR analizi. Tüm veriler B-aktin ifadesine göre norma) TMZ, TMZ-MLT, TMZ-ERG, TMZ-PTX ile 72 saat boyunca tedavi edilen C6 hücre serisi üzerinde Bcl-2, Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 8, Apaf1, Tnf- α ve Cyt-c yaşam sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi q RT-PCR analizi. Tüm veriler B-aktin ifadesine göre normalize edildi ve Kontrole göre verildi (kontrol=1); n=5. * önemli ölçüde farklı değerlerin tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD Testi ile analiz edildiğini gösterir $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ b) TMZ, TMZ-MLT, TMZ-ERG, TMZ-PTX tedavilerinden sonra, C6 hücrelerinde, Bcl-2, Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 proteinlerinin ifadesi. β -aktine göre normalize edildi ve kontrole göre verildi (kontrol=1). Veriler ortalama $\pm$ SD olarak

sunuldu. (K:Kontrol, TMZ:Temozolomid (866,05µM), M:Melatonin (3691,23µM) E:Ergosterol (52,73 µM), P:Paklitaksel (6,30 nM)

Bcl-2 gen ifadesi, kontrol ile karşılaştırıldığında TMZ ve TMZ-MLT gruplarında anlamlı seviyede artmış, TMZ grubunda diğer gruplara kıyasla daha yüksek seviyede ifade edilmiştir. TMZ-ERG ve TMZ-PTX gruplarında ise anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

Bax ifadesi kontrole kıyasla tüm uygulama gruplarında istatistiksel olarak anlamlı seviyede artmıştır. TMZ-ERG grubunda diğer tüm deney gruplarından istatistik olarak anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur.

Apaf 1 geni, TMZ ve TMZ-MLT gruplarında kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı seviyede artmıştır. TMZ-ERG ve TMZ-PTX gruplarında ise kontrole kıyasla anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

Tnf-α gen ifadesi kontrole kıyasla anlamlı bir değişim göstermezken, Kaspaz 8 geni tüm gen gruplarında kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı seviyede artış göstermiştir. Ayrıca, TMZ grubunda diğer uygulama gruplarına kıyasla daha yüksek, TMZ-PTX grubunda ise en düşük seviyede ifade edilmiştir.

N1E-115 hücre serisinde, Kontrol ve deney gruplarında Antioksidan, DNA Tamir, Isı Şok, Hücre Döngüsü Kontrolü, Yaşam Sinyal ve Apoptoz yolları genlerinin göreceli kat değişimi qRT-PCR analizi Çizelge 4.4.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.4. N1E-115 hücre serisinde, Kontrol ve deney gruplarında Antioksidan,DNA Tamir, Isı Şok, Hücre Döngüsü Kontrolü, Yaşam Sinyal ve Apoptoz yolları genlerinin göreceli kat değişimi qRT-PCR analizi

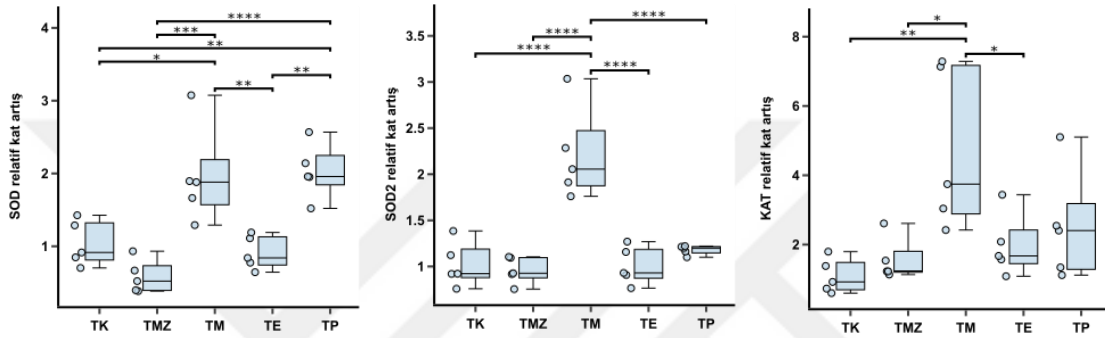
Gene ID	Kontrol	TMZ		TM		TE		TP		P
Antioksidan										
SOD1	1.03±0.30 ^a	0.58±0.22 ^a	▲	1.96±0.66 ^b	▲	0.91±0.23 ^a	▲	2.02±0.37 ^b	▶	<0.0001
SOD2	1.02±0.24 ^a	0.95±0.14 ^a	▲	2.20±0.50 ^b	▲	1.00±0.20 ^a	▶	1.17±0.04 ^a	▼	<0.0001
KAT	1.08±0.49 ^a	1.54±0.61 ^a	▲	4.72±2.31 ^b	▲	1.96±0.89 ^a	▲	2.50±1.58 ^{ab}	▲	0.004
DNA Tamir										
MLH1	1.02±0.29 ^a	1.13±0.12 ^a	▲	2.07±0.28 ^b	▲	0.53±0.52 ^a	▲	0.65±0.55 ^a	▲	<0.0001
NEIL2	1.04±0.35 ^a	0.69±0.17 ^a	▶	2.38±0.78 ^b	▲	1.10±0.19 ^a	▲	0.96±0.08 ^a	▶	<0.0001
EXO	1.00±0.10 ^b	2.13±0.25 ^a	▲	3.44±0.90 ^c	▲	2.35±0.22 ^b	▲	3.27±0.33 ^c	▲	<0.0001
RAD18	1.02±0.25 ^a	0.93±0.66 ^a	▲	1.54±0.34 ^a	▲	1.46±0.26 ^a	▲	3.25±0.21 ^b	▲	<0.0001
XRCC3	1.01±0.16 ^{ab}	1.38±0.27 ^a	▲	3.43±1.42 ^c	▲	1.44±0.20 ^{ab}	▶	2.51±0.11 ^{bc}	▶	<0.0001
SMUG	1.01±0.17 ^a	1.06±0.14 ^a	▶	7.50±4.87 ^b	▲	1.13±0.15 ^a	▶	2.66±0.44 ^a	▲	<0.0001
Isı Şok										
HSP27	1.00±0.15 ^a	1.16±0.21 ^a	▲	1.55±0.32 ^b	▶	1.21±0.15 ^{ab}	▼	0.87±0.05 ^a	▼	<0.0001
HSP60	1.01±0.15 ^a	0.14±0.04 ^b	▲	2.07±0.72 ^c	▲	0.97±0.14 ^b	▶	1.27±0.15 ^b	▼	<0.0001
HSP70	1.03±0.28 ^a	1.45±0.28 ^a	▶	2.01±1.29 ^a	▶	1.56±0.29 ^a	▶	1.90±0.33 ^a	▼	0.156
HSP90	1.00±0.14 ^a	0.54±0.14 ^{ab}	▶	1.88±1.06 ^b	▶	0.97±0.20 ^{ab}	▼	1.23±0.22 ^{ab}	▼	0.008
Hücre Döngüsü										
P21	1.00±0.14 ^{ab}	2.38±0.32 ^a	▲	3.47±0.32 ^b	▲	2.01±0.14 ^{ab}	▲	14.21±1.88 ^c	▲	<0.0001
P27	1.00±0.09 ^a	0.85±0.10 ^{ab}	▶	1.53±0.11 ^c	▶	1.05±0.06 ^b	▶	1.52±0.11 ^c	▶	<0.0001
P53	1.01±0.17 ^{ab}	1.28±0.10 ^a	▲	2.39±0.16 ^d	▲	1.44±0.17 ^b	▶	1.88±0.16 ^c	▶	<0.0001
Yaşam Sinyal										
NF-κB	1.00±0.05 ^a	0.98±0.06 ^a	▲	1.08±0.39 ^a	▲	1.30±0.19 ^a	▲	1.76±0.11 ^b	▲	<0.0001
IκB-α	1.00±0.06 ^b	0.82±0.05 ^c	▶	0.99±0.07 ^c	▶	0.59±0.06 ^a	▶	0.85±0.05 ^b	▶	<0.0001
COX2	1.02±0.26 ^a	1.01±0.16 ^a	▶	2.12±0.47 ^b	▲	0.917±0.09 ^a	▶	2.22±0.23 ^b	▲	<0.0001
PI3K	1.03±0.28 ^a	0.52±0.16 ^{ab}	▶	1.46±0.43 ^{bc}	▲	0.73±0.16 ^a	▶	1.88±0.22 ^c	▶	<0.0001
AKT	1.00±0.13 ^{ab}	1.23±0.13 ^a	▲	2.18±0.19 ^c	▲	1.36±0.07 ^b	▲	1.22±0.07 ^{ab}	▲	<0.0001
MTOR	1.00±0.09 ^b	1.28±0.13 ^a	▲	2.25±0.18 ^c	▲	1.33±0.08 ^b	▲	1.16±0.06 ^a	▲	<0.0001
Apoptoz										
BCL2	1.00±0.12 ^a	0.74±0.08 ^{ab}	▲	2.36±1.14 ^c	▲	1.15±0.17 ^{ab}	▶	1.74±0.14 ^{bc}	▼	<0.0001
BAX	1.00±0.08 ^b	1.65±0.33 ^a	▲	2.38±0.25 ^c	▲	1.74±0.12 ^b	▲	2.33±0.41 ^c	▲	<0.0001
Apaf1	1.00±0.15 ^a	0.48±0.12 ^{ab}	▲	2.22±0.99 ^c	▲	1.01±0.14 ^{ab}	▶	1.62±0.19 ^{bc}	▼	<0.0001
TNF-α	1.01±0.17 ^a	0.74±0.16 ^a	▶	2.27±1.08 ^b	▶	0.92±0.15 ^a	▼	1.51±0.09 ^{ab}	▼	<0.0001
CASP8	1.00±0.13 ^a	1.21±0.18 ^a	▲	2.51±0.26 ^c	▲	1.58±0.11 ^b	▲	0.95±0.05 ^a	▲	<0.0001

▲: artmış, ▶: kararlı (istatistiksel olarak önemli bir değişiklik yok), ▼: azalmış gen ifade değişikliklerini gösterir. Tüm veriler Gapdh ifadesi ile normalize edildi ve kontrole göre verildi; n = 4, ortalama ± SE. Önemli ölçüde farklı değerleri gösteren aynı satırdaki farklı harfler tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD testi ile analiz edildi ($p \leq 0.05$)

4.4.2. İlaç Kombinasyon Uygulamasının N1E-115 Hücre Serisine Etkisi

4.4.2.1. Antioksidan Sinyal Yolağı

Çalışma kapsamında, N1E-115 Hücre serisi üzerinde TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ile birlikte paklitaksel melatonin ve ergosterol IC₅₀ uygulaması yapılan grupların, antioksidan savunma sistemi elemanlarından Sod, Sod 2 ve Kat enzimlerinin ekspresyonuna etkisi incelendi ve Şekil 4.49'da sunuldu.



Şekil 4.49. Temozolomid, Temozolomid - Melatonin, Temozolomid - Ergosterol, Temozolomid - Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen N1E-115 hücre serisi üzerinde Sod, Sod 2 ve Kat Antioksidan sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi q RT-PCR analizi. Tüm veriler B-aktin ifadesine göre normalize edildi ve Kontrole göre verildi (kontrol=1); n=5. * önemli ölçüde farklı değerlerin tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD Testi ile analiz edildiğini gösterir $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ (TMZ: Temozolomid, M: Melatonin, E: Ergosterol, P: Paklitaksel)

Sod 1 gen ifadesi, TMZ-MLT ve TMZ-PTX uygulama gruplarında kontrole kıyasla anlamlı seviyede artmıştır. TMZ ve TMZ-ERG gruplarında ise anlamlı bir değişim belirlenmemiştir.

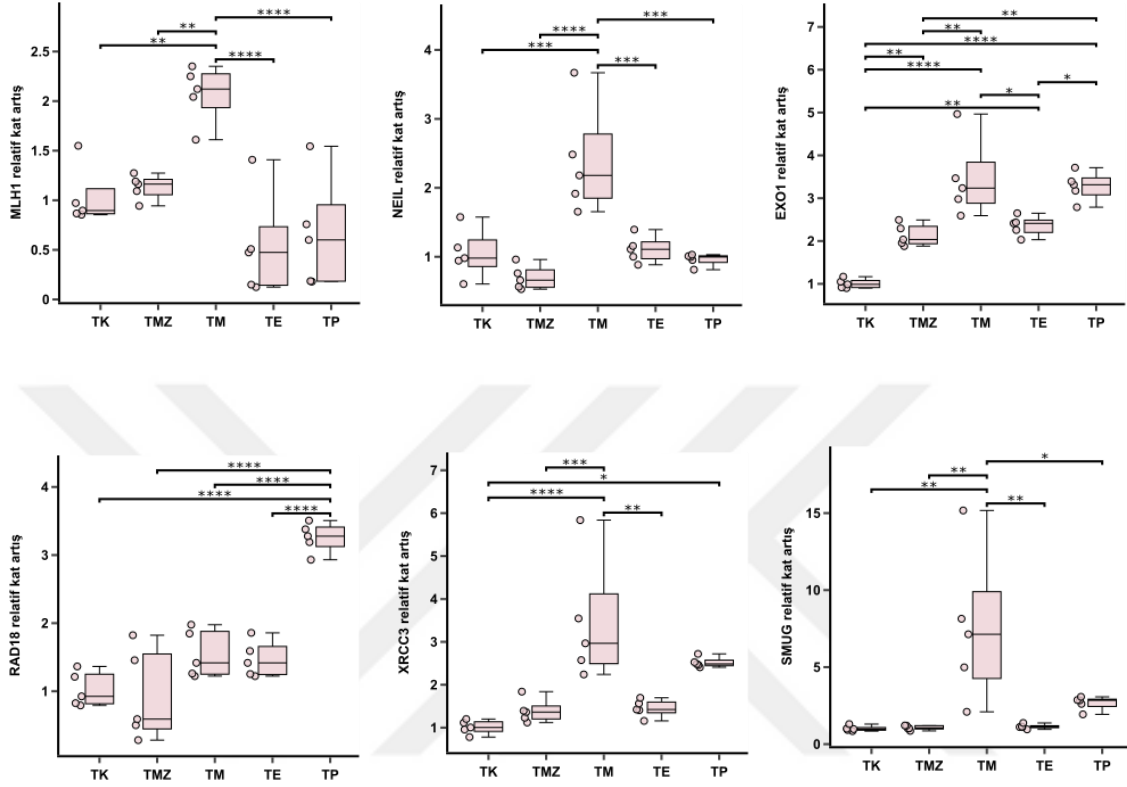
Sod 2 geni yalnızca TMZ-MLT grubunda istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek seviyede ifade edilmiştir.

Kat gen ifadesi, TMZ-MLT, TMZ-PTX ve TMZ-ERG gruplarında istatistiksel olarak anlamlı seviyede artmış, ayrıca TMZ-MLT grubunda diğer tüm deney gruplarından istatistik olarak anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur.

4.4.2.2. Dna Tamir Sinyal Yolağı

Çalışma kapsamında, N1E-115 Hücre serisi üzerinde TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ile birlikte paklitaksel melatonin ve ergosterol IC₅₀ uygulaması yapılan grupların, DNA tamir sinyal yolağı

onarım enzimlerinden, Mlh 1, Neil 2, Exo 1, Rad 18, Xrcc 3, Smug 1 genlerinin ekspresyonuna etkisi incelendi ve Şekil 4.50.'de sunuldu.



Şekil 4.50. Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen N1E-115 hücre serisi üzerinde Mlh 1, Neil 2, Exo 1, Rad 18, Xrcc 3, Smug 1 Antioksidan sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi q RT-PCR analizi. Tüm veriler B-aktin ifadesine göre normalize edildi ve Kontrole göre verildi (kontrol=1); n=5. * önemli ölçüde farklı değerlerin tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD Testi ile analiz edildiğini gösterir $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ (TMZ: Temozolomid, M: Melatonin, E: Ergosterol, P: Paklitaksel)

Mlh1 ve Neil2 gen ifadeleri, yalnızca TMZ-MLT grubunda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı seviyede artmıştır.

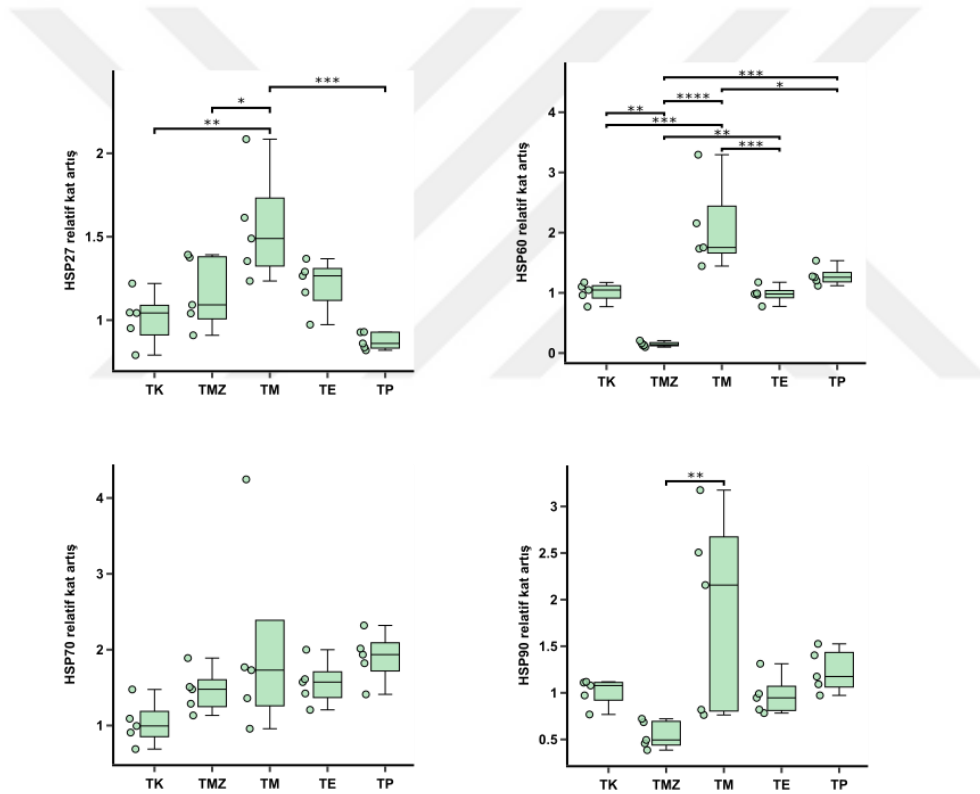
Exo 1 gen ifadesinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tüm uygulama gruplarında artış tespit edilmiştir. Ek olarak, TMZ-MLT grubunda diğer tüm gruplardan daha yüksek seviyede ifade edilmiştir.

Rad 18 gen ifadesinde, kontrol ile kıyaslandığında yalnızca TMZ-PTX grubunda anlamlı seviyede artış belirlenmiştir.

Xrcc3 ve Smug genlerinde TMZ-MLT ve TMZ-PTX gruplarında kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı seviyede artış tespit edilmiş olup, her iki gen için TMZ-MLT uygulama gruplarının diğer uygulama grupları ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturduğu belirlenmiştir.

4.4.2.3. Isı Şok Sinyal Yolağı

Çalışma kapsamında, N1E-115 Hücre serisi üzerinde TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ile birlikte paklitaksel melatonin ve ergosterol IC₅₀ uygulaması yapılan grupların, Isı şok sinyal yolağı enzimlerinden, Hsp 27, Hsp 60, Hsp 70, Hsp 90 genlerinin ekspresyonuna etkisi incelendi ve Şekil 4.51.'de sunuldu.



Şekil 4.51. Temozolomid, Temozolomid - Melatonin, Temozolomid - Ergosterol, Temozolomid - Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen N1E-115 hücre serisi üzerinde Hsp 27, Hsp 60, Hsp 70, Hsp 90 Isı şok moleküler şaperonlar sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi q RT-PCR analizi. Tüm veriler B-aktin ifadesine göre normalize edildi ve Kontrole göre verildi (kontrol=1); n=5. * önemli ölçüde farklı değerlerin tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD Testi ile analiz edildiğini gösterir $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ (TMZ: Temozolomid, M: Melatonin, E: Ergosterol, P: Paklitaksel)

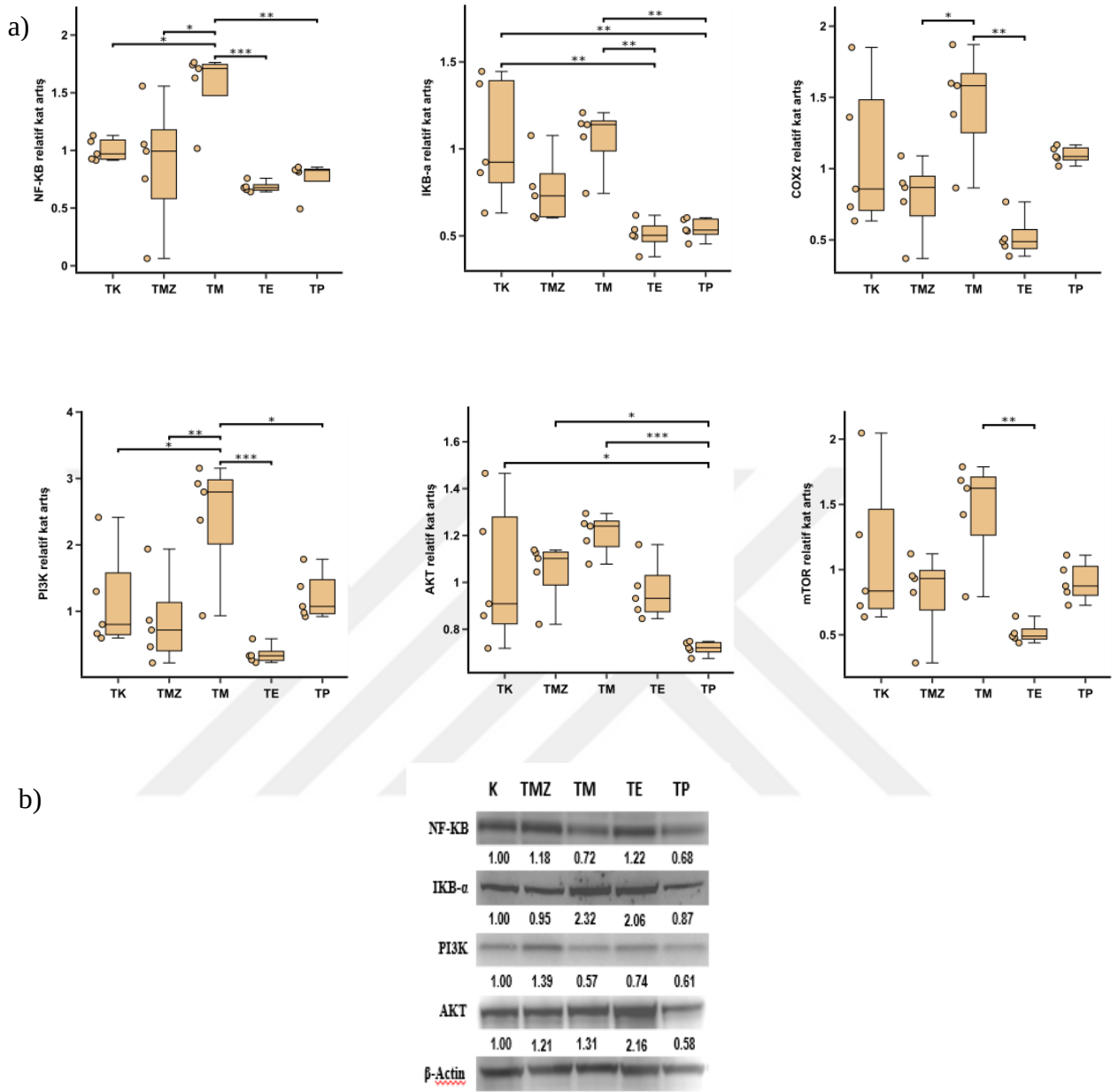
Hsp 27 ve Hsp 90 gen ifadesi yalnız TMZ-MLT uygulanan grupta kontrole kıyasla anlamlı düzeyde artmıştır. Diğer tüm uygulama gruplarında her iki gen için anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

Hsp 60 gen seviyesinde de TMZ-MLT uygulama grubunda kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı seviyede artış tespit edilmiştir. TMZ grubunda, kontrole kıyasla anlamlı seviyede azalış belirlenmiştir.

Hsp 70 gen ifadesi ise, kontrol ile karşılaştırıldığında tüm gen gruplarında anlamlı seviyede artmış, TMZ-MLT grubunda diğer tüm deney gruplarından istatistik olarak anlamlı seviyede yüksek ifade edildiği tespit edilmiştir.

4.4.2.4. NFκ-B, PI3K, AKT, mTOR Sinyal Yolağı

Çalışma kapsamında, N1E-115 Hücre serisi üzerinde TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ile birlikte paklitaksel melatonin ve ergosterol IC₅₀ uygulaması yapılan grupların, Yaşam Sinyal Yolağı enzimlerinden, Nf-kb, Ikb- α , P13k, Akt, mTOR genlerinin ekspresyonuna etkisi incelendi ve Şekil 4.52.'de sunuldu.



Şekil 4.52. a) Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen N1E-115 hücre serisi üzerinde Nf-kb, Ikb- α , P13k, Akt yaşam sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi qRT-PCR analizi. Tüm veriler B-aktin ifadesine göre normalize edildi ve Kontrole göre verildi (kontrol=1); n=5. * önemli ölçüde farklı değerlerin tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD Testi ile analiz edildiğini gösterir $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ b) Temozolomid, Temozolomid-Melatonin, Temozolomid-Ergosterol, Temozolomid-Paklitaksel tedavilerinden sonra, N1E-115 hücrelerinde, Nf-kb, Ikb- α , P13k, Akt proteinlerinin ifadesi. β -aktine göre normalize edildi ve kontrole göre verildi (kontrol=1). Veriler ortalama $\pm$ SD olarak sunuldu. (K:Kontrol, TMZ:Temozolomid (869205 μ M), M:Melatonin (2571,41 μ M) E:Ergosterol (31,20 μ M), P:Paklitaksel (8,67 nM)

Nf-kb gen ifadesi, kontrole kıyasla yalnızca TP uygulama grubunda istatistiksel olarak anlamlı seviyede artarken, Ikb- α gen ifadesi kontrole kıyasla anlamlı bir değişim göstermemiştir.

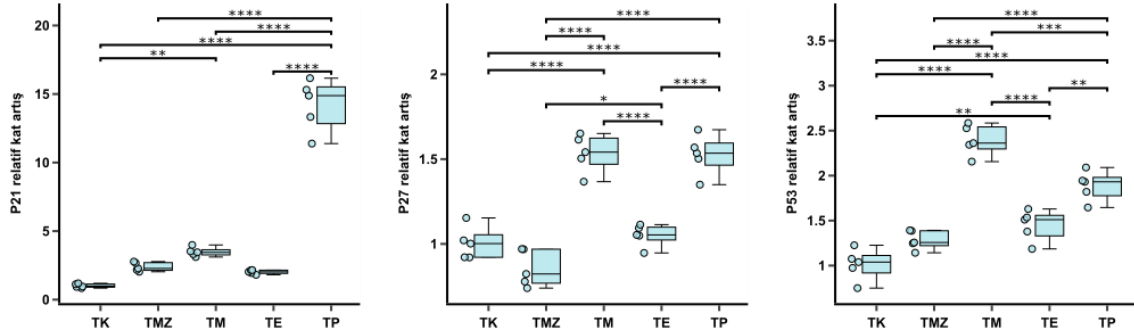
Cox 2 gen ifadesi, TMZ-MLT ve TMZ-PTX gruplarında kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı seviyede artmış, TMZ ve TMZ-ERG gruplarında kontrole kıyasla anlamlı bir değişim tespit edilmemiştir.

P13k gen ifadesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, yalnızca TMZ-PTX uygulama grubunda anlamlı seviyede artış göstermiştir.

Akt ve mTOR gen ifadeleri, kontrole kıyasla yalnızca TMZ-MLT grubunda istatistiksel olarak anlamlı seviyede artmıştır. Diğer uygulama gruplarında kontrole kıyasla anlamlı bir değişim belirlenmemiştir.

4.4.2.5. Hücre Döngüsü Düzenleyici Sinyal Yolağı

Çalışma kapsamında, N1E-115 Hücre serisi üzerinde TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ile birlikte paklitaksel melatonin ve ergosterol IC₅₀ uygulaması yapılan grupların, Hücre Döngüsü enzimlerinden, P21, P27, P53 genlerinin ekspresyonuna etkisi incelendi ve Şekil 4.53.'de sunuldu.



Şekil 4.53. Temozolomid, Temozolomid - Melatonin, Temozolomid - Ergosterol, Temozolomid - Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen N1E-115 hücre serisi üzerinde P21, P27, P53 hücre döngüsü sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi q RT-PCR analizi. Tüm veriler B-aktin ifadesine göre normalize edildi ve Kontrole göre verildi (kontrol=1); n=5. * önemli ölçüde farklı değerlerin tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD Testi ile analiz edildiğini gösterir $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ (K:Kontrol, TMZ:Temozolomid (869205 μ M), M:Melatonin (2571,41 μ M) E:Ergosterol (31,20 μ M), P:Paklitaksel (8,67 nM)

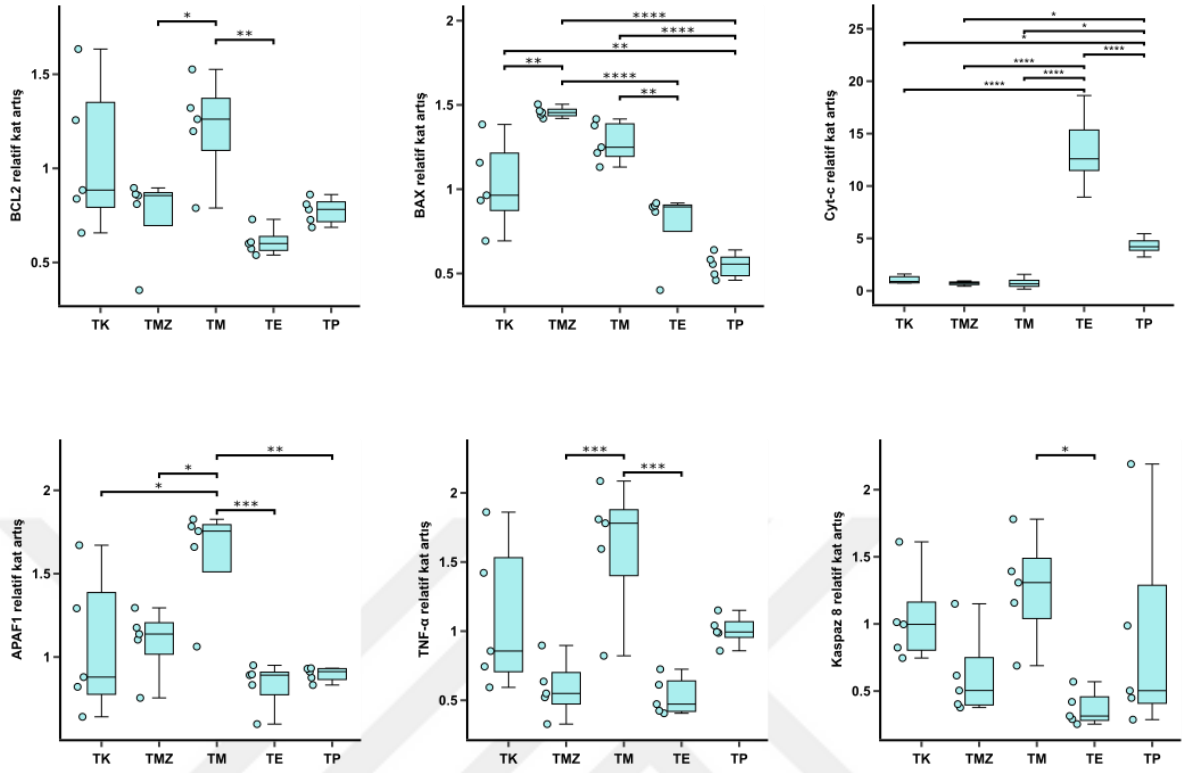
P21 gen ifadesi, kontrol ile kıyaslandığında, tüm uygulama gruplarında istatistiksel olarak artmıştır. TMZ-PTX uygulama grubunda 14.2 katlık artış ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel bir fark oluşturmuştur.

P27 ve P53 gen ifadeleri, kontrol ile karşılaştırıldığında TMZ-MLT ve TMZ-PTX uygulama gruplarında anlamlı seviyede artış göstermiştir. Ayrıca P53 gen ifadesi, TMZ-MLT grubunda diğer tüm deney gruplarından istatistik olarak anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur.

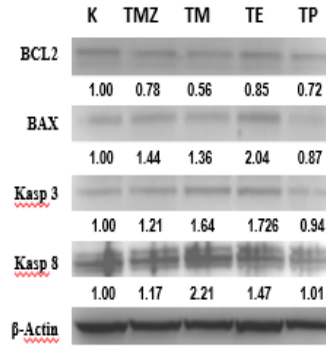
4.4.2.6. Apoptoz Sinyal Yolağı

Çalışma kapsamında, N1E-115 Hücre serisi üzerinde TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ile birlikte paklitaksel melatonin ve ergosterol IC₅₀ uygulaması yapılan grupların, apoptoz sinyal yolağı enzimlerinden, Bcl-2, Bax, Cyt-c, Apaf1, Tnf- α , Kaspaz 8 genlerinin ekspresyonuna etkisi incelendi ve Şekil 4.54’de sunuldu.

a)



b)



Şekil 4.54. a) Temozolomid, Temozolomid - Melatonin, Temozolomid - Ergosterol, Temozolomid - Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen N1E-115 hücre serisi üzerinde Bcl-2, Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 yaşam sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi qRT-PCR analizi. Tüm veriler B-aktin ifadesine göre normalize edildi ve Kontrole göre verildi (kontrol=1); n=5. * önemli ölçüde farklı değerlerin tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD Testi ile analiz edildiğini gösterir $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ b) TMZ, TMZ-MLT, TMZ-ERG, TMZ-PTX tedavilerinden sonra, N1E-115 hücrelerinde, Bcl-2, Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 proteinlerinin ifadesi. β -aktine göre normalize edildi ve kontrole göre verildi (kontrol=1). Veriler ortalama $\pm$ SD olarak sunuldu. (K:Kontrol, TMZ:Temozolomid (869205 μ M), M:Melatonin (2571,41 μ M) E:Ergosterol (31,20 μ M), P:Paklitaksel (8,67 nM)

Bax geni, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tüm deney gruplarında, bcl-2 gen ifadesi ise, kontrol ile kıyaslandığında, TMZ-MLT ve TMZ-PTX gruplarında anlamlı seviyede artmıştır. Her iki gen ifadesi de TMZ-MLT grubunda diğer tüm deney gruplarından istatistiksel olarak yüksek seviyede ifade edilmiştir.

Apaf 1 ve tnfr- α gen ifadeleri kontrol ile karşılaştırıldığında, TMZ-MLT ve TMZ-PTX gruplarında anlamlı seviyede artmıştır. Apaf 1 gen ifadesinin, TMZ grubunda ise, kontrole kıyasla anlamlı seviyede azaldığı tespit edilmiştir. Her iki gen için, TMZ-ERG grubunda anlamlı seviyede bir fark belirlenmemiştir.

Kaspaz 8 gen ifadesi, kontrole kıyasla TM ve TE uygulama gruplarında anlamlı seviyede artmıştır. Ayrıca, TMZ-MLT grubu diğer tüm deney gruplarından istatistik olarak anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur.

4.4.3. İlaç Kombinasyon Uygulamasının Astrosit (C8) Hücre Hattı Hücre Serisine Etkisi

Astrosit hücre serisinde, Kontrol ve deney gruplarında Antioksidan, DNA Tamir, Isı Şok, Hücre Döngüsü Kontrolü, Yaşam Sinyal ve Apoptoz yolları genlerinin göreceli kat değişimi qRT-PCR analizi Çizelge 4.5’de sunulmuştur.

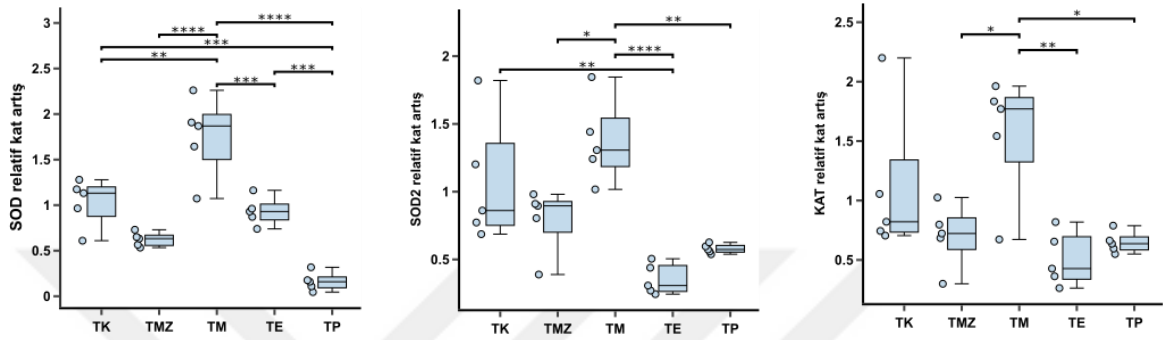
Çizelge 4.5. Astrosit hücre serisinde, Kontrol ve deney gruplarında Antioksidan, DNA Tamir, Isı Şok, Hücre Döngüsü Kontrolü, Yaşam Sinyal ve Apoptoz yolları genlerinin göreceli kat değişimi qRT-PCR analizi

Gene ID	Kontrol	TMZ		TM		TE		TP		P
Antioksidan										
SOD1	1.03±0.26 ^{ab}	0.62±0.07 ^b	▲	1.75±0.43 ^c	▲	0.93±0.15 ^b	▲	0.16±0.10 ^a	▶	<0.0001
SOD2	1.06±0.46 ^{ab}	0.79±0.23 ^{bc}	▲	1.37±0.30 ^c	▲	0.35±0.11 ^a	▶	0.57±0.03 ^{ab}	▼	<0.0001
KAT	1.10±0.62 ^a	0.70±0.26 ^{ab}	▲	1.55±0.51 ^b	▲	0.50±0.22 ^a	▲	0.64±0.09 ^a	▲	0.019
DNA Tamir										
MLH1	3.11±5.16 ^a	3.24±0.95 ^a	▲	3.60±0.41 ^a	▲	0.02±0.03 ^a	▲	0.56±0.25 ^a	▲	<0.0001
NEIL2	1.05±0.40 ^{ab}	0.66±0.28 ^b	▶	0.42±0.25 ^a	▲	0.42±0.07 ^a	▲	0.62±0.12 ^{ab}	▶	<0.0001
EXO	1.29±1.14 ^a	0.09±0.01 ^b	▲	0.45±0.17 ^{ab}	▲	0.08±0.03 ^a	▲	0.12±0.04 ^a	▲	<0.0001
RAD18	1.09±0.54 ^{ab}	0.63±0.10 ^b	▲	1.22±0.49 ^b	▲	0.27±0.03 ^a	▲	0.44±0.13 ^a	▲	<0.0001
XRCC3	1.12±0.58 ^a	0.26±0.28 ^b	▲	0.72±0.28 ^{ab}	▲	0.25±0.02 ^a	▶	0.31±0.01 ^a	▶	<0.0001
SMUG	1.08±0.48 ^{ab}	0.81±0.12 ^{bc}	▶	1.38±0.18 ^c	▲	0.49±0.11 ^a	▶	0.51±0.03 ^a	▲	0.013
Isı Şok										
HSP27	1.08±0.49 ^a	0.98±0.30 ^a	▲	1.27±0.29 ^a	▶	1.23±0.30 ^a	▼	0.76±0.01 ^a	▼	<0.0001
HSP60	1.06±0.42 ^{ab}	0.68±0.18 ^{ab}	▲	1.19±0.26 ^b	▲	0.60±0.31 ^a	▶	0.75±0.12 ^{ab}	▼	<0.0001
HSP70	1.06±0.41 ^a	0.66±0.18 ^{ab}	▶	1.55±0.33 ^b	▶	0.75±0.43 ^a	▶	0.55±0.12 ^a	▼	0.015
HSP90	1.10±0.55 ^a	0.46±0.54 ^a	▶	1.53±0.74 ^a	▶	1.48±0.20 ^a	▼	3.32±1.14 ^b	▼	0.001
Hücre Döngüsü										
P21	1.06±0.46 ^a	0.37±0.34 ^a	▲	1.34±0.41 ^a	▲	0.37±0.09 ^a	▲	15.20±12.53 ^b	▲	<0.0001
P27	1.44±1.33 ^{ab}	1.06±0.40 ^{ab}	▶	2.26±0.64 ^b	▶	0.79±0.21 ^a	▶	0.65±0.37 ^a	▶	<0.0001
P53	1.15±0.74 ^b	2.47±0.18 ^a	▲	2.78±0.40 ^b	▲	2.42±0.38 ^b	▶	1.18±0.13 ^a	▶	<0.0001
Yaşam Sinyal										
NF-κB	1.00±0.09 ^a	0.88±0.54 ^a	▲	1.57±0.31 ^b	▲	0.68±0.04 ^a	▲	0.76±0.15 ^a	▲	0.001
IκB-α	1.04±0.34 ^{ab}	0.76±0.192 ^b	▶	1.06±0.18 ^b	▶	0.50±0.08 ^a	▶	0.54±0.06 ^a	▶	0.008
COX2	1.08±0.51 ^a	0.79±0.26 ^{ab}	▶	1.45±0.37 ^b	▲	0.52±0.14 ^a	▶	1.09±0.05 ^{ab}	▲	<0.0001
PI3K	1.15±0.75 ^a	0.84±0.65 ^a	▶	2.43±0.88 ^b	▲	0.34±0.13 ^a	▶	1.22±0.35 ^a	▶	0.009
AKT	1.03±0.30 ^b	1.04±0.13 ^b	▲	1.20±0.08 ^b	▲	0.96±0.12 ^{ab}	▲	0.71±0.02 ^a	▲	<0.0001
MTOR	1.10±0.58 ^{ab}	0.82±0.31 ^{ab}	▲	1.46±0.39 ^b	▲	0.51±0.07 ^a	▲	0.90±0.14 ^{ab}	▲	<0.0001
Apoptoz										
BCL2	1.05±0.39 ^a	0.75±0.22 ^{ab}	▲	1.21±0.26 ^b	▲	0.60±0.07 ^a	▶	0.77±0.06 ^{ab}	▼	<0.0001
BAX	1.02±0.25 ^d	1.45±0.03 ^{bc}	▲	1.27±0.11 ^{cd}	▲	0.79±0.22 ^{ab}	▲	0.54±0.07 ^a	▲	0.355
Apaf1	1.01±0.22 ^a	2.01±0.45 ^a	▲	2.21±0.72 ^b	▲	0.80±0.32 ^a	▶	0.41±0.06 ^a	▼	<0.0001
TNF-α	1.05±0.44 ^a	1.53±0.21 ^{ab}	▶	1.63±0.36 ^b	▶	0.59±0.22 ^a	▼	0.20±0.02 ^{ab}	▼	<0.0001
KASP8	1.06±0.41 ^{ab}	3.44±0.21 ^{ab}	▲	3.24±0.21 ^b	▲	2.52±0.19 ^a	▲	2.33±0.17 ^{ab}	▲	<0.0001

▲: artmış, ▶: kararlı (istatistiksel olarak önemli bir değişiklik yok), ▼: azalmış gen ifade değişikliklerini gösterir. Tüm veriler Gapdh ifadesi ile normalize edildi ve kontrole göre verildi; n = 4, ortalama ± SE. Önemli ölçüde farklı değerleri gösteren aynı satırdaki farklı harfler tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD testi ile analiz edildi ($p \leq 0.05$)

4.4.3.1. Antioksidan Sinyal Yolağı

Çalışma kapsamında, C8 Hücre serisi üzerinde TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ile birlikte paklitaksel melatonin ve ergosterol IC₅₀ uygulaması yapılan grupların, antioksidan savunma sistemi elemanlarından Sod, Sod 2 ve Kat enzimlerinin ekspresyonuna etkisi incelendi ve Şekil 4.55’de sunuldu

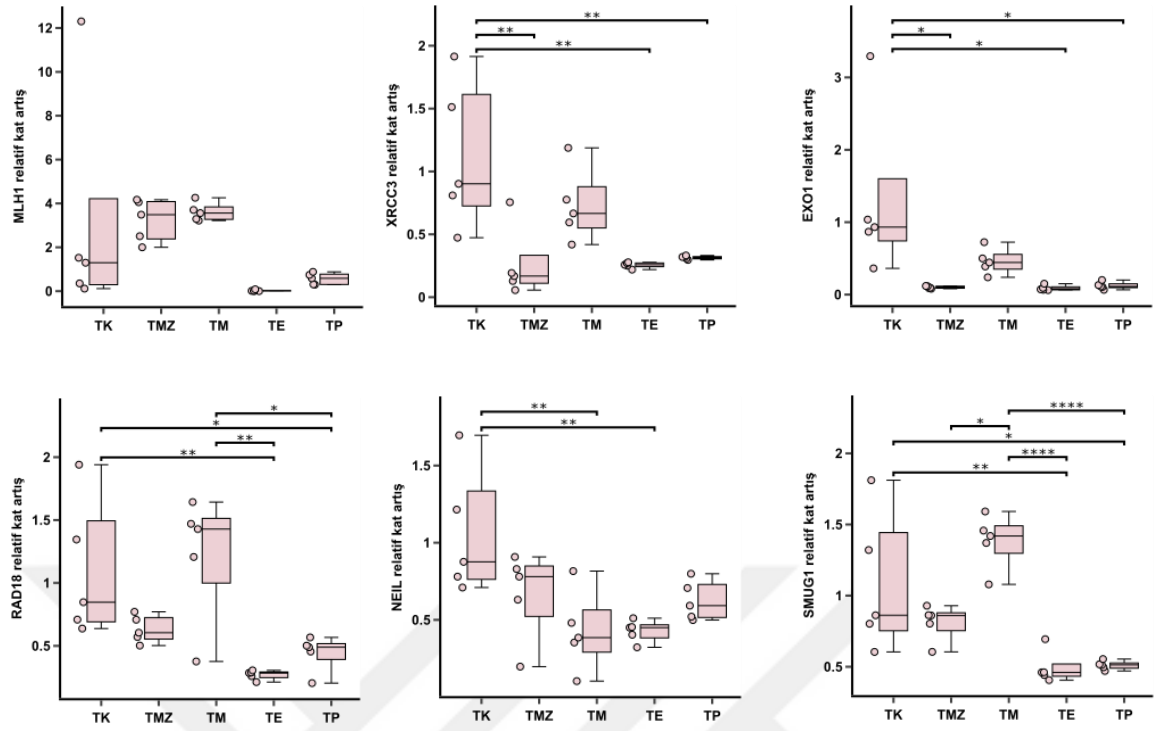


Şekil 4.55. Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C8 hücre serisi üzerinde Sod 1, Sod 2 ve Kat Antioksidan sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi q RT-PCR analizi. Tüm veriler B-aktin ifadesine göre normalize edildi ve Kontrole göre verildi (kontrol=1); n=5. * önemli ölçüde farklı değerlerin tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD Testi ile analiz edildiğini gösterir $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ (K:Kontrol, TMZ:Temozolomid (869205 μ M), M:Melatonin (2571,41 μ M) E:Ergosterol (31,20 μ M), P:Paklitaksel (8,67 nM)

Antioksidan sinyal yolağı genlerinden Sod 1, Sod 2 ve Kat gen ifadeleri kontrol ile kıyaslandığında sadece TMZ-MLT grubunda istatistiksel olarak anlamlı seviyede artmıştır. Ayrıca, Sod 1 gen ifadesinde, kontrol ile karşılaştırıldığında TMZ-PTX uygulama grubunda anlamlı seviyede azalış tespit edilmiştir. Diğer tüm uygulama gruplarında gen ifadelerinde kontrole kıyasla değişme belirlenmemiştir.

4.4.3.2. Dna Tamir Sinyal Yolağı

Çalışma kapsamında, C8 Hücre serisi üzerinde TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ile birlikte paklitaksel melatonin ve ergosterol IC₅₀ uygulaması yapılan grupların, DNA tamir sinyal yolağı onarım enzimlerinden, Mlh 1, Neil 2, Exo 1, Rad 18, Xrcc 3, Smug 1 genlerinin ekspresyonuna etkisi incelendi ve Şekil 4.56’da sunuldu.



Şekil 4.56. Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C8 hücre serisi üzerinde Mlh 1, Neil 2, Exo 1, Rad 18, Xrcc 3, Smug 1, DNA Tamir sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi q RT-PCR analizi. Tüm veriler B-aktin ifadesine göre normalize edildi ve Kontrole göre verildi (kontrol=1); n=5. * önemli ölçüde farklı değerlerin tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD Testi ile analiz edildiğini gösterir $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ (K:Kontrol, TMZ:Temozolomid (869205 μ M), M:Melatonin (2571,41 μ M) E:Ergosterol (31,20 μ M), P:Paklitaksel (8,67 nM)

DNA Tamir mekanizması genlerinden, Mlh 1 gen ifadesinde, kontrol grubu ile kıyaslandığında TMZ-ERG ve TMZ-PTX uygulama gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edilmiştir. TMZ ve TMZ-MLT gruplarında ise kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı seviyede bir fark belirlenmemiştir.

NEIL2 gen ifadesi, TMZ-MLT, TMZ-ERG ve TMZ-PTX gruplarında, kontrole kıyasla anlamlı seviyede azalmıştır. Ayrıca, TMZ-MLT ve TMZ-ERG gruplarının gen ifadesi diğer tüm gruplardan istatistik olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur.

Exo 1 gen ifadesi tüm uygulama gruplarında anlamlı düzeyde azalmıştır.

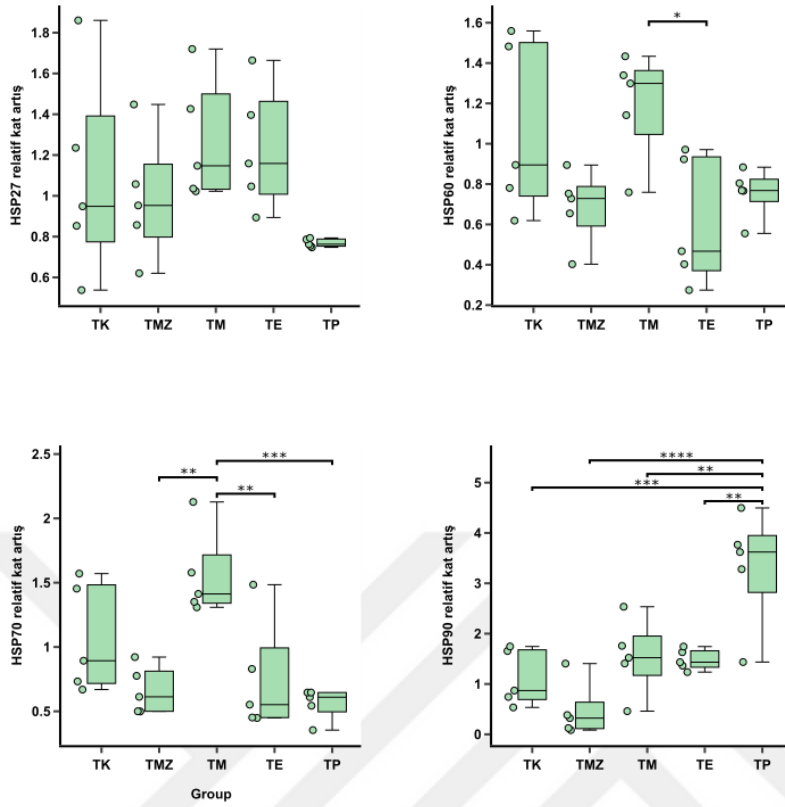
Rad 18 gen ifadesinde kontrol ile karşılaştırıldığında TMZ-MLT grubunda anlamlı bir değişim tespit edilmezken, diğer tüm uygulama gruplarında kontrole kıyasla anlamlı seviyede azalış belirlenmiştir.

Xrcc 3 gen, TMZ, TMZ-ERG ve TMZ-PTX gruplarında kontrol gurubuna kıyasla anlamlı seviyede azalmıştır. Gen ifade seviyeleri her üç grupta istatistiksel olarak bir fark yaratmamış, aynı seviyede tespit edilmiştir. TMZ-MLT uygulama grubunda ise kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark oluşturmamıştır.

Smug gen ifadesi, TMZ-ERG ve TMZ-PTX gruplarında kontrole kıyasla anlamlı seviyede azalırken, TMZ ve TMZ-MLT uygulama gruplarında kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında anlamlı seviyede bir fark oluşturmamıştır.

4.4.3.3. Isı Şok Sinyal Yolağı

Çalışma kapsamında, C8 Hücre serisi üzerinde TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ile birlikte paklitaksel melatonin ve ergosterol IC₅₀ uygulaması yapılan grupların, Isı şok sinyal yolağı enzimlerinden, Hsp 27, Hsp 60, Hsp 70, Hsp 90 genlerinin ekspresyonuna etkisi incelendi ve Şekil 4.57’de sunuldu.



Şekil 4.57. Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C8 hücre serisi üzerinde Hsp 27, Hsp 60, Hsp 70, Hsp 90 Isı şok moleküler şaperonlar sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi q RT-PCR analizi. Tüm veriler B-aktin ifadesine göre normalize edildi ve Kontrole göre verildi (kontrol=1); n=5. * önemli ölçüde farklı değerlerin tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD Testi ile analiz edildiğini gösterir $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ (K:Kontrol, TMZ:Temozolomid (869205 μ M), M:Melatonin (2571,41 μ M) E:Ergosterol (31,20 μ M), P:Paklitaksel (8,67 nM)

Yapılan çalışmada küçük molekül ağırlıklı Hsp 27 gen ifadesi kontrol ile karşılaştırıldığında diğer kombinasyon grupları ile anlamlı düzeyde bir fark oluşturmamıştır.

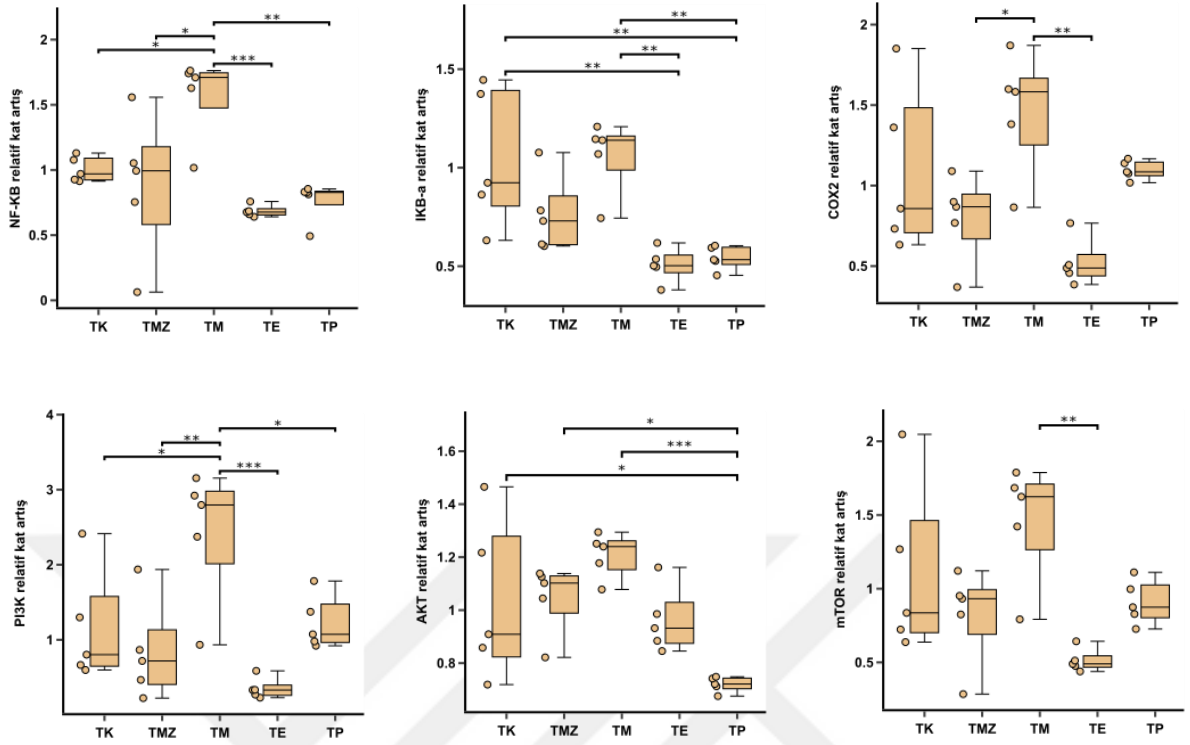
Mitokondrial Hsp 60 gen ifadesinde TMZ-ERG uygulama grubunda kontrole kıyasla anlamlı seviyede azalış tespit edilmiş, diğer uygulama gruplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark belirlenmemiştir.

Hsp 70 gen ifadesinde TMZ ve TMZ-ERG uygulamalarında anlamlı bir fark oluşmazken, TMZ-PTX grubunda istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalış tespit edilmiştir. TMZ-MLT grubunda ise, gen ifadesinde kontrole kıyasla anlamlı seviyede artış belirlenmiştir.

Hsp 90 gen ifadesinde, TMZ-MLT ve TMZ-ERG gruplarında kontrole kıyasla anlamlı bir fark oluşmamıştır. TMZ grubunda kontrol uygulama grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı seviyede azalma, TMZ-PTX grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir.

4.4.3.4. NFκ-β, PI3K, AKT, mTOR Sinyal Yolağı

Çalışma kapsamında, C8 Hücre serisi üzerinde TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ile birlikte paklitaksel melatonin ve ergosterol IC₅₀ uygulaması yapılan grupların, Yaşam Sinyal Yolağı enzimlerinden, Nf-kb, Ikb-α, P13k, Akt, mTOR genlerinin ekspresyonuna etkisi incelendi ve Şekil 4.58’de sunuldu.



Şekil 4.58. Temozolomid, Temozolomid - Melatonin, Temozolomid - Ergosterol, Temozolomid - Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C8 hücre serisi üzerinde Nf-kb, Ikb- α , P13k, Akt, mTOR yaşam sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi q RT-PCR analizi. Tüm veriler B-aktin ifadesine göre normalize edildi ve Kontrole göre verildi (kontrol=1); n=5. * önemli ölçüde farklı değerlerin tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD Testi ile analiz edildiğini gösterir $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ (K:Kontrol, TMZ:Temozolomid (869205 μ M), M:Melatonin (2571,41 μ M) E:Ergosterol (31,20 μ M), P:Paklitaksel (8,67 nM)

Nf-kb gen ifadesi, kontrole kıyasla sadece TMZ-MLT grubunda anlamlı seviyede artmıştır. Diğer tüm uygulama gruplarında anlamlı düzeyde bir fark oluşmamıştır.

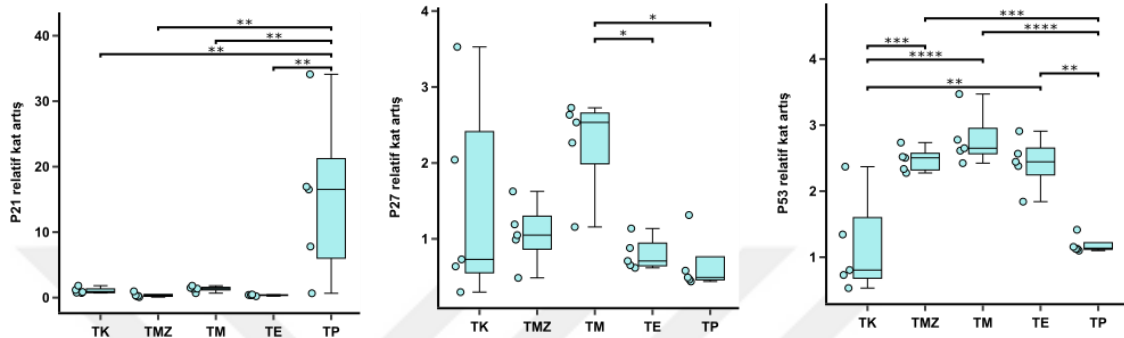
Ikb- α gen ifadesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, TMZ-ERG ve TMZ-PTX gruplarında anlamlı seviyede azalma belirlenmiş, diğer gruplarda anlamlı bir fark oluşmamıştır.

Cox 2 ve P13k gen ifadelerinde, sadece TMZ-ERG grubunda istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalma belirlenmiştir. P13k gen ifadesi TMZ-MLT grubunda ise kontrole kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı seviyede artmıştır.

Akt gen ifadesinde uygulama gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiş, mTOR gen ifadesi ise TMZ-ERG uygulama grubunda anlamlı seviyede azalmıştır.

4.4.3.5. Hücre Döngüsü Düzenleyici Sinyal Yolağı

Çalışma kapsamında, C8 Hücre serisi üzerinde TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ile birlikte paklitaksel melatonin ve ergosterol IC₅₀ uygulaması yapılan grupların, Hücre Döngüsü enzimlerinden, P21, P27, P53 genlerinin ekspresyonuna etkisi incelendi ve Şekil 4.59.'da sunuldu.



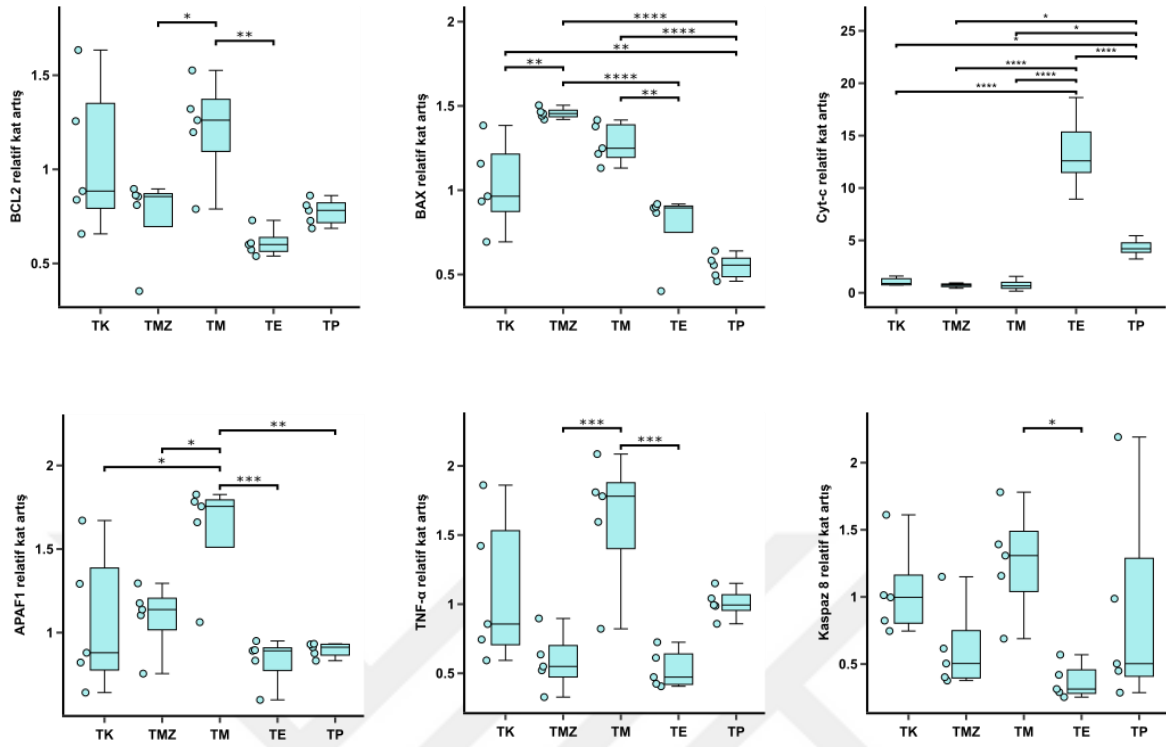
Şekil 4.59. Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C8 hücre serisi üzerinde P 21, P 27, P 53 hücre döngüsü sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi q RT-PCR analizi. Tüm veriler B-aktin ifadesine göre normalize edildi ve Kontrole göre verildi (kontrol=1); n=5. * önemli ölçüde farklı değerlerin tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD Testi ile analiz edildiğini gösterir $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ (K:Kontrol, TMZ:Temozolomid (869205 μ M), M:Melatonin (2571,41 μ M) E:Ergosterol (31,20 μ M), P:Paklitaksel (8,67 nM)

P21 gen ifadesinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TMZ ve TMZ-ERG gruplarında, P27 gen ifadesinde ise TMZ-ERG ve TMZ-PTX gruplarında anlamlı seviyede azalış tespit edilmiştir.

P53 geninin kontrole kıyasla TMZ-PTX uygulama grubunda ifadesi değişmemiş, diğer tüm uygulama gruplarında ise anlamlı seviyede artış belirlenmiştir.

4.4.3.6. Apoptoz Sinyal Yolağı

Çalışma kapsamında, C8 Hücre serisi üzerinde TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ile birlikte paklitaksel melatonin ve ergosterol IC₅₀ uygulaması yapılan grupların, apoptoz sinyal yolağı enzimlerinden, Bcl-2, Bax, Cyt-c, Apaf 1, Tnf- α , Kaspaz 8 genlerinin ekspresyonuna etkisi incelendi ve Şekil 4.60.'da sunuldu.



Şekil 4.60. Temozolomid, Temozolomid -Melatonin, Temozolomid -Ergosterol, Temozolomid -Paklitaksel ile 72 saat boyunca tedavi edilen C8 hücre serisi üzerinde Bcl-2, Bax, Cyt-c, Apaf 1, Tnf- α , Kaspaz 8 apoptoz sinyal yolağı genlerinin nisbi kat değişimi q RT-PCR analizi. Tüm veriler B-aktin ifadesine göre normalize edildi ve Kontrole göre verildi (kontrol=1); n=5. * önemli ölçüde farklı değerlerin tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD Testi ile analiz edildiğini gösterir $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ (K:Kontrol, TMZ:Temozolomid (869205 μ M), M:Melatonin (2571,41 μ M) E:Ergosterol (31,20 μ M), P:Paklitaksel (8,67 nM)

Apoptoz sinyal yolağı genlerinden, Bcl-2 gen ifadesi, TMZ-ERG grubunda kontrole kıyasla anlamlı seviyede azalmış, diğer uygulama gruplarında anlamlı bir fark oluşmamıştır. Bax gen ifadesi, TMZ-PTX uygulama grubunda kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalmış, TMZ grubunda ise anlamlı seviyede artmıştır. Apaf1 ve Tnf- α geni TMZ-MLT grubunda kontrole kıyasla anlamlı seviyede artmış, ayrıca Tnf- α geni TMZ grubunda anlamsız seviyede azalmıştır. Her iki gen için, diğer tüm uygulama gruplarında kontrol uygulama grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Kaspaz 8 gen ifadesinde, kontrole kıyasla sadece TMZ-ERG grubunda anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Diğer uygulama gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Tez ile Glioblastoma (C6) ve Nöroblastoma (N1E-115) tip beyin tümörlerinden elde edilen hücre serileri kullanarak, beyin tümörlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan TMZ-paklitaksel tedavi rejimine alternatif olarak öngördüğümüz TMZ-MLT ve TMZ-ERG kombine tedavilerinin, beyin tümör hücre serilerinde, hücre proliferasyonu, oksidatif stres, DNA hasarı, hücre sağ kalım yolu ve hücre ölüm mekanizmaları üzerindeki hücresel ve moleküler etkileri belirlenmiştir. Aynı zamanda tüm bu tedaviler sağlıklı beyin hücre serisi olan astrosit (C8) hücre serisindeki sitotoksik etkileri bakımından analiz edilmiş ve önerilen terapilerin, TMZ-PTX kombinasyonu ile avantaj ve dezavantajları kapsamlı bir sitogenetik ve transkriptomik analiz veri seti ile karşılaştırılmıştır.

Tez kapsamında ilk olarak hücre kültürlerine tekli ve kombinasyon olarak uygulanacak TMZ, PTX, MLT ve ERG ajanlarının IC_{50} dozları belirlenmiştir. TMZ bugün için beyin tümörlerinin tedavisinde kabul görmüş ve en yaygın olarak kullanılan kemoterapi ajanıdır ve etkisini DNA ile reaksiyona girerek DNA ipliği kırılmalarına neden olan metil ürünler oluşturması ve hücreyi otofojiye zorlaması yoluyla gösterir (Wesolowski, Rajdev & Mukherji, 2010). Bununla birlikte, derece 4 glioblastoma multiforme ve nöroblastoma gibi çok dirençli ve yüksek heterojeniteye sahip beyin tümörlerinde, yüksek IC_{50} değerlerine sahiptir ve tedavi için diğer organ ve dokularda da sistemik toksisiteye neden olabilecek TMZ'den yüksek dozlarda gereklidir (Mu vd. , 2015). Bu bilgiyi doğrular şekilde, bizim çalışmamızda, C6 ve N1E-115 hücre hattına 72 saat süre boyunca 15,63-2000 μM doz aralığında TMZ uygulanmış, MTT testi sonuçları ile yapılan probit analizinde, IC_{50} değerleri; C6 ve N1E-115 hücre hatları için sırasıyla, 1732,101 μM ve 1738,414 μM olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3, 4.6). TMZ ile yapılan diğer çalışmalar benzer sonuçlar sunmaktadır. Stephen T. Keir ve arkadaşlarının 2013

yılında yaptıkları çalışmada, dört farklı nöroblastoma hücre hattı NB-1643, NB-EBc1, CHLA-90, CHLA-136 üzerinde TMZ'in 0,1-1000 μ M konsantrasyonu denenmiş ve 96 saat süre sonunda sırasıyla, 2, 256, 1098, 345 μ M arasında değişen IC_{50} değerleri bulmuşlardır (Keir vd. , 2013). Beş farklı insan Glioblastoma hücre hattında TG86, LN229, U251, U373-R, U87-R, yapılan bir çalışmada, 0-500-1000-2000-3000-4000-5000-6000 μ M dozlarında 72 saat TMZ uygulaması yapılmış ve IC_{50} dozları sırasıyla, 3457.8, 954.2, 851.3, 483.5, 702.4 μ M olarak belirlenmiştir. Aynı çalışma kapsamında, U373-R ve U87-R TMZ'e dirençli hücre hatlarının da aynı koşullarda IC_{50} değerleri belirlenmiş ve ebeveyn hücre hatlarına göre beş kat artış olduğu gözlenmiştir. Dirençli hücre hatlarında IC_{50} değeri sırasıyla, 2529.3 ve 3657.2 μ M olarak tespit edildiği belirtilmiştir (Lan vd. , 2016). Ashkan Zandi ve arkadaşlarının 2017 yılında A-172 Glioma hücre hattı üzerinde yaptıkları çalışmada TMZ 31,25-1000 μ M arasında uygulanmış ve IC_{50} değeri 72 saat süre sonunda 62,5 μ M olarak bulunduğu belirtilmiştir (Zandi, Moini Zanjani, Ziai, Khazaei Poul & Haji Molla Hoseini, 2017). Hong-Qing Cai ve arkadaşlarının 2020 yılında gerçekleştirdikleri bir çalışmada, 34 adet Glioma hücre serisi üzerinde 72 saat süre boyunca TMZ'in inhibisyon etkisi denenmiş ve IC_{50} doz aralığı bu hücre hatları için 43,4 ile 926 μ M arasında tespit edildiği ifade edilmiştir. Görüldüğü gibi farklı hücre serileri yapılan çalışmalarda TMZ IC_{50} dozları oldukça geniş bir aralıkta değişmiştir. Çalışmalar incelendiğinde buradaki temel faktörün farklı tip beyin tümörlerinden elde edilen hücrelerden kaynaklandığı görülmektedir. Sonuç olarak TMZ özellikle daha hassas ve düşük dereceli tümörlerde daha düşük IC_{50} değerleri göstermiştir. Ancak özellikle Fengming Lan ve arkadaşları'nın çalışmalarında (2016) olduğu gibi, dirençli hücre serilerinde, TMZ'in etkinliği hızla azalmakta ve IC_{50} dozları diğer hücrelere kıyasla 5 kata kadar artabilmektedir. Bizim çalışmamızda kullandığımız hücre serileri kemoterapiye karşı en az duyarlı grup olan GBM ve Nöroblastoma'dan elde edilen serilerdir, elde ettiğimiz IC_{50} dozları dirençli grupta yer alan beyin tümör hücre serilerinden elde edilen dozlarla tutarlıdır. Daha düşük IC_{50} dozları sunan çalışmalarla, bulgularımız arasındaki farkın hücre serilerinin karakterinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Paklitaksel, *Taxus brevifolia*' dan köken alan, bugün için birçok kanser kemoterapisinde kullanılan oldukça güçlü bir ajandır. Etki mekanizması polimerize mikrotübüllerin stabilizasyonu yoluyla gösterir ve kanser hücrelerini G0/G1 ve G2/M

hücre döngüsünde tutuklar, ayrıca Bcl-2 aktivitesini keser ve güçlü bir apoptoz yanıtı oluşturur (Zein, Aziz, El-Sayed & Sitohy, 2019). PTX çok düşük hatta nM konsantrasyonlarda oldukça etkilidir ve baş-boyun kanserleri, meme kanseri ve akciğer kanserine karşı etkili bir kemoterapi ajanıdır (Koziara vd. , 2004; Najlah vd. , 2018). Yapılan çalışmada, PTX'in 0,78-25 nM doz aralığında seri sulandırım ile elde edilen 9 dozu 72 saat süre ile C6 ve N1E-115 hücre serilerine uygulanmış ve IC₅₀ değerleri sırasıyla 6,305 nM ve 8,674 nM olarak belirlemiştir (Şekil 4.9, 4.12). Yapılan diğer çalışmalarda çalışma bulgularımızı destekler şekilde, J.E Liebmann ve arkadaşları 8 farklı hücre hattında (Hela, A549, U373, MCF-7, HT29, OVG-1, PC-Sh, PC-Zr) 24 saat boyunca 1-10000 nM konsantrasyonlarında Paklitaksel uygulamış, IC₅₀ değerlerini sırasıyla, 2.6, 4.1, 4.2, 2.5, 2.8, 4.0, 7.5, 4.0 olarak belirlemişlerdir. M. Koziara ve arkadaşları, beyin tümörü U-118 hücre hattına 48 ve 72 saat süreyle 5-100 nM Paklitaksel uygulamışlar ve IC₅₀ değerlerini sırasıyla, 21.1±8.0 ve 11.5±4.1 olarak hesaplamışlardır (Koziara vd. , 2004). Çalışmamızda en fazla 25 nM PTX doz uygulaması yapılmış ve 72 saat süre boyunca hücrelere uygulanmıştır ve iki hücre hattı için bulunan IC₅₀ değerleri önceki çalışmalarda hem beyin tümörü, hem de diğer hücre serilerinde elde edilen dozlar ile paralellik göstermiştir.

Melatonin, epifiz bezinde ve diğer birkaç dokuda üretilen en önemli biyojenik aminlerden biridir. Melatonin esas olarak sirkadiyen ritimin majör düzenleyicisidir, ancak aynı zamanda kanser ve kanser tedavisine dayalı komplikasyonlara karşı terapötik aktiviteye sahiptir. Melatonin kanser hücrelerinde oksidatif metabolizmayı kontrol eder, tümörigenezde en önemli moleküller olan HIF1- α ve VEGF aktivasyonunu inhibe eder, hücre dışı matriksteki mikro ortamı düzenler ve ayrıca tümör hücresi proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe eder (Moradkhani vd. , 2020). Çalışmamızda melatonin C6 ve N1E hücre serilerine 125-4000 μ M doz aralıklarında 72 saat süre ile uygulanmış ve IC₅₀ değerleri sırasıyla 3691.235 μ M ve 2571.413 μ M olarak belirlemiştir (Şekil 4.15, 4.18). Çalışma sonuçlarımızı destekler şekilde, akciğer kanseri, A549 hücre serilerinde 96 saatlik Melatonin uygulaması 1864 μ M IC₅₀ değeri vermiştir (Zhou, Gui, Zhou & Wang, 2014). Yakın tarihli başka bir çalışmada, Yan Lai Tang ve arkadaşları, iki akut monositik insan lösemi hücre hattı (RS4-11), ve MOLM13 üzerinde 24 ve 48 saat olarak melatonin uygulaması yaptıkları çalışmada IC₅₀ değerini sırasıyla, 24 saat için, 1.523 mM, 0,957 mM, 48 saat için 0,728 mM ve 0,748 mM olarak belirtmişlerdir (Tang vd. , 2019). Bunun

yanında Mezenkimal kök hücrenin sıçanlarda hepatosellüler karsinomaya karşı antikanser etkilerinin incelendiği bir çalışmada, HEPG2 hücre hattına 24 saat süre boyunca melatonin uygulaması yapılmış, 24 saat süre sonunda IC₅₀ değeri 785 µM olarak bulunmuştur (Basyony, El Desouki, Abdo, Hegazy & Mohamed, 2019).

Görüldüğü gibi Melatonin farklı kanser türleri üzerinde farklı dozlarda etkili olmuştur. Ancak özellikle yoğun hipoksi görülen hücre hatlarında belirlenen etkili dozlar, çalışmada kullandığımız ve hipoksi karakteri yüksek olan beyin tümörlerinde belirlenen dozlar ile uyum göstermiştir. Buna ek olarak yapılan birçok çalışma, melatoninin çok geniş bir doz aralığında güvenli olduğunu göstermiştir ve bu gün için sağlıklı hücre serilerinde melatoninin toksik dozu belirlenmemiştir (Sainz vd. , 2003). Melatonin molekülünün tercih edilmesinin bir diğer nedeni, amfifilik karakteri ve çok küçük moleküler ağırlığı ile kan beyin bariyerini rahatlıkla geçebilmesidir (Johns, 2011). Bu bilgiler ışığında melatoninin, C6 ve N1E-115 tipi beyin tümörlerinde etkili bir antikanser ajan olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

Ergosterol'ün antitümör aktivitesi ilk olarak 1994 yılında rapor edilmiştir. 2003 yılında yapılan bir çalışma, mayadaki Ergosterol'ün in vitro meme kanseri hücrelerinin büyümesi üzerinde güçlü bir inhibe edici etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Lin ve arkadaşları, amfoterisin B ile birleştirilen Ergosterol'ün, insan hepatom hücrelerinin nekrozunu etkili bir şekilde indükleyebileceğini bildirmiştir (Wu vd. , 2018). Ancak özellikle ergostreolün beyin tümörleri üzerindeki etkinliği ile ilgili çalışmalar oldukça kısıtlı sayıdadır. Çalışmamızda, 72 saat süre boyunca 12.5-200 µM doz aralığında Ergosterol uygulanan C6 ve N1E-115 hücre hattında, IC₅₀ değerleri sırasıyla, 52,731 µM ve 31.208 µM olarak belirlemiştir (Şekil 4.21, 4.24). İnsan prostat (PC3) ve insan meme adenokarsinomu (MDA-MB-231) hücre hatlarına 72 saat süreyle Ergosterol uygulaması yapılmış IC₅₀ değeri sırasıyla, 9.82±0.98 µM ve >100 µM olarak belirlemiştir (Ma, Chen, Dong & Lu, 2013). Bir diğer çalışmada, Hui-yun Zhang ve arkadaşları U251, MCF7 ve HepG2 hücre hatlarında 72 saat süre boyunca 0,1-100 µM konsantrasyon aralığında Ergosterolün inhibisyon etkisini gözlemlemiş ve sırasıyla, 16,08±0,55, 11,78±0,63 ve 6,42±0,56 µM olarak bulduklarını ifade etmişleridir (Zhang vd., 2016). Yakın tarihli yapılan bir çalışmada, Ergosterol uygulanan LNCaP hücre hattında 72 saat inkübasyon süresi sonunda IC₅₀ değeri 14.68 ± 1.01 µM olarak bulunmuş ve Ergosterol'ün 15 mM konsantrasyondan sonra kanser hücre proliferasyonunda önemli inhibisyona neden

olabileceği bildirilmiştir (Muñoz-Fonseca vd. , 2020). Başka bir çalışmada, Ergosterolün antitümör potansiyelini değerlendirmek için Hep 3B ve Hep J5 hücreleri 48 saat süre boyunca, 0-300 µM Ergosterol uygulanmış ve hücre canlılığı mor kristal boyama ile analiz edilmiştir. En yüksek konsantrasyonda Ergosterolün, Hep 3B ve Hep J5 hücrelerinde minimum toksisite gösterdiği belirtilmiştir (Lin vd. , 2017). Önceki çalışmaların tümü, kullandığımız hücre serilerinden farklı hücreler üzerinde yapılmıştır. Görüldüğü gibi etkili dozlar, bir çok hücre serisinde, 15 µM seviyelerinde gözükmektedir. Bulduğumuz IC₅₀ değerlerimiz bu sonuçlardan yüksektir. Bunun sebebinin hücre serilerindeki farklılık olduğu düşünülmektedir, nitekim Ma ve arkadaşları çalışmamızda kullandığımız hücrelerimize benzer karakterde ilaçlara dirençli olduğu bilinen meme tümörü MDA-MB-231 hücre serisinde Ergosterol'ün IC₅₀ değerinin 100 µM'dan büyük olduğunu belirtmiştir (Ma, Chen, Dong & Lu, 2013).

Yapılan çalışmalar, TMZ ile yapılan kemoterapinin GBM hastalarının prognozunda yaklaşık % 20'lik bir hayatta kalma oranı artışı ile orta derecede bir iyileşmeyi temsil ettiğini, ancak, en önemli sorunun yüksek kullanılan dozlar ve tekrarlanan ilaç doz alımı nedeniyle gelişen ilaç direnci olduğunu göstermektedir (Mu vd. , 2015; Perazzoli vd. , 2015). Buna ilaveten, TMZ terapisine tabi tutulan hastaların sağ kalımları arasında önemli ölçüde farklılık görülmesinin nedeninin, hasta moleküler arka planlarıyla ilişkili olan bazı GBM dokularında TMZ'e karşı oluşan farklı duyarlılık ve direnç mekanizmalarının olduğu belirlenmiştir (Cai vd., 2020). GBM ve Nöroblastoma tümörlerinde görülen güçlü ilaç direncinde, etkin bir kemoterapi sağlamak için en yaygın kullanılan yöntem kombinasyon terapileridir. Kombinasyon tedavileri içinde, bugün için TMZ+PTX yaygın olarak kullanılmaktadır (Xu vd. , 2016). Ancak, kemoterapi rejimine katılan her bir antineoplastik ajan, her ne kadar kanser tedavisinde bir avantaj sağlasa da, sağlıklı organ ve dokular üzerindeki sitotoksik baskıyı arttırıcı bir etki göstermektedir. Bu durum, özellikle kanser hücrelerinde seçici olarak antikanser etki gösteren, aynı zamanda sağlıklı hücreleri toksik etkilerden kurtarabilen bitkisel ajanlar veya melatonin gibi indol aminlerin, kanser tedavilerinde, kombinasyon ajanları olarak kullanılması ile ilgili çalışmaları, günümüzün en yoğun ve sıcak araştırma konusu haline getirmiştir.

Bu kapsamda, çalışma ile ikinci adımda, C6 ve N1E hücre serileri üzerinde, bir önceki bölümde belirlenen TMZ IC₅₀ dozu ve bu dozun yarısı olan ½ IC₅₀ dozlar, yine bir önceki adımda belirlenen, Paklitaksel, Melatonin ve Ergosterol IC₅₀ dozları ile kombine

halde, 72 saat süre ile uygulanmıştır. Aynı uygulama sağlıklı Astrosit, C8 hücre serilerinde tekrarlanarak, MTT testi ile kanser hücrelerindeki antiproliferatif etki, aynı zamanda kullanılan kombinasyonların sağlıklı hücrelerdeki sitotoksik etkisi analiz edilmiştir. Kombinasyon tedavisi uygulanan hücreler aynı zamanda Anneksin V:Propodium iyodid (PI) ile boyanarak, TALI sitometresi ile apoptotik ve nekrotik ölüm oranları belirlenerek karşılaştırılmıştır. Çalışmada, TMZ'nin IC₅₀ dozu ile kombine uygulanan Ergosterol ve Paklitaksel'in C6 hücre serisinde, tek başına TMZ uygulanan gruba kıyasla anlamlı düzeyde hücre ölümü oluşturmadığı, yalnız Melatonin uygulanan grupta istatistik olarak anlamlı bir sinerjistik etki bulunduğu belirlenmiştir. N1E 115 hücre serisinde ise, kullanılan kombinasyon ajanlarının hiç biri antagonistik ve sinerjistik etki göstermemiş, hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri, tek başına TMZ uygulanan grupla benzer özellik göstermiştir. Çalışmada sinerjistik etki TMZ'nin ½ IC₅₀ dozu ile yapılan kombinasyon tedavilerinde belirlenmiş, hem ergesterol hem de melatoninle birlikte TMZ uygulanan gruplarda uygulamadan 72 saat sonra TMZ ve TMZ+PTX gruplarına kıyasla hücre canlılığı istatistik olarak anlamlı seviyede azalmış melatonin kombinasyonunda % 29.1 ±0.4, Ergesterol kombinasyonunda % 30.5 ±1.6 olarak belirlenmiştir. Nöroblastoma hücre serisinde TMZ için belirlenen IC₅₀ dozun yarısı uygulandığında, uygulamadan 72 saat sonra % 65.2 ±3.5 canlı hücre belirlenmiş, ½ IC₅₀ TMZ ile IC₅₀ Melatonin, Ergesterol ve Paklitaksel uygulamalarında canlı hücre oranları sırasıyla % 38.3, %54.8 ve % 45.6 olmuştur. TMZ ½ IC₅₀ dozu kombinasyonları aynı zamanda Astrosit hücrelerinde TMZ ile oluşan sitotoksiteyi artırmamıştır. Yapılan TALI sitometre analizinde tek başına TMZ IC₅₀ dozu ve bu dozla kombine uygulanan Melatonin, Ergesterol ajanlarının özellikle apoptotik yol ile bir ölüm oluşturduğu, Paklitaksel kombinasyonunda ise ölümün daha çok nekrotik yolla olduğu belirlenmiştir. Bulgularımızı destekler nitelikte, beyin tümör hücre serileri üzerinde yapılan bir çalışmada, PTX-TMZ kombinasyonunun U87 ve C6 hücreleri üzerinde konsantrasyona bağlı inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir. 48 saatte U87 hücreleri için Paklitaksel ve TMZ'in IC₅₀'si sırasıyla 4.5 mg/L ve 77.3 mg/L, C6 hücreleri için 0.1 mg/L ve 28.0 mg/L olarak tespit edilmiştir. Paklitaksel ve TMZ'in kombine kullanılan tedavi sonucu, TMZ'in U87 ve C6 hücrelerinde Paklitaksel'in sitotoksitesini arttırdığı ve birlikte sinerjistik etki gösterdiği bildirilmiştir. Paklitaksel'in Temozlomid'e oranı 1: 5 (w/w) olduğunda U87 üzerindeki sinerjik etkinin en iyi olduğu belirlenmiştir. En dikkat çekici sinerjik etki,

Paklitaksel'in TMZ'e oranı 1:100 (w/w) olduğunda konsantrasyonlar sırasıyla 0,05 mg/L ve 5 mg/L olduğunda C6 hücrelerinde gözlenmiştir. Paklitaksel veya TMZ konsantrasyonlarının daha da arttırılması, sinerjik etki üzerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar vermediği tespit edilmiştir (Xu vd., 2016). McConnell ve arkadaşları, insan GBM U87-MG ve MU1454 primer hücre hatlarında yaptıkları çalışmada, TMZ ve Melatoninin hücre çoğalması üzerinde etkilerini değerlendirmişler ve Melatoninin her iki hücre hattı için 1 mM konsantrasyonda tek başına bir ajan olarak hücre proliferasyonunu en etkili şekilde azalttığını tespit etmiştir. Bunun yanısıra, 100 µM TMZ ve 1 mM Melatonin kombinasyonunun, kontrollere kıyasla her iki hücre hattında U87-MG ve MU-1454'teki hücresel proliferasyonu % 60 oranında başarılı bir şekilde azaltırken, tek başına TMZ uygulaması ise her iki hücre hattında proliferasyonu yaklaşık % 40 oranında azalttığını bildirmişlerdir (McConnell, McGreevy, Williams & Litofsky, 2018). Uguz ve arkadaşları, 5-FU, Sisplatin veya Doksorubisin içeren kemoterapi ilaçları ile Melatoninin birlikte tedavisi sonucu mitokondrinin, sıçan pankreatik tümör hücrelerinin ROS üretiminde ve apoptozunda merkezi bir rol oynadığını tespit etmişlerdir. Bu kemoterapi ilaçlarına maruz kaldıktan sonra, hücreler mitokondriyal membran depolarizasyonu ve ROS artışı göstermiş ve hücreler ilaç ve melatonin kombinasyonu ile tedavi edildiğinde oksidatif hasar ve hücresel canlılık azaldığı rapor edilmiştir (Uguz vd. , 2012). Önceki çalışmalardan elde edilen bu bulgular, melatonin kombinasyonu için elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir. Ergosterol ve AmB'nin insan HCC hücreleri üzerindeki kombine ilaç etkisini değerlendirilmiştir. Kombinasyon tedavisinin, doza bağlı bir şekilde HCC hücrelerinin canlılığında önemli bir azalmaya yol açtığı, önemli miktarlarda hücresel ölüm ve bozulmuş membranin eşlik ettiği otofagozom agregasyonu bulunmuştur. Ayrıca Ergosterol ve AmB ile tedavi edilen HepJ5 hücrelerinde artmış ROS seviyeleri gözlenirken, her iki ilaç da tek başına kullanıldığında önemli bir kanser hücresi ölümü gözlenmemiş ve Ergosterol ile yapılan ön tedavinin AmB'nin neden olduğu kanser hücresi zarı tahribatını arttırarak ve kombinasyonun karaciğer kanserinin tedavisinin potansiyel kullanımı için kanıt sağladığı belirtilmiştir (Lin, Lee, Alagie & Su, 2017).

Sonuç olarak çalışma bulgularımız, özellikle $\frac{1}{2}$ IC₅₀ TMZ ile Melatonin, Ergosterol ve Paklitaksel kombinasyonlarının sağlıklı hücrelerde ölüm etkisinin kabul edilebilir seviyelerde olduğunu göstermiş ve kanser hücrelerinde başarılı bir şekilde oluşan ölüm etkisi göz önüne alındığında, özellikle $\frac{1}{2}$ IC₅₀ TMZ+MLT kombinasyonun,

tedavide tek başına TMZ ve TMZ+ERG ve TMZ+PTX tedavilerine kıyasla daha etkili ve sağlıklı hücreler üzerinde ölüm etkisi daha düşük bir tedavi olabileceği düşünülmüştür.

Glioblastoma ve Nöroblastoma tip beyin tümörleri, yüksek heterojeniteleri ve ilaçlara karşı oluşturdıkları direnç mekanizmaları ile tedavisi en zor kanser türlerindendir. Kanser hücreleri, ister neoplastik, ister hedefli kemoterapi uygulamaları sonrasında, zarar gören hücresel sinyallerini hızla onarırlar, onaramadıkları takdirde hayatta kalabilmek için alternatif sinyal yollarını harekete geçirirler. Onun için kanser terapilerinde, kanser hücrelerini yenibilmek için aynı anda birden çok hayati sinyal yolağının hedeflenmesi, aynı zamanda direnç gelişiminin önüne geçebilmek için hızlı bir ölümün sağlanması gereklidir (Albayrak vd. , 2021; Doğanlar vd. , 2020). Bu süreç, diğer bir çok hücresel sinyal yolağı haricinde, temel olarak beyin tümör hücre serilerinde, antioksidan savunma, ısı şok sinyali, DNA hasarı, Nf-kb yolağı ve apoptoz yolağı kontrolü ile yakından ilişkilidir. Bu sebeple çalışma kapsamında son adımda, C6 ve N1E hücre serilerinde, TMZ ve TMZ ile kombine olarak kullanılan melatonin, ergosterol ve Paklitaksel'in, bu hücrelerde yaşam ve ölüme karar veren hücre sinyal yollarındaki etkileri araştırılmıştır.

Reaktif oksijen türleri (ROS), ökaryotik hücrelerde normal oksidatif metabolizma tarafından salınır ve CuZn-süperoksit dismutaz (CuZn-SOD), Mn- süperoksit dismutaz (Mn-SOD), katalaz (KAT), glutatyon, peroksidazlar ve tioredoksin gibi enzimatik ve non enzimatik hücresel antioksidanlar bu türleri detoksifiye eder. Bununla birlikte, ROS aşırı üretimi veya hücrelerin antioksidan kapasitesinde bir azalma oksidatif strese neden olur. Çoğu kanser hücresi gibi beyin tümörleri de artan metabolik aktivite ve ROS üretimi ile ilişkili oksidatif stres altındadır (Sharma vd. , 2007; Szatrowski & Nathan, 1991).

Yapılan çalışmalarda, artmış ROS üretiminin, hücre büyümesi ve proliferasyonu üzerindeki uyarıcı etkileri nedeniyle kanser fenotipinin korunmasında önemli bir rol oynadığını (Hu vd. , 2005) ancak yüksek ROS seviyelerinin hücresel hasara da neden olduğunu gösterilmiştir (Pelicano vd. , 2003). Kemoterapi uygulamalarında kullanılan ROS-stres ajanlarının, hücre içi ROS'u toksik bir seviyeye yükselterek ve mitokondride ROS oluşumunu teşvik ederek kanser hücrelerini etkili bir şekilde öldürüldüğü birçok çalışmada bildirilmiştir (Huang, Feng, Oldham, Keating & Plunkett, 2000; Schumacker, 2006; Zhou, Hileman, Plunkett, Keating & Huang, 2003).

Çalışma kapsamında, TMZ ile oluşturduğumuz Melatonin, Ergosterol ve Paklitaksel kombinasyonlarının Glioma ve Nöroblastoma hücre serileri üzerindeki oksidatif stres bağımlı etkileri, hücrede oksidatif stresin hızlı ve etkili biyomarkerları olan CuZn-SOD, Mn-SOD ve Cat gen ekspresyonları ile araştırılmıştır. Çalışmada, C6 hücre serisinde, CuZn-SOD ve Mn-SOD genleri üzerinde en yüksek artış, TMZ ve TMZ+MLT gruplarında belirlenmiş, N1-E hücre serisinde ise yalnız TMZ+MLT uygulanan gruplarda oksidatif stres indüklenmiştir. Kat gen ekspresyonu C6 hücre serisinde TMZ+MLT ve TMZ+ERG uygulanan gruplarda yüksek düzeyde eksprese olurken, yalnız TMZ+ERG grubu istatistik olarak anlamlı bir fark oluşturmuştur. N1E-115 hücre serilerinde, ise yalnız TMZ+MLT uygulanan gruplarda hem kontrol, hem de TMZ uygulanan gruplara kıyasla artmıştır. Bu sonuçlar, TMZ+MLT uygulamasının kanser hücrelerinde güçlü bir oksidatif stres indükleyicisi olduğunu göstermiştir. Çalışma bulgularımızı destekler şekilde, yüksek düzeyde oluşan oksidatif stresin, glioblastoma hücre serilerinde, TMZ'ye karşı gelişen ilaç direncini kırdığı, özellikle mitokondri fonksiyonları üzerinden kanser hücrelerini ölüme götürdüğü çok yeni olarak belirlenmiştir (Honorato vd. , 2020; Lo Dico vd. , 2019; W. Wu vd. , 2020). Melatonin uygulamasının, kanser hücrelerinde solunum mekanizmasının farklı oluşu ve yüksek düzeyde var olan hipoksi nedeniyle, özellikle mitokondrial düzeyde yüksek ROS üretimine sebep olduğu (Proietti, Cucina, Minini & Bizzarri, 2017) ve sırasıyla servikal kanser, Hela, Karaciğer kanseri, HepG2, insan meme tümörü, MCF-7 hücre serilerinde SIRT3/SOD2-AKT yolu üzerinden ölümü indüklediği (Li vd. , 2020) aynı zamanda Melatonin uygulamasının Sisplatinle tedavi edilen servikal kanser HeLa hücrelerinde oksidatif stresi indükleyerek, sisplatinle indüklenen toksiteyi arttırdığı gösterilmiştir (Pariente, Pariente, Rodríguez & Espino, 2016). Benzer şekilde Ergosterol'ün de özellikle gastrointestinal tümör serilerinde oksidatif stresi indükleyerek apoptoz oluşturduğu (Yang vd. , 2020) aynı zamanda akciğer kanserinde yine oksidatif stresi arttırarak kanser hücrelerinde otofaji ve apoptoz aracılı ölümü indüklediği belirlenmiştir (Wu vd. , 2018).

DNA hasarı ve DNA tamir mekanizmaları, kanser hücrelerinde en önemli hedef noktalarından birisidir. DNA alkilasyon reaktifleri, kanser karşıtı ilaçların en eski sınıfıdır. Şu anda kullanımdadır ve beyin tümörleri dahil çeşitli kanser türlerinin tedavisi için önemlerini korumaktadır (Barciszewska, Gurda, Głodowicz, Nowak & Naskręć-Barciszewska, 2015). TMZ, alkilleme yoluyla DNA hasarı oluşturan bir ajandır ve

nükleik asit bazları ile farklı küçük veya hacimli eklentiler oluşturarak DNA'ya zarar verir (Stupp vd. , 2005). Bu hasar hücre sensörleri tarafından algılanır ve hücre hızla atofoji ve apoptotik yolla ölüme götürülür. Bunlara ilaveten, hücrelerde artan oksidatif stres ve yüksek düzeyde ROS üretimi sonucu, ortaya çıkan reaktif oksijen türleri, hücrelerde başta DNA olmak üzere, proteinler, organeller ve mebranlara saldırır ve önemli düzeyde bir hasar oluştur (Güçlü, Doğanlar, Yüksel & Doğanlar, 2020). Kanseri hücrelerinde oluşan bu süreç, DNA hasar tamir mekanizmaları adı verilen yanlış DNA replikasyonu, veya kimyasal/fiziksel maruziyetlerden kaynaklanan uyumsuz bazları tanıyan ve onaran, yüksek düzeyde korunmuş, hücreye özgü bir sistem ile yapılır (Stajkovska vd. , 2019). Bunun haricinde yanlış eşlenik veya hasarlı DNA'lar tarafından proteine çevrilen hatalı yapılar içeren proteinler, aynı zamanda ROS saldırısı ile hasar gören proteinler, hücrelerde güçlü moleküler şaperonlar olarak bilinen ısı şok proteinleri ile onarılır, ya da onarılamayacak olanlar degrade edilir (Moura, Lollo, Morato & Amaya-Farfan, 2018). Bu sebeple tez kapsamında birbirleriyle ilişkili bu iki süreç birlikte incelenmiştir. Çalışmada, DNA hasarı, bu hasarın biyomarkerları olan Mlh1, Neil2, Exo1, Rad18, Xrcc3, Smug1 gen ekspresyonları ile ısı şoku yanıtı Hsp27, Hsp60, Hsp70 ve Hsp90 gen ekspresyonları ile araştırılmıştır.

C6 hücre serisinde, uyumsuzluk onarım mekanizması tamir geni MLH1 gen ekspresyon seviyesi, TMZ-MLT ve TMZ-ERG tedavi gruplarında önemli miktarda (kontrole kıyasla ~10 kat) artış gösterirken, tek başına TMZ uygulaması ise bir miktar (kontrole kıyasla 1.9 kat) artmıştır. Paklitaksel uygulamasından sonra MLH1 gen seviyesi artışı tek başına TMZ tedavisine göre daha fazla miktarda tespit edilmiş fakat diğer kombine gruplara göre düşük seviyede kalmıştır. N1E-115 hücre serisinde, TMZ-MLT grubunda (kontrole kıyasla 2.1 kat) artan ekspresyon seviyesi gösterirken, TMZ ile birlikte ERG ve PTX tedavilerinden sonra ekspresyon seviyesi MLT'in aksine azalmıştır (kontrole kıyasla sırasıyla 0,5 ve 0.7 kat). Tek başına TMZ uygulaması ise kontrol seviyesinde (kontrole kıyasla 1.1 kat) kalmıştır. Sağlıklı hücre serisinde TMZ'in verdiği hasarla artan MLH1 gen ekspresyon seviyesi, Melatoninin tek başına TMZ uygulamasına göre kısmen artarak oluşan hasarı tamir ettiği düşünülmüştür. Ergosterolün ise sağlıklı hücre üzerine anlamlı seviyede bir etkisi oluşmamıştır. Paklitaksel ise sağlıklı hücrede MLH1 gen ifade seviyesini düşürmüştür (kontrole kıyasla 0.6 kat). Yakın tarihli bir çalışmada, Glioblastoma hücre serisinde Decitabine (DAC) ön koşullandırmasından

sonra TMZ ile işleme tabi tutulan hücrelerin gen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, DAC'ın, belirli GBM hücre hatlarını TMZ tedavisine duyarlı hale getirdiği ve DAC ile duyarlılaştırılmış GBM hücre hatlarının, Mlh1 gen ekspresyonunda artış sergilediği bildirilmiştir. TMZ ile duyarlılaştırılmış 3 hücre hattında, Mlh1 seviyeleri 1.5-4 kat artarken, TMZ ile duyarsızlaştırılmış 3 hücre hattında ise hiçbir önemli artış veya azalma tespit edilmemiştir. Her iki hücre hattında da Mlh1 gen ifadesi dışında önemli ölçüde yukarı veya aşağı regüle edilen başka herhangi bir DNA onarım geni tanımlanmadığı bildirilmiştir (Gallitto vd. , 2020). Çalışmamızda, Mlh1 gen ifade seviyesi her iki hücre serisinde de en fazla Melatonin ile birlikte tedaviden sonra artış göstermiştir.

C6 hücre serisinde, çift sarmal kırılma onarımı genlerinden olan, Exo1 gen ekspresyon seviyesinde, tüm uygulama gruplarında kontrole göre artış göstermiş, en fazla artış ise, tek başına TMZ tedavi uygulamasından sonra (kontrole kıyasla 6.4 kat) tespit edilmiştir. Paklitaksel Exo1 gen ifade seviyesindeki artış diğer uygulama gruplarına göre düşük seviyede kalmıştır (kontrole kıyasla 3.7 kat). Xrcc3, TMZ-MLT tedavi grubunda (kontrole kıyasla 3.2 kat) artış sağlamış, bunun yanı sıra ERG ve PTX ile tedavi akabinde ifade seviyesi (kontrole kıyasla 0.7 ve 0.9 kat) düşmüştür. N1E-115 hücre serisinde, Exo1 ve XRCC3 her iki gen ekspresyon seviyesinde, TMZ-Melatonin tedavi grubunda, diğer kombine tedavilere göre önemli bir artış (kontrole kıyasla 3.4 kat) belirlenmiştir. Tek başına TMZ ve ERG ile birlikte tedavi ise aynı seviyede ekspresyon artışı (kontrole kıyasla 1,4 kat) göstermiş ve kontrol seviyesinde kalmıştır. PTX ile tedaviden sonra ise her iki gen ifade artışı MLT'nin ile birlikte tedaviden sonra en yüksek seviyesine ulaşmıştır (kontrole kıyasla sırasıyla 3,3 ve 2.5 kat $p=0.0001$). Sağlıklı hücrede Exo1 ve Xrcc3 gen ekspresyon seviyesi kontrole kıyasla anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (kontrole kıyasla sırasıyla 0.5-0.7 kat). Ekzonükleaz 1 (Exo1), DNA çift sarmallı kırılmalar (DSB'ler)'ın normal onarımı için gerekli bir DNA tamir mekanizması genidir. Kemoterapötik ajanlar, hücre metabolizma ürünleri gibi çeşitli faktörler tarafından indüklenebilir. Exo1'in, DNA'ya zarar veren ajanlar tarafından hücre maruziyetinin ardından apoptoz ve hücre döngüsü kontrol noktası aktivasyonu için gerekli olduğu ve böylece genomik stabilitenin korunmasında rol oynadığı bilinen özellikleri arasındadır (Bolderson vd. , 2010). X ışını tamiri çapraz tamamlayıcı3 (Xrcc3), DNA çift sarmallı kırılmaları onaran homolog rekombinasyon (HR) tamir yolunda hem erken hem de geç dönemde etki eden DNA tamir yolağının temel bileşenidir (Jiao vd. , 2008). Xrcc3 eksik

hücre hatları düşük HR gösterir ve iyonlaştırıcı radyasyona, UV radyasyonuna, genotoksik alkilleyici maddelere ve çapraz bağlama maddelerine karşı aşırı duyarlıdır (Kiuru vd. , 2008). Açık bir veri tabanının analizinde, E-GEOD-4290, gliomaların normal beyin dokusuna kıyasla Xrcc3'ü aşırı ifade ettiği, Xrcc3'ün glioma hücrelerini TMZ kaynaklı üreme hücresi ölümü, apoptoz ve hücre döngüsü inhibisyonuna karşı koruduğu belirlenmiştir (Roos, Frohnapfel, Quiros, Ringel & Kaina, 2018). Bu bilgiler, çalışmamızda yüksek seviyelerde belirlenen Xrcc3 ve Exo1 ekspresyonunun, özellikle kullanılan ilaç kombinasyonları ile korele bir biçimde DNA hasarına işaret ettiğini düşündürmektedir.

Çalışmada, C6 hücre serisinde, baz eksizyon tamiri genlerinden olan Smug TMZ-PTX tedavi grubunda en yüksek artışı (kontrole kıyasla 5.4 kat) gösterirken, diğer gen Neil2 ise, TMZ-MLT grubunda tek başına TMZ ve diğer kombin tedavilere göre en fazla artışı (kontrole kıyasla 3.7 kat) göstermiştir. Tek başına TMZ kontrol seviyesinde kalmıştır. N1E-115 hücre serisinde, Smug ve Neil2, TMZ-Melatonin tedavi grubunda en yüksek artışı (kontrole kıyasla sırasıyla 7.5 ve 2.4 kat) göstermiş, tek başına TMZ ve TMZ-ERG (kontrole kıyasla sırasıyla 1.1 ve 1.1 kat $p<0.001$) tedavileri kontrol seviyesinde kalmıştır. PTX ile tedaviden sonra ise, Neil2 gen ifadesinde herhangi bir artış gözlenmemiş (kontrole kıyasla 1.0 kat $p=0.0001$) Smug1 mRNA seviyesi MLT ile birlikte terapiden sonra elde edilen değerden sonra en yüksek seviyesine ulaşmıştır (kontrole kıyasla 1.0 kat $p<0.001$). Sağlıklı hücre hattında ise, MLT ve ERG gruplarında her iki genin ekspresyon seviyesi, TMZ-MLT grubunda Smug ve Rad18 ifadesi dışında azalmıştır. RAD18 gen ekspresyon seviyesi ise, C6 hücre hattında tek başına TMZ uygulanan grupta (kontrole kıyasla sırasıyla 5.1 kat), N1E-115 hücre serisinde ise TMZ-PTX grubunda (kontrole kıyasla sırasıyla 3.3 kat) artmış, sağlıklı hücrelere ise ERG'ün uygulamasıyla daha düşük seviyede kaldığı belirlenmiştir (kontrole kıyasla 0.3 kat). DNA'da urasil varlığı genomik dengesizliğe yol açar, bu nedenle, urasilin DNA'dan uzaklaştırılması ve birleşmesinin önlenmesi için DNA bütünlüğünü koruyan mekanizmalar gereklidir. Normal koşullar altında, bu tür lezyonlar urasil-DNA glikosilazlar (UDG'ler) tarafından başlatılan baz eksizyon onarım yolu ile onarılır. Memeli hücrelerinde, urasili DNA'dan çıkaran dört UDG'den biri Smug1 genidir. Smug1 urasili tek ve çift sarmallı DNA'dan çıkarır (Synowiec vd. , 2014). UV ışınlarına maruz kalan hücre aktivitesinin DNA onarım proteini Rad18 tarafından düzenlendiği kabul edilmektedir. Rad18, UV ışınlarına maruz

kalmış hücrelerde çoğalan hücre nükleer antijenini (PCNA, bir DNA polimeraz işleme faktörü) mono-ubikitine eden bir ubiquitin ligazdır (Tanoue vd. , 2018). DNA translezon sentezi (TLS) yolağının kilit bir düzenleyicisi olarak, Rad18'in birçok kanser türünde anormal şekilde eksprese edildiği rapor edilmiştir. Normal beyin dokuları ile karşılaştırıldığında, Rad18'in ekspresyonu, hem mRNA'da hem de protein seviyelerinde, glioma dokularında, özellikle de radyasyona maruz kalan glioma dokularında önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca, ışınlama tedavisi (4 Gy) glioma hücrelerinde DNA hasarına bağlı olarak Rad18'in yukarı regülasyonunu sağladığı bildirilmiştir (Wu, 2019). Bu veriler ışığında, çalışmamızda Smug1 ve Rad18 genlerinde belirlediğimiz gen ekspresyon artışlarının TMZ ve TMZ ile birlikte kombine ajanlardan kaynaklı DNA hasarı sebebiyle oluştuğunu düşünülmektedir.

Çalışmada her iki Glioblastoma ve nöroblastoma hücre serisinde, en güçlü ısı şoku yanıtı, mitokondrial bir Hsp olan Hsp60 seviyelerinde belirlenmiştir. Bununla birlikte, ısı şoku yanıtı üzerinde, kombinasyon tedavileri içinde TMZ+MLT grubu en yüksek düzeyde etkiye sahipken bu grubu sırasıyla TMZ+PTX ve TMZ+ERG grupları takip etmiştir. Sağlıklı hücre serilerinde ise yalnız TMZ+PTX terapisi kontrole kıyasla, katlanmamış protein yanıtı olan Hsp90'ı kontrole kıyasla anlamlı seviyede artırmış, diğer Hsp gen ekspresyonları anlamlı bir değişim göstermemiştir. TMZ uygulamasına bağlı DNA hasarı ve ısı şoku yanıtı birçok çalışma ile gösterilmiştir. Çalışma bulgularımızı destekler şekilde, malignant glioma hücrelerinde TMZ uygulaması, önemli düzeyde DNA hasarı oluşturmuş, aynı zamanda HSPA1A and HSPB1 gen ekspresyonlarını indüklemiştir (Castro vd. , 2015). Benzer şekilde, TMZ anaplastik astrositoma beyin hücrelerinde Hsp27 ve Hsp70 over ekspresyonu ile sonuçlanmış, bunların baskılanması güçlü bir apoptotik ölüm yanıtı oluşturmuştur (Jakubowicz-Gil, Langner, Bądziul, Wertel, Rzeski, vd. , 2013). MLT pankreatik kanser hücreleri olan PANC-1 hücrelerinde, doza bağımlı olarak Hsp27 ve Hsp90 ekspresyonlarını arttırmış, aynı uygulama dozlarında Kaspaz bağımlı mitokondriyal apoptozu tetiklemiştir (Leja-Szpak vd. , 2007). Fare melonoma hücrelerinde, ERG uygulamasının, membrana lokalize Hsp70 ve Hsp25 gen ekspresyonunu artırdığı belirlenmiştir (Crul vd. , 2020). Bunun yanında, kanser hücrelerinde, Hsp ailesi proteinlerinde görülen yüksek ekspresyon seviyelerinin, ATP bağımlı enerji metabolizmasının bozulması, pro-apoptotik faktörlerin aktif hale geçmesi

ve endoplazmik retikulum stresi aracılı oksidatif stres artışı ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Sherman & Multhoff, 2007).

Nükleer faktör kB (Nf-kb), hücre hayatta kalması, inflamasyon ve bağışıklık gibi hücresel işlevlerle ilgili sayısız olayda rol oynar (Friedmann-Morvinski vd. , 2016). Nf-kb yolu, oksidatif stres, endoplazmik retikulum stres ve diğer hayatta kalışın temel belirleyicileri olan P13k / Akt güçlü bir ilişki içindedir (Schmitz, Shaban, Albert, Gökçen & Kracht, 2018). Kemoterapötik ilaca bağlı ve yapısal olarak aktif Nf-kb, beyin tümörlerinin gelişimi ve ilerlemesinde bildirilmiştir ve Nf-kb'nin aktivasyonunun tümör aşamasına, tedavi direncine ve kötü hayatta kalma sonuçlarına büyük katkısı nedeniyle, Nf-kb sinyal yolu ve aşağı akış hedefleri, potansiyel prognostik biyobelirteçler ve kolorektal kanser için yeni terapötik hedeflerdir (Friedmann-Morvinski vd. , 2016; Patel, Horgan, McMillan & Edwards, 2018).

İlaç kombinasyonları ile hedefe yönelik tedavi günümüzde kanser tedavisinde en önemli konulardan biridir. Şu anda, endotel büyüme faktörlerini, tümör nekroz faktörlerini, kaspaz kaskadlarını, apoptozu inhibe eden yolları (Nf-kb, Bcl-2 benzeri protein), apoptozu aktive eden yolları (P13k, Tnf- α , mTOR, Akt, P53) hedefleyen tedaviler ve katlanmamış proteinler, bu yanıt yollarına etki eden moleküller ile geliştirilmektedir. Bu tedavilerden bazıları başarılı olmuş ve FDA tarafından onaylanmıştır, ancak lisanslama ve aday moleküllerin hücresel sinyal yolları üzerindeki etkileri üzerine çalışmalar devam etmektedir (Vanneman & Dranoff, 2012). Tez kapsamında kanser hücresi yaşam sinyalleri P13k, Akt, mTOR ve Nf-kb gen ekspresyonları ile incelenmiştir. Çalışmamızda C6 hücre serisinde Nf-kb mRNA seviyesi artışı en az melatonin ve PTX kombinasyonlarında (kontrole kıyasla sırasıyla 2.1 ve 2.0 kat) tespit edilmiştir. GBM'de önemli bir düzenleyici olan yüksek Nf-kb aktivitesi, kötü prognoz ve kemoterapi ve radyasyona karşı artan dirençle ilişkilendirildiğinden (Yu vd. , 2019). bulgular, tek başına TMZ tedavisinin, C6 kanser hücreleri üzerinde, N1E-115 hücre serisinde ise, ayrıca PTX ile birlikte tedavinin yeterli bir antikanser etkiye sahip olmadığını gösterdi. Kanserli hücrede yükselen Nf-kb sinyali, melatonin ve ergosterol tedavisi tarafından bastırıldığında, Bax / Bcl-2 oranı ile doğru orantılı bir şekilde apoptozun, kanserli hücrelerde tek başına TMZ tedavisine göre daha fazla indüklendiği tespit edilmiştir. Transkripsiyon faktörü Nf-kb 'nin apoptozu baskılama kabiliyetinin sitotoksik tedavilere direnç sağladığı düşünülmektedir (Gong vd. , 2010). Western blot

analizi sonucuna dayalı olarak, C6 hücrelerinde, özellikle MLT ile tedaviden sonra, Ikb- α protein ekspresyon seviyesi artarak (kontrole kıyasla 2.1 kat) Nf-kb proteinin inhisionuna neden olmuştur (kontrole kıyasla 0.7 kat). N1E-115 hücre serisinde ise, Nf-kb gen ekspresyon seviyesi tek başına TMZ tedavisi ve MLT ile birlikte tedavide kontrol seviyesinde kalmış (kontrole kıyasla sırasıyla 1.0 ve 1.1 kat), PTX tedavisinde ise, en yüksek artışı göstermiştir (kontrole kıyasla 1.8 kat). Western Blot analizi sonucuna göre, N1E-115 hücre serisinde, TMZ-MLT uygulamasından sonra Nf-kb protein seviyesinde, Ikb- α 'nın artan (kontrole kıyasla 2.3 kat) protein ekspresyon seviyesi ile doğru orantılı azalma tespit edilmiştir (kontrole kıyasla 0.7 kat). Yapılan bir çalışmada, Nf-kb faktörünün, pankreas adenokarsinom hücrelerinin çekirdeğinde yapısal olarak aktive edildiği ve anti-apoptotik sinyallerde bir artışa yol açtığı da bulunmuştur (Papademetrio vd. , 2016). 2006 yılında Martin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, MLT hem invitro hem de invivo glioma hücre proliferasyonunu baskıladığını ve bunun Nf-kb gibi anahtar hücre içi efektörler üzerindeki inhibitör etkisi ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Ma vd. , 2018). Bu bilgi, MLT'in, tez kapsamında da Nf-kb de hem gen hem de protein ifade seviyesindeki azalmaya bağlı inhibisyona neden olması yönü ile sonucumuzu destekler niteliktedir. Bazal durumda, çoğu Nf-kb dimeri, Ikb proteinleri adı verilen spesifik inhibe edici proteinlere bağlanır ve pro-inflamatuar sinyaller, esas olarak Ikb kinaza (IKK) bağlı fosforilasyon ve inhibitör Ikb proteinlerinin degradasyonu yoluyla Nf-kb'yi aktive eder (Krishnan & Feldman, 2011). Nf-kb aktif hale geldiğinde, Nf-kb inhibitör proteini Ikb- α seviyelerinde azalma meydana gelmektedir (Vanoirbeek vd. , 2011). C6 hücre serisinde, Ikb- α gen ekspresyon seviyesi nispeten kontrol seviyelerinde kalmasına rağmen kontrol grubu değerlerinden yüksekti. Kontrol ve diğer kombin grup verileri karşılaştırıldığında Nf-kb seviyesi en az ve Ikb- α seviyesi en fazla olan uygulama grubu Melatonin ile yapılan tedavi stratejisi olarak tespit edilmiştir. N1E-115 hücre serisinde ise, Ikb- α , TMZ-MLT grubunda kontrol seviyesinde kalmış, diğer tüm gruplarda ise kontrol seviyesinden daha az transkripsiyona uğradığı dolayısıyla Ikb- α 'nın bu tedavilerle inhibe edildiği düşünülmüştür.

P13k / Akt / mTOR yolu kanser hücresi büyümesi, hayatta kalma, metabolik programlama, otofaji, transkripsiyon regülasyonu ve anjiyogenezde çok yönlü rol oynar. P13k, bölünmüş bir enzim ailesini içerir. Sınıf I PI3K, katalitik ve düzenleyici alt birimleri içerir. Akt olarak da bilinen protein kinaz B (PKB), P13k'nın ana vektörüdür. Akt,

proliferasyonu ve hücre döngüsü ilerlemesini, apoptozu, protein sentezini ve hücre büyümesini indükleyen geniş aşağı yönlü hedefleri etkiler. Akt, mTOR'u fosforilasyonla doğrudan yada Ras homoloğu üzerinden dolaylı olarak aktive ettiği iki mekanizmaya sahiptir (Ghoneum & Said, 2019). P13k yolağının, kanserlerde sıklıkla aktive olduğu ve farklı tümör tiplerinin habis fenotipinin tümörijenезine veya sürdürülmesine devam eden aktivasyonu tarafından yönlendirildiği göz önüne alındığında, yapılan çalışmalar farklı anatomik bölgelerden gelen tümörlerin, malign fenotiplerinin korunmasının bu yolun devam eden aktivasyonuna bağlı olduğunu göstermektedir (Downward & Weigelt, 2012). Çalışmada, C6 hücre serisinde P13k, Akt ve mTOR ekspresyonlarının özellikle ergosterol tedavisi ile tek başına TMZ uygulanan gruba göre belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiştir (kontrole kıyasla sırasıyla 1.3, 1.8 ve 2.1 kat). Bu nedenle, ergosterol tarafından P13k / Akt / mTOR ekspresyonunun aşağı regülasyonu, kanserli hücrelerin proliferasyonunun inhibisyonuna katkıda bulunabileceği değerlendirilmektedir. Western Blot analizine göre, C6 hücre serisinde, Nf-kb ile doğru orantılı bir şekilde, P13k-Akt yoluda inhibisyona uğramış ve özellikle melatonin tedavisiyle düzeyleri anlamlı derecede düşmüştür (kontrole kıyasla sırasıyla 0.3 ve 0.6 kat). N1E-115 hücre serisinde de P13k / Akt / mTOR sinyal yolağı indüksiyonunun en düşük olarak tek başına TMZ tedavisi ile sağlandığı belirlenmiştir (kontrole kıyasla sırasıyla 0.5, 1.2 ve 1.3 kat). ERG, siklooksijenaz-2 (Cox-2) performansını inhibe eder (Chuang, Hsieh & Lee, 2020). ERG ve türevlerinin anti-enflamatuar etkisinin mekanizmalarından biri, hücre çekirdeğine Nf-kb translokasyonunun inhibisyonu ve dolayısıyla proinflamatuar genlerin ekspresyonunun önlenmesidir (Singh & Passari, 2019). Bu bilgi, çalışma kapsamında, N1E-115 hücre serisinde COX2 gen ifadesinin TMZ-ERG uygulanan grupta azalmasını (kontrole kıyasla 0.9 kat) ve C6 hücre serisinde ise Melatonin ile kombine tedavi dışındaki tek başına TMZ ve Ergosterol ile birlikte tedavi gruplarında (kontrole kıyasla sırasıyla 1.1 ve 1.2 kat) kontrole neredeyse aynı seviyede kalmasını açıklamaktadır. Western Blot analiz sonucuna göre N1E-115 hücre serisinde, P13k seviyesinde düşüş (kontrole kıyasla 0.5 kat) görülmüş, akt seviyesi kontrole göre artmış, ancak bu artış istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır (kontrole kıyasla 1.3 kat).

Programlanmış hücre ölüm mekanizması diğer bir değişle Apoptoz, birçok kanserde düzensizdir ve tümörlerin tedavisini zorlaştırır. Normal apoptotik yolları eski haline getiren ilaçlar, hayatta kalmak için apoptotik yolun anormalliklerine bağlı

kanserleri etkili bir şekilde tedavi etme potansiyeline sahiptir. Şu anda, neredeyse tüm kanser ilaçlarında, nihai hedef tümörlerdeki kanser hücrelerini, diğer hücrelere zarar vermeden programlanmış olarak ölüme götürebilmektir (Fesik, 2005). Apoptoz mekanizması içsel (mitokondrial apoptoz) ve dışsal (ölüm reseptörleri) yolak olmak üzere iki farklı moleküler sinyal ile oluşmasına rağmen her iki tiptede Kaspazlar ve özellikle mitokondri temel bir rol oynar (Mullard, 2016). Kaspaz proteaz aktivitesi, apoptoz için gereklidir; Kaspazlar aktif olduktan sonra yüzlerce farklı proteini parçalayarak farklı biyokimyasal ve morfolojik özellikler ile hızlı hücre ölümüne yol açar (Taylor, Cullen & Martin, 2008). Birçok alkileyici ve antineoplastik kanser ilacı, mitokondriyal yol aracılığıyla apoptozu indükler; bu süreçte tanımlayıcı olay mitokondriyal dış zar geçirgenliğidir (Fesik, 2005). Mitokondrial membran geçirgenliği bozulduğunda, mitokondriyal zarlar arası boşluk proteinleri, özellikle sitokrom c sitozole salınır ve bunun üzerine kaspazları aktive ederler. Mitokondriyal ATP üretiminde, sitokrom-c, elektron taşıma zincirinin III ve IV kompleksleri arasında elektronları hareket ettiren önemli bir günlük işe sahiptir. Bununla birlikte, mitokondriden salındığında, sitokrom c, Kaspaz aktivasyonu için gerekli olan öldürücü bir işlevi benimser. Sitozole girdikten sonra, Sitokrom-c adaptör molekülü Apaf 1'i bağlar; bu, Apaf 1'de kapsamlı konformasyonel değişikliklere yol açarak onun oligomerize olmasına ve apoptozom adı verilen heptamerik bir yapı oluşturmaya neden olur. Apoptozom, pro-kaspaz 9'u aktive eder ve bu da, uygulayıcı kaspaz 3 ve 7'yi böler ve aktive eder. Cellat kaspaz aktivitesi, yüzlerce farklı substratın paralel bölünmesi yoluyla hücreyi dakikalar içinde etkili bir şekilde öldürür (Fulda & Debatin, 2004). Diğer yol, ölüm reseptörleri yoludur ve bu yolda Tnf- α ve Kaspaz 8 ana oyuncularındır. Bu yolda Tnf- α ile aktif hale gelen kaspaz 8, Bıd proteini keserek mitokondrial apoptosis sürecini başlatabilir. Tnf- α doğrudan Trail aktivasyonu ile apoptozu indükleyebilir, ya da ortamda pro-apoptotik efektörler yoksa doğrudan Tnf- α / Kaspaz 8 eksenini ile nekrotik hücre ölümünü tetikler (Dickens, Powley, Hughes & MacFarlane, 2012).

Tez kapsamında, TMZ ve TMZ ile kombinasyon halinde kullanılan MLT, ERG ve PTX'in, apoptoz yolağı üzerindeki etkisi, içsel apoptoz yolağı (Bcl-2, Bax, Cyt-c, Apaf 1, Kaspaz 3), dışsal yolak (Tnf- α ve Kaspaz 8) gen ve ana protein ekspresyonları kullanılarak, aynı zamanda apoptozun başlangıç aşamasında yer alan hücre siklus kontrol genleri p21^{Chip1}, p27^{Kip1} ve ana apoptoz indükleyici faktör olan tümör süpresör P53

ekspresyonları ile birlikte analiz edilmiştir. Yapılan çalışmada, C6 hücre serisinde, TMZ ve TMZ ile birlikte oluşturulan tüm kombinasyon tedavileri, hücre siklus kontrol noktaları olan, p27^{Kip1} üzerinde önemli bir etki oluşturmazken, P21^{Chip1} gen ekspresyonu anlamlı düzeyde artırmıştır. Bu tedaviler içinde özellikle TMZ ve TMZ MLT kombinasyonu, apoptozun ana tetikleyicilerinden olan tumor supresor p53 ekspresyonunu tetiklemiş, ve sonrasında bax, cyt-c gen ekspresyonu ve kaspaz 3 protein seviyesindeki artışla kapsamlı bir apoptoz sinyali oluşturmuştur. TMZ+MLT grubunun aynı zamanda Tnf- α / Kaspaz 8 eksenini de aktive ettiği ve bu kombinasyon tedavisinde ölümün, apoptotik ve nekrotik yolla oluştuğu görülmüştür. C6 hücre serisinde, apoptoz indüksiyonu açısından MLT kombinasyonunu, PTX takip etmiş, en az apoptotik etki TMZ+ERG kombinasyonunda bulunmuştur. N1E-115 hücre serisinde ise, TMZ+ERG grubu haricinde, tüm kombinasyon tedavileri, güçlü bir hücre tutuklaması göstermiş, aynı zamanda P53 gen ekspresyon seviyesi artmıştır. Ancak bununla birlikte mitokondrial apoptoz yolağı aktivasyonu, tüm uygulama gruplarında C6 hücre serisine göre düşük seviyede belirlenmiştir. Apoptoz yolağı protein seviyeleri gen ekspresyon sonuçlarını doğrulamış ve ölümün özellikle Kaspaz 8 yolu üzerinden olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle TMZ ile oluşturulan kombinasyon tedavileri sağlıklı beyin astrosit hücreleri üzerinde oldukça düşük bir apoptoz sinyali oluşturmuş, bir çok kombinasyon grubunda pro-apoptotik gen ekspresyonları kontrole kıyasla anlamlı bir değişim göstermemiştir. TMZ beyin tümörleri üzerinde apoptoz hedefli güçlü bir antikanser ajan olduğu bir çok çalışma ile gösterilmiştir. TG98 beyin tümör hücreleri üzerinde TMZ uygulaması hücre siklusunu G1 fazında durudurken, aynı zamanda mitokondria membran potansiyelini , bozmuş, Cyt-c salınımı artırmış, nihayetinde Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 seviyesini artırarak güçlü bir mitokondrial apoptoz sinyali oluşturmuştur (Jakubowicz-Gil, Langner, Bądziul, Wertel, Rzeski, vd. , 2013; Jakubowicz-Gil, Langner, Bądziul, Wertel & Rzeski, 2013). Benzer şekilde, Glioblastoma, U87MG ve GaMG tümör hücre ve tümör küreciklerinde, TMZ uygulaması, güçlü bir DNA hasarı aynı zamanda apoptotik ölüm oluşturmuştur (Günther, Pawlak, Damasceno, Arnold & Terzis, 2003). Yapılan başka bir çalışmada U25 hücrelerinde, TMZ'nin apoptozu tetiklediği bildirilmiştir (Shen, Hu & Zheng, 2014). Bu bulgular çalışmada özellikle C6 ve N1E-115 hücre serileri üzerinde, tali apoptoz analizi, western blot analizi ve qRT-PCR ile elde ettiğimiz TMZ'nin tek başına uygulamasının hücrelerde apoptozu tetiklediği ve bu yolun özellikle C6 hücrelerinde hem P53 / Bcl-2 /

Bax / Kaspaz 3 hem de Tnf- α / Kaspaz 8 eksenini ile oluştuğu bulgularımızı desteklemektedir. Tez kapsamında TMZ nin Melatonin ile kombine edildiği gruplarda, kanser hücrelerinde güçlü bir apoptoz sinyali oluşmuş, aynı zamanda hücre ölümünde sinerjistik bir etki belirlenmiştir. Çalışma bulgularımızı doğrular şekilde, Melatoninin hepatosellüler karsinom (HCC) üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, melatonin tedavisinin fare HCC'lerinde P21 ve P53 ekspresyonunda artışı indüklemiş, daha yüksek Bax / Bcl-2 oranı oluşturmuştur (Sánchez vd. , 2018). A172 ve U87-MG glioblastoma hücrelerine tek başına Melatonin ve 3-MA ile birlikte Melatonin tedavisi uygulanmış, tekli tedavi etkinliğinin düşük kalmasına karşın, birlikte tedavi, Glioblastoma hücrelerindeki apoptotik hücre popölasyonunu önemli ölçüde artırmış, bunun yanı sıra Bcl-2 ekspresyonunda belirgin bir azalma ve bax ekspresyon seviyelerinde artışla birlikte, Glioblastoma hücrelerinde Melatonin kaynaklı apoptozu tetiklemiştir (Zhou, Wei & Qi, 2019). İnsan hepatosellüler karsinom HepG2 hücrelerinde, Ergosterol peroksit ile tedavinin, proapoptotik proteinler olan Puma ve Bax seviyelerini etkili bir şekilde arttırdığı ve apoptotik ölümü indüklediği gösterilmiştir. Tez kapsamında, Ergosterol ile birlikte tedavi her iki tümör hücre serisinde bax gen ifadesini arttırmış özellikle C6 hücre serisinde seviye olarak N1E-115 hücre serisinden daha fazla miktarda ifade edilmiş ve apoptozu indüklemiştir. Çalışma bulgularımızı destekleyen bir diğer çalışmada, *Agaricus blazei* (A. Blazei)'den, elde edilen Ergosterol türevi pulmoner adenokarsinoma A549 ve oral skuamöz karsinoma HSC-3 hücrelerine uygulanmış, Bcl-2 seviyesi tedaviden sonra azalırken, bax protein ekspresyonu zamana bağlı bir şekilde artmış ve Kaspaz bağımlı apoptotik ölüm belirlenmiştir (Shimizu vd. , 2016).

BÖLÜM 6

SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında, glioblastoma ve nöroblastoma beyin tümörlerindeki güncel kemoterapi rejimine alternatif olarak sunduğumuz melatonin ve ergosterol ile birlikte temozolomid tedavisinin paklitaksel ile birlikte kullanılan tedavi kadar antiprolatif etki gösterdiği ve bunun yanısıra, sağlıklı hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri temozlomid+paklitaksel tedavisine kıyasla azalttığı belirlendi.

Melatonin ve ergosterol, kombine uygulamalarında, etkili bir kemoterapi için gerekli olan temozolomid dozunu yarı yarıya azaltmayı başardı. Birincil sırada melatonin sonrasında ergosterol hem C6 hem de N1E-115 hücre serilerinde, TMZ $\frac{1}{2}$ IC₅₀ ile oluşturulan kombinasyon tedavilerinde, TMZ IC₅₀ dozunda elde edilen sitotoksik etkiden daha güçlü bir etki gösterdi.

Kombinasyon terapileri, özellikle de TMZ+MLT uygulaması, her iki hücre serisinde, başlangıçta oksidatif stresi indükledi, buna bağlı olarak DNA hasarı oluşturdu, oluşan bu DNA hasarı katlanmamış ya da hatalı katlanmış protein oluşumuna sebep oldu. Bu olumsuz hücre içi ve hücre mikroçevre koşulları her iki tip beyin tümöründe, Nf-kb inhibisyonu sonrası hücre tutuklaması genlerini ve son olarak tümör süpresör P53 gen ekspresyonunu indükleyerek güçlü bir apoptoz sinyali oluşturdu.

Annexin V-PI apoptoz etki değerlendirme analizine göre, özellikle C6 hücre serisinde N1E-115 hücre serisine kıyasla, melatonin ve ergosterolün paklitaksel tedavisine göre ölümü apoptotik yoldan istatistiksel olarak anlamlı seviyede daha güçlü indüklediği tespit edildi. Her iki hücre hattında hem P53 / Bcl-2 / Bax / Kaspaz 3 hem de Tnf- α -Kaspaz 8 eksenini aktivasyonu belirlendi.

Üstelik oluşan bu etki kanser hücreleri için seçiciydi, ve özellikle melatonin bunu takip edecek şekilde ergosterol, temozlomid ile birlikte oluşturulan kombinasyon

tedavilerinde, sağlıklı astrosit hücreleri üzerinde tek başına temozolomid uygulamalarına kıyasla anlamlı seviyede daha düşük sitotoksite gösterdi.

Çalışmamızın yalnız iki adet beyin tümör hücre serisi kullanılması, bunlara yalnız melatonin, ergosterol ve paklitakselin IC₅₀ dozlarının kombine uygulanması, aynı zamanda elde edilen sonuçların yüksek yapılı deney hayvanı modelleri ile desteklenmemesinden kaynaklanan temel bazı limitasyonları vardır. Ancak buna rağmen, elde ettiğimiz kapsamlı moleküler verilerin ve bunları destekleyen spesifik boyama ve western blot analizlerinin, kullandığımız ajanlar ve temozolomid ile kombine yaptığımız kemoterapi rejimlerinin beyin tümörleri üzerindeki etkisine ait temel bazı klinik senaryoları açıkladığını düşünüyoruz.

Sonuç olarak, kullanılan kemoterapi ajanları ile doz ve zamana bağlı etkileşen, bazal ve etki spesifik ekspresyon seviyeleri belirlenen ve ölüm mekanizmalarında görevli moleküler sinyallerin ilaç geliştirme ve klinik seviyedeki çalışmalara, önemli hedef noktaları olarak ışık tutabileceğini ve sunduğumuz kemoterapi kombinasyonlarının glioma ve nöroblastoma hastalarında tedavi için yeni bir klinik strateji olarak test edilebileceğini öneriyoruz.

ÖZGEÇMİŞ

İlk ve Orta öğrenimini Şükrüpaşa İlköğretim okulunda, Liseyi Edirne Lisesinde tamamladı. Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümünde Lisansını, Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümünde ise Yüksek Lisansını tamamladı. Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Merkezi'nde (TÜTAGEM) iş hayatına başladı. Trakya Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümünde Öğretim Görevlisi olarak görevine devam etmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbastabar, M., Kheyrollah, M., Azizian, K., Bagherlou, N., Tehrani, S. S., Maniati, M., & Karimian, A. J. D. r. (2018). Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth: A double-edged sword protein. *DNA repair*, 69, 63-72.
- Ackermann, S., Cartolano, M., Hero, B., Welte, A., Kahlert, Y., Roderwieser, A., . . . Kerschke, L. J. S. (2018). A mechanistic classification of clinical phenotypes in neuroblastoma. *Science*, 362(6419), 1165-1170.
- Aikins, M. E., Xu, C., & Moon, J. J. J. A. o. C. R. (2020). Engineered Nanoparticles for Cancer Vaccination and Immunotherapy. *Accounts of Chemical Research*, 53(10), 2094-2105.
- Al-Rabia, M. W., Mohamed, G. A., Ibrahim, S. R. M., & Asfour, H. Z. J. N. P. R. (2020). Anti-inflammatory ergosterol derivatives from the endophytic fungus *Fusarium chlamydosporum*. *Natural product research*, 1-10.
- Albayrak, D., Doğanlar, O., Erdoğan, S., Meraklı, M., Doğan, A., Turker, P., . . . Doğanlar, Z. B. J. B. G. (2021). Naringin Combined with NF-κB Inhibition and Endoplasmic Reticulum Stress Induces Apoptotic Cell Death via Oxidative Stress and the PERK/eIF2α/ATF4/CHOP Axis in HT29 Colon Cancer Cells. *Biochemical Genetics*, 59(1), 159-184.
- Albensi, B. C. J. F. i. c., & biology, d. (2019). What is nuclear factor kappa B (NF-κB) doing in and to the mitochondrion? *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 154.
- Alexander, B. M., & Cloughesy, T. F. J. J. o. C. O. (2017). Adult glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 35(21), 2402-2409.
- Alexiou, G. A., Gerogianni, P., Vartholomatos, E., & Kyritsis, A. P. (2016). Deferiprone Enhances TMZe Cytotoxicity in Glioma Cells. *Cancer investigation*, 34(10), 489-495. doi:10.1080/07357907.2016.1233424
- Alifieris, C., & Trafalis, D. T. (2015). Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacology & therapeutics*, 152, 63-82. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.05.005
- Alliot, F., Marty, M.-C., Cambier, D., & Pessac, B. J. D. b. r. (1996). A spontaneously immortalized mouse microglial cell line expressing CD4. *Developmental brain research*, 95(1), 140-143.
- Alliot, F., & Pessac, B. J. B. r. (1984). Astrocytic cell clones derived from established cultures of 8-day postnatal mouse cerebella. *Brain research*, 306(1-2), 283-291.
- Amano, T., Richelson, E., & Nirenberg, M. J. P. o. t. N. A. o. S. (1972). Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(1), 258-263.
- Anitha, V., & Murugavalli, S. J. I. c. v. (2016). Brain tumour classification using two-tier classifier with adaptive segmentation technique. *IET computer vision*, 10(1), 9-17.

- Annovazzi, L., Mellai, M., & Schiffer, D. J. C. (2017). Chemotherapeutic drugs: DNA damage and repair in glioblastoma. *Cancers*, 9(6), 57.
- Apaydin, M. (2020). Secondary Brain Tumors. In *Atlas of Clinical Cases on Brain Tumor Imaging* (pp. 249-260): Springer.
- Arvanitis, C. D., Ferraro, G. B., & Jain, R. K. J. N. R. C. (2020). The blood–brain barrier and blood–tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nature Reviews Cancer*, 20(1), 26-41.
- Ashkenazi, A. J. C., & reviews, g. f. (2008). Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine & growth factor reviews*, 19(3-4), 325-331.
- Avci, N. G., Ebrahimzadeh-Pustchi, S., Akay, Y. M., Esquenazi, Y., Tandon, N., Zhu, J.-J., & Akay, M. J. S. R. (2020). NF- κ B inhibitor with TMZ results in significant apoptosis in glioblastoma via the NF- κ B (p65) and actin cytoskeleton regulatory pathways. *Scientific Reports*, 10(1), 1-14.
- Barciszewska, A.-M., Gurda, D., Głodowicz, P., Nowak, S., & Naskręt-Barciszewska, M. Z. J. P. O. (2015). A new epigenetic mechanism of temozolomide action in glioma cells. *New Biotechnology*, 10(8), e0136669.
- Basyony, M. A., El Desouki, N. I., Abdo, W. S., Hegazy, R. A., & Mohamed, Y. J. T. E. J. O. E. B. (2019). Melatonin improves the anticancer effects of mesenchymal stem cell against HCC in rat. *The Egyptian Journal Of Experimental Biology (Zoology)*, 15(2), 111-126.
- Batiuk, M. Y., Martirosyan, A., Wahis, J., de Vin, F., Marneffe, C., Kusserow, C., . . . Voet, T. J. N. c. (2020). Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution. *Nature communications*, 11(1), 1-15.
- Batra, S., & Wistinghausen, B. J. M. S. E. G. O. (2019). Pediatric Cancer: Solid Tumors and Lymphoma. *Mount Sinai Expert Guides: Oncology*, 543-555.
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., & Sweet, W. J. S. (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, 161(3839), 370-371.
- Berthold, F., & Hero, B. J. D. (2000). Neuroblastoma. *Drugs*, 59(6), 1261-1277.
- Bhowmik, A., Khan, R., & Ghosh, M. K. (2015). Blood brain barrier: a challenge for effectual therapy of brain tumors. *BioMed research international*, 320941. doi:10.1155/2015/320941
- Boire, A., Brastianos, P. K., Garzia, L., & Valiente, M. J. N. R. C. (2020). Brain metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 20(1), 4-11.
- Bolderson, E., Tomimatsu, N., Richard, D. J., Boucher, D., Kumar, R., Pandita, T. K., . . . Khanna, K. K. J. N. a. r. (2010). Phosphorylation of Exo1 modulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks. *Nucleic acids research*, 38(6), 1821-1831.
- Bostwick, D. G., Alexander, E. E., Singh, R., Shan, A., Qian, J., Santella, R. M., . . . Jiang, X. J. C. (2000). Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. *Cancer*, 89(1), 123-134.
- Braun, S., Bauer, I., Pannen, B., & Werdehausen, R. (2015). Pretreatment but not subsequent coincubation with midazolam reduces the cytotoxicity of TMZ in neuroblastoma cells. *BMC Anesthesiol*, 15, 151. doi:10.1186/s12871-015-0135-4
- Brodeur, G. M. J. C., & research, t. (2018). Spontaneous regression of neuroblastoma. *Cell and tissue research*, 372(2), 277-286.
- Bui, L., Hendricks, A., Wright, J., Chuong, C. J., Dave, D., Bachoo, R., & Kim, Y. T. (2016). Brain Tumor Genetic Modification Yields Increased Resistance to

- Paclitaxel in Physical Confinement. *Scientific reports*, 6(1), 1-10. doi:10.1038/srep26134
- Bunevicius, A., McDannold, N. J., & Golby, A. J. J. O. N. (2020). Focused ultrasound strategies for brain tumor therapy. *Operative Neurosurgery*, 19(1), 9-18.
- Caffery, B., Lee, J. S., & Alexander-Bryant, A. A. J. N. (2019). Vectors for glioblastoma gene therapy: viral & non-viral delivery strategies. *Nanomaterials*, 9(1), 105.
- Cai, H. Q., Liu, A. S., Zhang, M. J., Liu, H. J., Meng, X. L., Qian, H. P., & Wan, J. H. (2020). Identifying Predictive Gene Expression and Signature Related to TMZe Sensitivity of Glioblastomas. *Frontiers in Oncology*, 10, 669. doi:10.3389/fonc.2020.00669
- Cappello, F., Conway de Macario, E., Marasà, L., Zummo, G., Macario, A. J. J. C. b., & therapy. (2008). Hsp60 expression, new locations, functions, and perspectives for cancer diagnosis and therapy. *Cancer biology & therapy*, 7(6), 801-809.
- Carén, H., Abel, F., Kogner, P., & Martinsson, T. J. B. J. (2008). High incidence of DNA mutations and gene amplifications of the ALK gene in advanced sporadic neuroblastoma tumours. *Biochemical Journal*, 416(2), 153-159.
- Castro, G. N., Cayado-Gutiérrez, N., Zoppino, F. C. M., Fanelli, M. A., Cuello-Carrión, F. D., Sottile, M., . . . Chaperones. (2015). Effects of TMZe (TMZ) on the expression and interaction of heat shock proteins (HSPs) and DNA repair proteins in human malignant glioma cells. *Cell Stress and Chaperones*, 20(2), 253-265.
- Chen, K. W., Demarco, B., Heilig, R., Shkarina, K., Boettcher, A., Farady, C. J., . . . Broz, P. J. T. E. j. (2019). Extrinsic and intrinsic apoptosis activate pannexin-1 to drive NLRP 3 inflammasome assembly. *The EMBO journal*, 38(10), e101638.
- Chen, Y., Maguire, T., & Marks, R. M. J. J. o. v. (1996). Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *Journal of virology*, 70(12), 8765-8772.
- Chen, Y., Swanson, R. A. J. J. o. C. B. F., & Metabolism. (2003). Astrocytes and brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 23(2), 137-149.
- Cheng, Y., Morshed, R. A., Auffinger, B., Tobias, A. L., & Lesniak, M. S. (2014). Multifunctional nanoparticles for brain tumor imaging and therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 66, 42-57. doi:10.1016/j.addr.2013.09.006
- Choi, S.-K., Kam, H., Kim, K.-Y., Park, S. I., & Lee, Y.-S. J. C. (2019). Targeting heat shock protein 27 in cancer: a druggable target for cancer treatment? *Cancers*, 11(8), 1195.
- Chua, J., Nafziger, E., & Leung, D. J. C. O. R. (2019). Evidence-based practice: TMZe beyond glioblastoma. *Current oncology reports*, 21(4), 30.
- Chuang, W. Y., Hsieh, Y. C., & Lee, T. T. (2020). The Effects of Fungal Feed Additives in Animals: A Review. *Animals (Basel)*, 10(5). doi:10.3390/ani10050805
- Cohen, J., & Torres, C. J. A. c. (2019). Astrocyte senescence: evidence and significance. *Aging cell*, 18(3), e12937.
- Concannon, C., Gorman, A., & Samali, A. J. A. (2003). On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis*, 8(1), 61-70.
- Constantinidou, A., Alifieris, C., Trafalis, D. T. J. P., & therapeutics. (2019). Targeting programmed cell death-1 (PD-1) and ligand (PD-L1): a new era in cancer active immunotherapy. *Pharmacology & therapeutics*, 194, 84-106.
- Cregan, S. P., Dawson, V. L., & Slack, R. S. J. O. (2004). Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene*, 23(16), 2785-2796.

- Crul, T., Csoboz, B., Gombos, I., Marton, A., Peter, M., Balogh, G., . . . Vigh, L. J. C. (2020). Modulation of Plasma Membrane Composition and Microdomain Organization Impairs Heat Shock Protein Expression in B16-F10 Mouse Melanoma Cells. *Cells*, 9(4), 951.
- D'Arcy, M. S. J. C. b. i. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, 43(6), 43(6), 582-592.
- Daniel, P., Sabri, S., Chaddad, A., Meehan, B., Jean-Claude, B., Rak, J., & Abdulkarim, B. S. J. F. i. o. (2019). Temozolomide induced hypermutation in glioma: evolutionary mechanisms and therapeutic opportunities. *Frontiers in oncology*, 9, 41.
- Davis, M. E. (2016). Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clinical journal of oncology nursing*, 20(5 Suppl), S2-8. doi:10.1188/16.CJON.S1.2-8
- de Melo, M. T., Piva, H. L., & Tedesco, A. C. (2020). Design of new protein drug delivery system (PDDS) with photoactive compounds as a potential application in the treatment of glioblastoma brain cancer. *Materials Science and Engineering: C* 110, 110638. doi:10.1016/j.msec.2020.110638
- Delgado-Lopez, P. D., & Corrales-Garcia, E. M. (2016). Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. *Clinical and Translational Oncology*, 18(11), 1062-1071. doi:10.1007/s12094-016-1497-x
- Desai, S. J., Prickril, B., Rasooly, A. J. N., & cancer. (2018). Mechanisms of phytonutrient modulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) and inflammation related to cancer. *Nutrition and cancer*, 70(3), 350-375.
- Dexheimer, T. S. (2013). DNA repair pathways and mechanisms. In *DNA repair of cancer stem cells* (pp. 19-32): Springer.
- Di Bella, G., Mascia, F., Gualano, L., & Di Bella, L. J. I. j. o. m. s. (2013). Melatonin anticancer effects. *International journal of molecular sciences*, 14(2), 2410-2430.
- Diaz, R. J., Ali, S., Qadir, M. G., Macarena, I., Ivan, M. E., & Komotar, R. J. J. J. o. n.-o. (2017). The role of bevacizumab in the treatment of glioblastoma. *Journal of neuro-oncology*, 133(3), 455-467.
- Dickens, L. S., Powley, I. R., Hughes, M. A., & MacFarlane, M. J. E. c. r. (2012). The 'complexities' of life and death: death receptor signalling platforms. *Experimental cell research*, 318(11), 1269-1277.
- Dixit, K., & Kumthekar, P. J. C. o. r. (2017). Gene delivery in neuro-oncology. *Current oncology reports*, 19(11), 69.
- Doan, P., Musa, A., Candeias, N. R., Emmert-Streib, F., Yli-Harja, O., & Kandhavelu, M. J. F. i. p. (2019). Alkylaminophenol induces G1/S phase cell cycle arrest in glioblastoma cells through p53 and cyclin-dependent kinase signaling pathway. *Frontiers in pharmacology*, 10, 330.
- Doğanlar, O., Doğanlar, Z. B., Kurtdere, A. K., Chasan, T., Ok, E. S. J. E., & Safety, E. (2020). Chronic exposure of human glioblastoma tumors to low concentrations of a pesticide mixture induced multidrug resistance against chemotherapy agents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 202, 110940.
- Donmez, H., Kocak, N., & Yildirim, I. H. (2017). Investigation of autophagic effects of melatonin on breast cancer stem cells. *Biomedical Research*, 28, 11
- Dou, H., Mitra, S., & Hazra, T. K. J. J. o. B. C. (2003). Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 49679-49684.

- Downward, J., & Weigelt, B. J. F. i. o. (2012). Genomic determinants of PI3K pathway inhibitor response in cancer. *Frontiers in oncology*, 2, 109.
- Dröge, W. J. P. r. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*.
- Du, P., Zhao, H., Peng, R., Liu, Q., Yuan, J., Peng, G., & Liao, Y. J. B. r. (2017). LncRNA-XIST interacts with miR-29c to modulate the chemoresistance of glioma cell to TMZ through DNA mismatch repair pathway. *Bioscience reports*, 37(5).
- Dunn-Pirio, A. M., & Vlahovic, G. (2017). Immunotherapy approaches in the treatment of malignant brain tumors. *Cancer*, 123(5), 734-750. doi:10.1002/cncr.30371
- Dupont, S., Lemetais, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P., & Beney, L. J. E. I. J. o. O. E. (2012). Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? , *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 66(9), 2961-2968.
- Ekert, P. G., & Vaux, D. L. J. C. o. i. c. b. (2005). The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Current opinion in cell biology*, 17(6), 626-630.
- Elmallah, M. I., Cordonnier, M., Vautrot, V., Chanteloup, G., Garrido, C., & Gobbo, J. J. C. L. (2020). Membrane-anchored heat-shock protein 70 (Hsp70) in cancer. *Cancer letters*, 469, 134-141.
- Elmore, S. J. T. p. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Erdemoğlu, N., & Şener, B. (2000). Taksan Sınıfı Bileşiklerin Antitümör Etkileri: The Antitumor Effects Of The Taxane Class Compounds. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 29(1)77-90
- Erland, L. A., & Saxena, P. J. P. o. (2019). Auxin driven indoleamine biosynthesis and the role of tryptophan as an inductive signal in *Hypericum perforatum* (L.). *PloS one*, 14(10), e0223878.
- Farago, A. F., Yeap, B. Y., Stanzione, M., Hung, Y. P., Heist, R. S., Marcoux, J. P., . . . Phat, S. J. C. d. (2019). Combination olaparib and temozolomide in relapsed small-cell lung cancer. *Cancer discovery*, 9(10), 1372-1387.
- Feldman, L., & Chen, M. (2020). Delivery of Antineoplastic Therapeutics to the Central Nervous System. In *Cancer Regional Therapy* (pp. 427-438): Springer.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D., Piñeros, M., . . . Bray, F. J. I. j. o. c. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International journal of cancer*, 144(8), 1941-1953.
- Ferris, S. P., Hofmann, J. W., Solomon, D. A., & Perry, A. J. V. A. (2017). Characterization of gliomas: from morphology to molecules. *Virchows Archiv*, 471(2), 257-269.
- Fesik, S. W. J. N. R. C. (2005). Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nature Reviews Cancer*, 5(11), 876-885.
- Fisher, J. L., Schwartzbaum, J. A., Wrensch, M., & Wiemels, J. L. J. N. c. (2007). Epidemiology of brain tumors. *Neurologic clinics*, 25(4), 867-890.
- Franklin, J. L. J. A., & signaling, r. (2011). Redox regulation of the intrinsic pathway in neuronal apoptosis. *Antioxidants & redox signaling*, 14(8), 1437-1448.
- Friedmann-Morvinski, D., Narasimamurthy, R., Xia, Y., Myskiw, C., Soda, Y., & Verma, I. M. J. S. A. (2016). Targeting NF-κB in glioblastoma: A therapeutic approach. *Science Advances*, 2(1), e1501292.

- Fulda, S., & Debatin, K.-M. J. C. c. d. t. (2004). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *Current cancer drug targets*, 4(7), 569-576.
- Gallego, O. (2015). Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma. *Current oncology*, 22(4), e273-281. doi:10.3747/co.22.2436
- Gallitto, M., He, R. C., Inocencio, J. F., Wang, H., Zhang, Y., Deikus, G., . . . Sebra, R. J. J. o. N.-o. (2020). Epigenetic preconditioning with decitabine sensitizes glioblastoma to temozolomide via induction of MLH1. *Journal of neuro-oncology*, 147(3), 557-566.
- Garrido, C., Solary, E. J. C. d., & differentiation. (2003). A role of HSPs in apoptosis through "protein triage"? *Cell death and differentiation*, 10(6), 619.
- Gartel, A. L., Serfas, M. S., Tyner, A. L. J. P. o. t. S. f. E. B., & Medicine. (1996). p21—negative regulator of the cell cycle. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 213(2), 138-149.
- Geurten, C., Geurten, M., Hoyoux, C., Lebrethon, M.-C. J. J. o. P. E., & Metabolism. (2019). Endocrine consequences of neuroblastoma treatment in children: 20 years' experience of a single center. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 32(4), 347-354.
- Ghaemmaghami, A. B., Mahjoubin-Tehran, M., Movahedpour, A., Morshedi, K., Sheida, A., Taghavi, S. P., . . . Signaling. (2020). Role of exosomes in malignant glioma: microRNAs and proteins in pathogenesis and diagnosis. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 1-19.
- Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., & Adjei, A. A. J. C. a. c. j. f. c. (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: a cancer journal for clinicians*, 55(3), 178-194.
- Ghoneum, A., & Said, N. J. C. (2019). PI3K-AKT-mTOR and NFκB Pathways in Ovarian Cancer: Implications for Targeted Therapeutics. *Cancers*, 11(7), 949.
- Golias, C., Charalabopoulos, A., & Charalabopoulos, K. J. I. j. o. c. p. (2004). Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *International journal of clinical practice*, 58(12), 1134-1141.
- Gomez Godinez, V., Kabbara, S., Sherman, A., Wu, T., Cohen, S., Kong, X., . . . Yokomori, K. J. P. o. (2020). DNA damage induced during mitosis undergoes DNA repair synthesis. *PloS one*, 15(4), e0227849.
- Gong, X.-G., Lv, Y.-F., Li, X.-Q., Xu, F.-G., Ma, Q.-Y. J. B., & Bulletin, P. (2010). Gemcitabine resistance induced by interaction between alternatively spliced segment of tenascin-C and annexin A2 in pancreatic cancer cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(8), 1261-1267.
- Goode, E. L., Ulrich, C. M., Potter, J. D. J. C. E., & Biomarkers, P. (2002). Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 11(12), 1513-1530.
- Graham, C. A., & Cloughesy, T. F. (2004). Brain tumor treatment: Chemotherapy and other new developments. *Seminars in Oncology Nursing*, 20(4), 260-272. doi:10.1016/s0749-2081(04)00090-7
- Guerra-García, P., Marshall, L. V., Cockle, J. V., Ramachandran, P. V., Saran, F. H., Jones, C., . . . Cancer. (2020). Challenging the indiscriminate use of TMZ in pediatric high-grade gliomas: A review of past, current, and emerging therapies. *Pediatric blood & cancer*, 67(1), e28011.
- Guo, M., Wang, L., Wang, K., & Zhang, L. J. F. i. g. (2019). Prognostic roles of central carbon metabolism-associated genes in patients with low-grade glioma. *10*, 831.

- Gupta, R. K., Patel, A. K., Shah, N., Choudhary, A. K., Jha, U. K., Yadav, U. C., . . . Pakuwal, U. J. A. P. J. o. C. P. (2014). Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(11), 4405-4409.
- Güçlü, O., Doğanlar, O., Yüksel, V., & Doğanlar, Z. B. J. C. t. (2020). FOLFIRI-mediated toxicity in human aortic smooth muscle cells and possible amelioration with curcumin and quercetin. *Cardiovascular toxicology*, 20(2), 139-154.
- Günther, W., Pawlak, E., Damasceno, R., Arnold, H., & Terzis, A. J. B. j. o. c. (2003). TMZe induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids. *British journal of cancer*, 88(3), 463-469.
- Hallal, S., Ebrahimkhani, S., Shivalingam, B., Graeber, M. B., Kaufman, K. L., & Buckland, M. E. J. B. t. p. (2019). The emerging clinical potential of circulating extracellular vesicles for non-invasive glioma diagnosis and disease monitoring. *Brain Tumor Pathology*, 36(2), 29-39.
- Han, D., Schomacher, L., Schüle, K. M., Mallick, M., Musheev, M. U., Karaulanov, E., . . . Niehrs, C. J. E. (2019). NEIL1 and NEIL2 DNA glycosylases protect neural crest development against mitochondrial oxidative stress. *Elife*, 8, e49044.
- 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 Pacific Journal of Cancer Prevention*, 18(1), 3-9. doi:10.22034/APJCP.2017.18.1.3
- He, L., Shen, D., Li, J., & Mao, W. J. T. A. R. (2020). Alpinumisoflavone suppresses human Glioblastoma cell growth and induces cell cycle arrest through activating peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *The Anatomical Record*, 303(11), 2801-2810.
- Hegde, P. S., & Chen, D. S. J. I. (2020). Top 10 challenges in cancer immunotherapy. *Immunity*, 52(1), 17-35.
- Herrlinger, U., Tzaridis, T., Mack, F., Steinbach, J. P., Schlegel, U., Sabel, M., . . . Grauer, O. J. T. I. (2019). Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The lancet*, 393(10172), 678-688.
- Hongmei, Z. (2012). Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review. In *Apoptosis and medicine*: InTechOpen.
- Honorato, J. R., Hauser-Davis, R. A., Saggioro, E. M., Correia, F. V., Sales-Junior, S. F., Soares, L. O., . . . Spohr, T. C. d. S. J. J. o. c. p. (2020). Role of Sonic hedgehog signaling in cell cycle, oxidative stress, and autophagy of temozolomide resistant glioblastoma. *Journal of Cellular Physiology*, 235(4), 3798-3814.
- Horowitz, T. S., Suls, J., & Trevino, M. (2018). A Call for a Neuroscience Approach to Cancer-Related Cognitive Impairment. *Trends Neuroscience*, 41(8), 493-496. doi:10.1016/j.tins.2018.05.001
- Horwitz, S. B. J. A. o. o. o. j. o. t. E. S. f. M. O. (1994). Taxol (paclitaxel): mechanisms of action. *Annals of Oncology*, 5, S3-6.
- Hu, Y., Rosen, D. G., Zhou, Y., Feng, L., Yang, G., Liu, J., & Huang, P. J. J. o. B. C. (2005). Mitochondrial manganese-superoxide dismutase expression in ovarian cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 280(47), 39485-39492.

- Huang, M., & Weiss, W. A. (2013). Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harbor Perspectives Medicine*, 3(10), a014415. doi:10.1101/cshperspect.a014415
- Huang, P., Feng, L., Oldham, E. A., Keating, M. J., & Plunkett, W. J. N. (2000). Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature*, 407(6802), 390-395.
- Huang, Y., Peng, J., Oberley, L. W., Domann, F. E. J. F. R. B., & Medicine. (1997). Transcriptional inhibition of manganese superoxide dismutase (SOD2) gene expression by DNA methylation of the 5' CpG island. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(2), 314-320.
- Hufnagl, A., Herr, L., Friedrich, T., Durante, M., Taucher-Scholz, G., & Scholz, M. J. D. r. (2015). The link between cell-cycle dependent radiosensitivity and repair pathways: A model based on the local, sister-chromatid conformation dependent switch between NHEJ and HR. *DNA repair*, 27, 28-39.
- Iakovlev, D. A., Alekseeva, I. V., Vorobjev, Y. N., Kuznetsov, N. A., & Fedorova, O. S. J. M. (2019). The Role of Active-Site Residues Phe98, His239, and Arg243 in DNA Binding and in the Catalysis of Human Uracil–DNA Glycosylase SMUG1. *Molecules*, 24(17), 3133.
- Indraccolo, S., Lombardi, G., Fassan, M., Pasqualini, L., Giunco, S., Marcato, R., . . . Fiduccia, P. J. C. C. R. (2019). Genetic, epigenetic, and immunologic profiling of MMR-deficient relapsed glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, 25(6), 1828-1837.
- Jakubowicz-Gil, J., Langner, E., Bądziul, D., Wertel, I., Rzeski, W. J. T., & pharmacology, a. (2013). Silencing of Hsp27 and Hsp72 in glioma cells as a tool for programmed cell death induction upon temozolomide and quercetin treatment. *Toxicology and applied pharmacology*, 273(3), 580-589.
- Jakubowicz-Gil, J., Langner, E., Bądziul, D., Wertel, I., & Rzeski, W. J. T. B. (2013). Apoptosis induction in human glioblastoma multiforme T98G cells upon TMZe and quercetin treatment. *Tumor Biology*, 34(4), 2367-2378.
- Jena, L., McErlean, E., McCarthy, H. J. D. d., & research, t. (2020). Delivery across the blood-brain barrier: nanomedicine for glioblastoma multiforme. *Drug delivery and translational research*, 10(2), 304-318.
- Jiao, L., Hassan, M. M., Bondy, M. L., Wolff, R. A., Evans, D. B., Abbruzzese, J. L., & Li, D. J. T. A. j. o. g. (2008). XRCC2 and XRCC3 gene polymorphism and risk of pancreatic cancer. *The American journal of gastroenterology*, 103(2), 360.
- JJ, L., Benda, P., & H, H. (1968). *Establishment of differentiated clonal strains of glial brain cells in culture*. Paper presented at the Federation Proceedings. (vol. 27, no. 2, p. 720). 9650 rockville pike, bethesda, md 20814-3998: federation amer soc exp biol.
- Johns, J. J. J. B. B. (2011). Estimation of melatonin blood brain barrier permeability. *J. Bioanal. Biomed*, 3, 064-069.
- Joshi, S. J. C. (2020). Targeting the tumor microenvironment in neuroblastoma: recent advances and future directions. *Cancers*, 12(8), 2057.
- Jovcevska, I., Kocevar, N., & Komel, R. (2013). Glioma and glioblastoma - how much do we (not) know? *Molecular Clinical Oncology*, 1(6), 935-941. doi:10.3892/mco.2013.172
- Joyce, D., Albanese, C., Steer, J., Fu, M., Bouzahzah, B., Pestell, R. G. J. C., & reviews, g. f. (2001). NF-κB and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine & growth factor reviews*, 12(1), 73-90.

- Kadalkal, Ç., Artik, N. J. C. r. i. f. s., & nutrition. (2004). A new quality parameter in tomato and tomato products: Ergosterol. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(5), 349-351.
- Kalogeridi, M.-A., Kougioumtzopoulou, A., Zygianni, A., & Kouloulis, V. J. N. r. (2020). Stereotactic radiosurgery and radiotherapy for acoustic neuromas. *Neurosurgical Review*, 43(3), 941-949.
- Kanderi, T., & Gupta, V. J. S. (2020). Glioblastoma Multiforme. *StatPearls*, internet
- Kanzaki, H., Ouchida, M., Hanafusa, H., Sakai, A., Yamamoto, H., Suzuki, H., . . . Nakachi, K. J. O. r. (2007). Single nucleotide polymorphism in the RAD18 gene and risk of colorectal cancer in the Japanese population. *Oncology Reports*, 18(5), 1171-1175.
- Keir, S. T., Maris, J. M., Reynolds, C. P., Kang, M. H., Kolb, E. A., Gorlick, R., . . . cancer. (2013). Initial testing (stage 1) of TMZ by the pediatric preclinical testing program. *Pediatric Blood & Cancer*, 60(5), 783-790.
- Kesavardhana, S., Malireddi, R. S., & Kanneganti, T.-D. J. A. R. o. I. (2020). Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis. *Annual Review of Immunology*, 38, 567-595.
- Khakh, B. S., & Deneen, B. J. A. r. o. n. (2019). The emerging nature of astrocyte diversity. *Annual Review of Neuroscience*, 42, 187-207. doi:10.1146/annurev-neuro-070918-050443
- Kim, Y. S., Gupta Vallur, P., Phaëton, R., Mythreye, K., & Hempel, N. J. A. (2017). Insights into the Dichotomous Regulation of SOD2 in Cancer. *Antioxidants*, 6(4), 86.
- Kiuru, A., Lindholm, C., Heinävaara, S., Ilus, T., Jokinen, P., Haapasalo, H., . . . Johansen, C. J. J. o. n.-o. (2008). XRCC1 and XRCC3 variants and risk of glioma and meningioma. *Journal of Neuro-Oncology*, 88(2), 135-142.
- Koziara, J. M., Lockman, P. R., Allen, D. D., & Mumper, R. J. (2004). Paclitaxel nanoparticles for the potential treatment of brain tumors. *Journal of Controlled Release*, 99(2), 259-269. doi:10.1016/j.jconrel.2004.07.006
- Kralik, S. F., Shih, C.-s., Ho, C. Y., Finke, W., Buchsbaum, J., & Watson, G. A. (2017). Radiation-Induced Large Vessel Cerebral Vasculopathy in Pediatric Patients with Brain Tumors Treated with Proton Radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2017.07.009>
- Krishnan, A. V., Feldman, D. J. A. r. o. p., & toxicology. (2011). Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 51, 311-336.
- Lahtz, C., & Pfeifer, G. P. J. J. o. m. c. b. (2011). Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *Journal of Molecular Cell Biology*, 3(1), 51-58.
- Lakomkin, N., & Hadjipanayis, C. G. J. F. i. s. (2019). The use of spectroscopy handheld tools in brain tumor surgery: current evidence and techniques. *Frontiers in surgery*, 6, 30.
- Lan, F., Yang, Y., Han, J., Wu, Q., Yu, H., & Yue, X. (2016). Sulforaphane reverses chemo-resistance to TMZ in glioblastoma cells by NF-kappaB-dependent pathway downregulating MGMT expression. *International Journal of Oncology*, 48(2), 559-568. doi:10.3892/ijo.2015.3271
- Le, N. Q. K., Do, D. T., Chiu, F.-Y., Yapp, E. K. Y., Yeh, H.-Y., & Chen, C.-Y. J. J. o. P. M. (2020). XGBoost improves classification of MGMT promoter methylation

- status in IDH1 wildtype glioblastoma. *Journal of Personalized Medicine*, 10(3), 128.
- Lee, A., Arasaratnam, M., Chan, D. L. H., Khasraw, M., Howell, V. M., & Wheeler, H. J. C. D. o. S. R. (2020). Anti-epidermal growth factor receptor therapy for glioblastoma in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 5(5), CD013238. doi:10.1002/14651858.CD013238.pub2
- Leja-Szpak, A., Jaworek, J., Szklarczyk, J., Konturek, S., Pawlik, W. J. J. o. P., & Pharmacology. (2007). Melatonin stimulates HSP27 phosphorylation in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1). *Journal of Physiology and Pharmacology*, 58 Suppl 3, 177-188.
- Letai, A. (2017). Apoptosis and cancer. *Annual Review of Cancer Biology*, 1, 275-294.
- Li, J., Qian, W.-P., & Sun, Q.-Y. J. B. o. R. (2019). Cyclins regulating oocyte meiotic cell cycle progression. *Biology of reproduction*, 101(5), 878-881.
- Li, M., Wu, C., Muhammad, J. S., Yan, D., Tsuneyama, K., Hatta, H., . . . Inadera, H. J. R. b. (2020). Melatonin sensitises shikonin-induced cancer cell death mediated by oxidative stress via inhibition of the SIRT3/SOD2-AKT pathway. *Redox biology*, 36, 101632.
- Liddel, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*, 46(6), 957-967. doi:10.1016/j.immuni.2017.06.006
- Liebmann, J., Cook, J., Lipschultz, C., Teague, D., Fisher, J., & Mitchell, J. J. B. j. o. c. (1993). Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol®) in human tumour cell lines. *British journal of cancer*, 68(6), 1104-1109.
- Lin, Y.-C., Lee, B.-H., Alagie, J., & Su, C.-H. J. O. (2017). Combination treatment of ergosterol followed by amphotericin B induces necrotic cell death in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*, 8(42), 72727.
- Lin, Y., Zhou, J., Xu, J., Zhao, K., Liu, X., Wang, G., . . . Kang, C. (2018). Effects of combined radiosurgery and TMZ therapy on epidermal growth factor receptor and variant III in glioblastoma multiforme. *Oncology Letters*, 15(4), 5751-5759. doi:10.3892/ol.2018.8055
- Liu, G., Zou, H., Luo, T., Long, M., Bian, J., Liu, X., . . . Wang, Y. J. P. o. (2016). Caspase-dependent and caspase-independent pathways are involved in cadmium-induced apoptosis in primary rat proximal tubular cell culture. *PloS One*, 11(11), e0166823.
- Liu, L., Labani, N., Cecon, E., & Jockers, R. (2019). Melatonin Target Proteins: Too Many or Not Enough? *Frontiers in Endocrinology, (Lausanne)*, 10, 791. doi:10.3389/fendo.2019.00791
- Liu, X., Zhao, J., Zhang, L., Huang, J., & Ma, Y. J. M. (2020). The effect of age distribution on the prognosis of retroperitoneal neuroblastoma. *Medicine (Baltimore)*, 99(23), e20639.
- Lo Dico, A., Salvatore, D., Martelli, C., Ronchi, D., Diceglie, C., Lucignani, G., & Ottobri, L. J. C. (2019). Intracellular redox-balance involvement in TMZ resistance-related molecular mechanisms in glioblastoma. *Cells*, 8(11), 1315.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., . . . Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, 131(6), 803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1

- Lowenstein, P., & Castro, M. J. S. C. I. (2011). Malignant Brain Tumors: from Experimental to Clinical Neuro-oncology. *Short Course I*, 69.
- Lu, X., Zhang, X., Deng, X., Yang, Z., Shen, X., Sheng, H., . . . Lin, J. J. W. N. (2020). Incidence, Treatment and Survival in Primary Central Nervous System Neuroblastoma. *World Neurosurgery*, 140, e61-e72.
- Ma, H., Wang, Z., Hu, L., Zhang, S., Zhao, C., Yang, H., . . . Chen, X. (2018). The melatonin-MT1 receptor axis modulates tumor growth in PTEN-mutated gliomas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 496(4), 1322-1330. doi:10.1016/j.bbrc.2018.02.010
- Ma, L., Chen, H., Dong, P., & Lu, X. J. F. C. (2013). Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Food Chemistry*, 139(1-4), 503-508.
- MacVicar, B. A., & Newman, E. A. J. C. S. H. p. i. b. (2015). Astrocyte regulation of blood flow in the brain. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(5), a020388.
- Maher, E. A., & Mckee, A. C. (2010). Neoplasms of the central nervous system. In *Atlas of diagnostic oncology* (pp. 484-528): Elsevier.
- Martínez-Jiménez, F., Muiños, F., Sentís, I., Deu-Pons, J., Reyes-Salazar, I., Arnedo-Pac, C., ... & Lopez-Bigas, N. (2020). A compendium of mutational cancer driver genes. *Nature Reviews Cancer*, 20(10), 555-572.
- Masoudi, M. S., Mehrabian, E., & Mirzaei, H. J. J. o. c. b. (2018). MiR-21: A key player in glioblastoma pathogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(2), 1285-1290.
- Mayo, J. C., Cernuda, R., Quiros, I., Rodriguez, P., Garcia, J. I., Hevia, D., & Sainz, R. M. J. M. R. (2019). Understanding the role of melatonin in cancer metabolism. *Melatonin Research*, 2(3), 76-104.
- Mazzoni, C., & Falcone, C. J. B. e. B. A.-M. C. R. (2008). Caspase-dependent apoptosis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783(7), 1320-1327.
- McConnell, D. D., McGreevy, J. W., Williams, M. N., & Litofsky, N. S. J. M. (2018). Do Anti-Oxidants Vitamin D3, Melatonin, and Alpha-Lipoic Acid Have Synergistic Effects with TMZe on Cultured Glioblastoma Cells? *Medicines*, 5(2), 58.
- McFaline-Figueroa, J. R., & Lee, E. Q. (2018). Brain Tumors. *American Journal of Medicine*, 131(8), 874-882. doi:10.1016/j.amjmed.2017.12.039
- Mehta, A., Awah, C. U., & Sonabend, A. M. (2018). Topoisomerase II Poisons for Glioblastoma; Existing Challenges and Opportunities to Personalize Therapy. *Frontiers in Neurology*, 9, 459. doi:10.3389/fneur.2018.00459
- Menze, B. H., Jakab, A., Bauer, S., Kalpathy-Cramer, J., Farahani, K., Kirby, J., . . . Van Leemput, K. (2015). The Multimodal Brain Tumor Image Segmentation Benchmark (BRATS). *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 34(10), 1993-2024. doi:10.1109/TMI.2014.2377694
- Menze, B. H., Jakab, A., Bauer, S., Kalpathy-Cramer, J., Farahani, K., Kirby, J., . . . Wiest, R. J. I. t. o. m. i. (2014). The multimodal brain tumor image segmentation benchmark (BRATS). *IEEE transactions on medical imaging*, 34(10), 1993-2024.
- Miller, K. D., Siegel, R. L., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Kramer, J. L., Rowland, J. H., . . . Jemal, A. (2016). Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. CA: *A Cancer Journal for Clinicians*, 66(4), 271-289. doi:10.3322/caac.21349

- Mohsen, H., El-Dahshan, E.-S. A., El-Horbaty, E.-S. M., Salem, A.-B. M. J. F. C., & Journal, I. (2018). Classification using deep learning neural networks for brain tumors. *Future Computing and Informatics Journal*, 3(1), 68-71.
- Mohtashami, E., Shafaei-Bajestani, N., Mollazadeh, H., Mousavi, S. H., Jalili-Nik, M., Sahebkar, A., & Afshari, A. R. J. C. d. m. (2020). The current state of potential therapeutic modalities for glioblastoma multiforme: a clinical review. *Current drug metabolism*.
- Monaco, C., Andreakos, E., Kiriakidis, S., Mauri, C., Bicknell, C., Foxwell, B., . . . Feldmann, M. (2004). Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15), 5634-5639. doi:10.1073/pnas.0401060101
- Moradkhani, F., Moloudizargari, M., Fallah, M., Asghari, N., Heidari Khoei, H., & Asghari, M. H. (2020). Immunoregulatory role of melatonin in cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 235(2), 745-757. doi:10.1002/jcp.29036
- Moreno, F., Lopez Marti, J., Palladino, M., Lobos, P., Gualtieri, A., Cacciavillano, W. J. P. b., & cancer. (2016). Childhood neuroblastoma: incidence and survival in Argentina. Report from the National Pediatric Cancer Registry, ROHA Network 2000–2012. *Pediatric blood & cancer*, 63(8), 1362-1367.
- Mortezaee, K., Najafi, M., Farhood, B., Ahmadi, A., Potes, Y., Shabeeb, D., & Musa, A. E. J. L. s. (2019). Modulation of apoptosis by melatonin for improving cancer treatment efficiency: An updated review. *Life Sciences*, 228, 228-241.
- Moura, C. S., Lollo, P. C. B., Morato, P. N., & Amaya-Farfan, J. J. N. (2018). Dietary nutrients and bioactive substances modulate heat shock protein (HSP) expression: a review. *Nutrients*, 10(6), 683.
- Mu, Q., Jeon, M., Hsiao, M. H., Patton, V. K., Wang, K., Press, O. W., & Zhang, M. (2015). Stable and efficient Paclitaxel nanoparticles for targeted glioblastoma therapy. *Advanced healthcare materials*, 4(8), 1236-1245. doi:10.1002/adhm.201500034
- Mueller, S., & Chang, S. J. N. (2009). Pediatric brain tumors: current treatment strategies and future therapeutic approaches. *Neurotherapeutics*, 6(3), 570-586.
- Mullard, A. J. N. r. D. d. (2016). Pioneering apoptosis-targeted cancer drug poised for FDA approval. *Nature reviews. Drug discovery*, 15(3), 147.
- Muñoz-Fonseca, M. B., Vidal-Limon, A., Fernández-Pomares, C., Rojas-Durán, F., Hernández-Aguilar, M. E., Espinoza, C., ...& Suárez-Medellín, J. (2020). Ergosterol exerts a differential effect on AR-dependent LNCaP and AR-independent DU-145 cancer cells. *Natural product research*, 1-4.
- Munoz, J. L., Rodriguez-Cruz, V., Greco, S. J., Nagula, V., Scotto, K. W., & Rameshwar, P. (2014). TMZe induces the production of epidermal growth factor to regulate MDR1 expression in glioblastoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(10), 2399-2411. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0011
- Murphy, M. E. J. C. (2013). The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*, 34(6), 1181-1188.
- Nabors, L. B., Ammirati, M., Bierman, P. J., Brem, H., Butowski, N., Chamberlain, M. C., . . . Gilbert, M. R. J. J. o. t. N. C. C. N. (2013). Central nervous system cancers. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 11(9), 1114-1151.

- Najlah, M., Jain, M., Wan, K. W., Ahmed, W., Albed Alhnan, M., Phoenix, D. A., . . . Elhissi, A. (2018). Ethanol-based proliposome delivery systems of paclitaxel for in vitro application against brain cancer cells. *Journal of liposome research*, 28(1), 74-85. doi:10.1080/08982104.2016.1259628
- Nennig, S., Schank, J. J. A., & Alcoholism. (2017). The role of NFkB in drug addiction: beyond inflammation. *Alcohol and Alcoholism*, 52(2), 172-179.
- Ng, T. B., & Wang, H. X. (2005). Pharmacological actions of Cordyceps, a prized folk medicine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(12), 1509-1519. doi:10.1211/jpp.57.12.0001
- Nikolova, T., Roos, W. P., Krämer, O. H., Strik, H. M., & Kaina, B. J. B. e. B. A.-R. o. C. (2017). Chloroethylating nitrosoureas in cancer therapy: DNA damage, repair and cell death signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1868(1), 29-39.
- Nitulescu, G. M., Van De Venter, M., Nitulescu, G., Ungurianu, A., Juzenas, P., Peng, Q., . . . Tsoukalas, D. J. I. j. o. o. (2018). The Akt pathway in oncology therapy and beyond. *International Journal of Oncology*, 53(6), 2319-2331.
- Ostrom, Q. T., Adel Fahmideh, M., Cote, D. J., Muskens, I. S., Schraw, J. M., Scheurer, M. E., & Bondy, M. L. J. N.-o. (2019). Risk factors for childhood and adult primary brain tumors. *Neuro-Oncology*, 21(11), 1357-1375.
- Otto, T., & Sicinski, P. J. N. R. C. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17(2), 93.
- Paál, K., Müller, J., & Hegedüs, L. J. E. J. o. B. (2001). High affinity binding of paclitaxel to human serum albumin. *European journal of biochemistry*, 268(7), 2187-2191.
- Pandi-Perumal, S. R., BaHammam, A. S., Brown, G. M., Spence, D. W., Bharti, V. K., Kaur, C., . . . Cardinali, D. P. (2013). Melatonin antioxidative defense: therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes. *Neurotoxicity Research*, 23(3), 267-300. doi:10.1007/s12640-012-9337-4
- Papademetrio, D. L., Lompardía, S. L., Simunovich, T., Costantino, S., Mihalez, C. Y., Cavaliere, V., & Alvarez, É. J. T. o. (2016). Inhibition of survival pathways MAPK and NF-kB triggers apoptosis in pancreatic ductal adenocarcinoma cells via suppression of autophagy. *Targeted Oncology*, 11(2), 183-195.
- Papoutsis, K., Grasso, S., Menon, A., Brunton, N. P., Lyng, J. G., Jacquier, J.-C., . . . Technology. (2020). Recovery of ergosterol and vitamin D2 from mushroom waste-Potential valorization by food and pharmaceutical industries. *Trends in Food Science & Technology*, 99, 351-366.
- Pariente, R., Pariente, J. A., Rodríguez, A. B., & Espino, J. J. J. o. p. r. (2016). Melatonin sensitizes human cervical cancer H e L a cells to cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis: effects on oxidative stress and DNA fragmentation. *Journal of Pineal Research*, 60(1), 55-64.
- Pastor, E. R., & Mousa, S. A. J. C. r. i. o. h. (2019). Current management of neuroblastoma and future direction. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 138, 38-43.
- Patel, M., Horgan, P. G., McMillan, D. C., & Edwards, J. J. T. R. (2018). NF-κB pathways in the development and progression of colorectal cancer. *Translational Research*, 197, 43-56.
- Peifer, M., Hertwig, F., Roels, F., Dreidax, D., Gartlgruber, M., Menon, R., . . . Fischer, M. (2015). Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma. *Nature*, 526(7575), 700-704. doi:10.1038/nature14980

- Pelicano, H., Feng, L., Zhou, Y., Carew, J. S., Hileman, E. O., Plunkett, W., . . . Huang, P. J. J. o. B. C. (2003). Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 37832-37839.
- Perazzoli, G., Prados, J., Ortiz, R., Caba, O., Cabeza, L., Berdasco, M., . . . Melguizo, C. (2015). TMZ Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression. *PLoS One*, 10(10), e0140131. doi:10.1371/journal.pone.0140131
- Perrin, S. L., Samuel, M. S., Koszyca, B., Brown, M. P., Ebert, L. M., Oksdath, M., & Gomez, G. A. J. B. S. t. (2019). Glioblastoma heterogeneity and the tumour microenvironment: implications for preclinical research and development of new treatments. *Biochemical Society Transactions*, 47(2), 625-638.
- Persson, O., Bartek, J., Shalom, N. B., Wangerid, T., Jakola, A. S., & Förander, P. J. A. n. (2017). Stereotactic radiosurgery vs. fractionated radiotherapy for tumor control in vestibular schwannoma patients: a systematic review. *Acta Neurochirurgica*, 159(6), 1013-1021.
- Philipp-Staheli, J., Kim, K.-H., Liggitt, D., Gurley, K. E., Longton, G., & Kemp, C. J. J. O. (2004). Distinct roles for p53, p27 kip1, and p21 Cip1 during tumor development. *Oncogene*, 23(4), 905-913.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. J. E. j. o. m. c. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.
- Popp, I., Weber, W. A., Combs, S. E., Yuh, W. T., & Grosu, A. L. J. T. i. M. R. I. (2019). Neuroimaging for Radiation Therapy of Brain Tumors. *Topics in Magnetic Resonance Imaging*, 28(2), 63-71. doi:10.1097/RMR.0000000000000198
- Proietti, S., Cucina, A., Minini, M., Bizzarri, M. J. C., & sciences, m. l. (2017). Melatonin, mitochondria, and the cancer cell. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(21), 4015-4025.
- Raina, S., Sodhi, H. S., Sethi, S., & Singh, M. (2014). Identification of ergosterol in mushrooms. *Proceedings of 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8), New Delhi, India*, 19-22 November 2014. Volume I & II.
- Reichel, D., Sagong, B., Teh, J., Zhang, Y., Wagner, S., Wang, H., . . . Yu, J. S. J. A. n. (2020). Near Infrared Fluorescent Nanoplatfrom for Targeted Intraoperative Resection and Chemotherapeutic Treatment of Glioblastoma. *ACS Nano*, 14(7), 8392-8408.
- Reiter, R. J. J. P. i. n. (1998). Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Progress in Neurobiology*, 56(3), 359-384.
- Richelson, E. J. J. o. n. (1973). Regulation of tyrosine hydroxylase activity in mouse neuroblastoma clone N1E-115. *Journal of Neurochemistry*, 21(5), 1139-1145. doi:10.1111/j.1471-4159.1973.tb07568.x
- Richelson, E. J. P. T. (1990). The use of cultured cells in the study of mood-normalizing drugs. *Pharmacol. Toxicol*, 66, 69-75.
- Roos, W. P., Frohnepfel, L., Quiros, S., Ringel, F., & Kaina, B. J. C. L. (2018). XRCC3 contributes to TMZ resistance of glioblastoma cells by promoting DNA double-strand break repair. *Cancer Letters*, 424, 119-126. doi:10.1016/j.canlet.2018.03.025

- Sainz, R., Mayo, J., Rodriguez, C., Tan, D., Lopez-Burillo, S., Reiter, R. J. C., & CMLS, M. L. S. (2003). Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(7), 1407-1426.
- Samanta, S. (2020). Melatonin: an endogenous miraculous indolamine, fights against cancer progression. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 146(8), 1893-1922. doi:10.1007/s00432-020-03292-w
- Samarakkody, A. S., Shin, N.-Y., Cantor, A. B. J. M., & Cells. (2020). Role of RUNX Family Transcription Factors in DNA Damage Response. *Molecules and Cells*, 43(2), 99-106. doi:10.14348/molcells.2019.0304
- Santello, M., Toni, N., & Volterra, A. J. N. n. (2019). Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment. *Nature Neuroscience*, 22(2), 154-166. doi:10.1038/s41593-018-0325-8
- Santos, J. C., Brianti, M. T., Almeida, V. R., Ortega, M. M., Fischer, W., Haas, R., . . . Ribeiro, M. L. J. M. c. (2017). Helicobacter pylori infection modulates the expression of miRNAs associated with DNA mismatch repair pathway. *Molecular Carcinogenesis*, 56(4), 1372-1379. doi:10.1002/mc.22590
- Scarabino, T., Caranci, F., Muto, M., & Popolizio, T. (2020). *Imaging Gliomas After Treatment*: Springer.
- Schaff, L. R., Yan, D., Thyparambil, S., Tian, Y., Cecchi, F., Rosenblum, M., . . . Lin, A. L. J. J. o. N.-O. (2020). Characterization of MGMT and EGFR protein expression in glioblastoma and association with survival. *Journal of Neuro-Oncology*, 146(1), 163-170. doi:10.1007/s11060-019-03358-x
- Schaub, C., Schäfer, N., Mack, F., Stuplich, M., Kebir, S., Niessen, M., . . . oncology, c. (2016). The earlier the better? Bevacizumab in the treatment of recurrent MGMT-non-methylated glioblastoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 142(8), 1825-1829. doi:10.1007/s00432-016-2187-3
- Schmitz, M. L., Shaban, M. S., Albert, B. V., Gökçen, A., & Kracht, M. J. B. (2018). The crosstalk of endoplasmic reticulum (ER) stress pathways with NF-κB: complex mechanisms relevant for cancer, inflammation and infection. *Biomedicines*, 6(2), 58.
- Schonberg, D. L., Lubelski, D., Miller, T. E., & Rich, J. N. (2014). Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy. *Molecular aspects of medicine*, 39, 82-101. doi:10.1016/j.mam.2013.06.004
- Schubert, N. A., Schild, L., van Oirschot, S., Keller, K. M., Alles, L. K., Vernooij, L., . . . Molenaar, J. J. J. E. J. o. C. (2020). Combined targeting of the p53 and pRb pathway in neuroblastoma does not lead to synergistic responses. *European Journal of Cancer*, 142, 1-9.
- Schumacker, P. T. J. C. c. (2006). Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell*, 10(3), 175-176.
- Senthebane, D. A., Rowe, A., Thomford, N. E., Shipanga, H., Munro, D., Al Mazeedi, M. A., . . . Pepper, M. S. J. I. j. o. m. s. (2017). The role of tumor microenvironment in chemoresistance: to survive, keep your enemies closer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1586.
- Serasanambati, M., & Chilakapati, S. R. J. S. I. J. o. B. S. (2016). Function of nuclear factor kappa B (NF-κB) in human diseases-a review. *South Indian Journal of Biological Sciences*, 2(4), 368-387.
- Seystahl, K., Hentschel, B., Loew, S., Gramatzki, D., Felsberg, J., Herrlinger, U., . . . oncology, c. (2020). Bevacizumab versus alkylating chemotherapy in recurrent

- glioblastoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 146(3), 659-670.
- Shapira-Furman, T., Serra, R., Gorelick, N., Doglioli, M., Tagliaferri, V., Cecia, A., . . . Domb, A. J. (2019). Biodegradable wafers releasing TMZ and Carmustine for the treatment of brain cancer. *Journal of Controlled Release*, 295, 93-101. doi:10.1016/j.jconrel.2018.12.048
- Sharma, V., Joseph, C., Ghosh, S., Agarwal, A., Mishra, M. K., & Sen, E. J. M. c. t. (2007). Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress. *Molecular cancer therapeutics*, 6(9), 2544-2553.
- Shen, W., Hu, J.-A., & Zheng, J.-S. J. J. o. i. m. r. (2014). Mechanism of TMZ-induced antitumour effects on glioma cells. *Journal of International Medical Research*, 42(1), 164-172. doi:10.1177/0300060513501753
- Sherman, M., & Multhoff, G. J. A. o. t. N. Y. A. o. S. (2007). Heat shock proteins in cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1113(1), 192-201. doi:10.1196/annals.1391.030
- Shimizu, T., Kawai, J., Ouchi, K., Kikuchi, H., Osima, Y., & Hidemi, R. J. I. J. o. O. (2016). Agarol, an ergosterol derivative from *Agaricus blazei*, induces caspase-independent apoptosis in human cancer cells. *International Journal of Oncology*, 48(4), 1670-1678. doi:10.3892/ijo.2016.3391
- Siddiqui, S. H., Kang, D., Park, J., Khan, M., & Shim, K. J. S. r. (2020). Chronic heat stress regulates the relation between heat shock protein and immunity in broiler small intestine. *Scientific reports*, 10(1), 1-11.
- Siegel, R., DeSantis, C., Virgo, K., Stein, K., Mariotto, A., Smith, T., . . . Ward, E. (2012). Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62(4), 220-241. doi:10.3322/caac.21149
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(1), 7-30. doi:10.3322/caac.21590
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. J. C. a. c. j. f. c. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(1), 7-30. doi:10.3322/caac.21332
- Singh, B. P., & Passari, A. K. (2019). *Biology of Macrofungi*: Springer.
- Singh, N., Savanur, M. A., Srivastava, S., D'Silva, P., & Mugesh, G. J. A. C. I. E. (2017). A redox modulatory Mn₃O₄ nanozyme with multi-enzyme activity provides efficient cytoprotection to human cells in a Parkinson's disease model. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(45), 14267-14271.
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. J. A. n. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7-35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8
- Spix, C., Pastore, G., Sankila, R., Stiller, C. A., & Steliarova-Foucher, E. J. E. j. o. c. (2006). Neuroblastoma incidence and survival in European children (1978–1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *European journal of cancer*, 42(13), 2081-2091.
- Sreedhar, A. S., Csermely, P. J. P., & therapeutics. (2004). Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacology and Therapeutics*, 101(3), 227-257. doi:10.1016/j.pharmthera.2003.11.004
- Stackhouse, C. T., Gillespie, G. Y., & Willey, C. D. J. C. (2020). Exploring the Roles of lncRNAs in GBM Pathophysiology and Their Therapeutic Potential. *Cells*, 9(11), 2369.

- Stajkovska, A., Mehandeziska, S., Rosalia, R., Stavrevska, M., Janevska, M., Markovska, M., . . . Kungulovski, G. J. F. i. g. (2019). A Pediatric Case of Glioblastoma Multiforme Associated With a Novel Germline p. His112CysfsTer9 Mutation in the MLH1 Gene Accompanied by a p. Arg283Cys Mutation in the TP53 Gene: A Case Report. *Frontiers in genetics*, 10, 952. doi:10.3389/fgene.2019.00952
- Struve, N., Binder, Z. A., Stead, L. F., Brend, T., Bagley, S. J., Faulkner, C., . . . Hoffer, K. J. O. (2020). EGFRvIII upregulates DNA mismatch repair resulting in increased temozolomide sensitivity of MGMT promoter methylated glioblastoma. *Oncogene*, 39(15), 3041-3055. doi:10.1038/s41388-020-1208-5
- Stupp, R., Mason, W. P., Van Den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., . . . Bogdahn, U. J. N. E. j. o. m. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 987-996. doi:10.1056/NEJMoa043330
- Subramanian, M., Jones, M. F., & Lal, A. J. C. (2013). Long non-coding RNAs embedded in the Rb and p53 pathways. *Cancers*, 5(4), 1655-1675.
- Sun, C., Yu, Y., Wang, L., Wu, B., Xia, L., Feng, F., . . . Wang, S. (2016). Additive antiangiogenesis effect of ginsenoside Rg3 with low-dose metronomic TMZ on rat glioma cells both in vivo and in vitro. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 35, 32. doi:10.1186/s13046-015-0274-y
- Sun, X., Hu, X., Wang, D., Yuan, Y., Qin, S., Tan, Z., . . . Su, Z. (2017). Establishment and characterization of primary astrocyte culture from adult mouse brain. *Brain Research Bulletin*, 132, 10-19. doi:10.1016/j.brainresbull.2017.05.002
- Synowiec, E., Wysokinski, D., Zaras, M., Kolodziejska, U., Stoczynska-Fidelus, E., Janik, K., . . . Szaflik, J. P. J. R. (2014). Association between polymorphism of the DNA repair SMUG1 and UNG genes and age-related macular degeneration. *Retina*, 34(1), 38-47.
- Szatrowski, T. P., & Nathan, C. F. J. C. r. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Research*, 51(3), 794-798.
- Talaat, I. M. J. E. J. o. P. (2013). Expression of cell-cycle regulators p53, p27, and p21 in mucoepidermoid and adenoid cystic carcinomas of the minor salivary glands. *Egyptian Journal of Pathology*, 33(1), 120-126.
- Tamimi, A. F., & Juweid, M. J. E. P. (2017). Epidemiology and outcome of glioblastoma. *Exon Publications*, 143-153.
- Tang, Y.-L., Sun, X., Huang, L.-B., Liu, X.-J., Qin, G., Wang, L.-N., . . . Liang, C. J. C. l. (2019). Melatonin inhibits MLL-rearranged leukemia via RBFOX3/hTERT and NF-κB/COX-2 signaling pathways. *Cancer letters*, 443, 167-178.
- Tanoue, Y., Toyoda, T., Sun, J., Mustofa, M. K., Tateishi, C., Endo, S., . . . Okuno, Y. J. J. o. I. D. (2018). Differential roles of Rad18 and Chk2 in genome maintenance and skin carcinogenesis following UV exposure. *Journal of Investigative Dermatology*, 138(12), 2550-2557. doi:10.1016/j.jid.2018.05.015
- Tavana, E., Mollazadeh, H., Mohtashami, E., Modaresi, S. M. S., Hosseini, A., Sabri, H., . . . Sahebkar, A. J. B. (2020). Quercetin: a promising phytochemical for the treatment of glioblastoma multiforme. *Biofactors*, 46(3), 356-366. doi:10.1002/biof.1605
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. J. N. r. M. c. b. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(3), 231-241.

- Thannickal, V. J., Fanburg, B. L. J. A. J. o. P.-L. C., & Physiology, M. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1005-1028. doi:10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005
- The ICGC/TCGA Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Consortium (2020). Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature*, 578(7793), 82.
- Thejaswini, P., Bhat, M. B., & Prakash, M. K. J. I. J. E. M. (2019). Detection and classification of tumour in brain MRI. *International Journal Engineering and Manufacturing*, 9(1), 11-20.
- Tian, H., Gao, Z., Li, H., Zhang, B., Wang, G., Zhang, Q., . . . Zheng, J. J. C. I. (2015). DNA damage response—a double-edged sword in cancer prevention and cancer therapy. *Cancer letters*, 358(1), 8-16.
- Tripathy, A., Pradhan, R. K. J. I. J. o. P. H. R., & Development. (2020). The Cancer Principle-I: Introducing Cancer as a Fundamental Principle of Nature. *Indian Journal of Public Health Research & Development*, 11(6), 1-5.
- Tsai, Y.-L., Chang, H.-H., Chen, Y.-C., Chang, Y.-C., Chen, Y., & Tsai, W.-C. J. B. (2020). Molecular Mechanisms of KDELC2 on Glioblastoma Tumorigenesis and TMZ Resistance. *Biomedicines*, 8(9), 339. doi:10.3390/biomedicines8090339
- Tsubouchi, H., & Ogawa, H. J. M. b. o. t. c. (2000). Exo1 roles for repair of DNA double-strand breaks and meiotic crossing over in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 11(7), 2221-2233. doi:10.1091/mbc.11.7.2221
- Turrens, J. F. J. T. J. o. p. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 552(Pt 2), 335-344. doi:10.1113/jphysiol.2003.049478
- Uguz, A. C., Cig, B., Espino, J., Bejarano, I., Naziroglu, M., Rodríguez, A. B., & Pariente, J. A. J. J. o. p. r. (2012). Melatonin potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in rat pancreatic tumor cells. *Journal of pineal research*, 53(1), 91-98.
- Ulyte, A., Katsaros, V. K., Liouta, E., Stranjalis, G., Boskos, C., Papanikolaou, N., . . . Bisdas, S. J. N. (2016). Prognostic value of preoperative dynamic contrast-enhanced MRI perfusion parameters for high-grade glioma patients. *Neuroradiology*, 58(12), 1197-1208. doi:10.1007/s00234-016-1741-7
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. J. C.-b. i. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
- Valter, K., Zhivotovsky, B., & Gogvadze, V. (2018). Cell death-based treatment of neuroblastoma. *Cell Death & Disease*, 9(2), 113. doi:10.1038/s41419-017-0060-1
- van Heerden, J., & Kruger, M. J. W. J. o. C. O. (2020). Management of neuroblastoma in limited-resource settings. *World Journal of Clinical Oncology*, 11(8), 629-643. doi:10.5306/wjco.v11.i8.629
- Van Opdenbosch, N., & Lamkanfi, M. J. I. (2019). Caspases in cell death, inflammation, and disease. *Immunity*, 50(6), 1352-1364. doi:10.1016/j.immuni.2019.05.020
- Vanneman, M., & Dranoff, G. J. N. r. c. (2012). Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nature Reviews: Cancer*, 12(4), 237-251. doi:10.1038/nrc3237
- Vanoirbeek, E., Krishnan, A., Eelen, G., Verlinden, L., Bouillon, R., Feldman, D., . . . Metabolism. (2011). The anti-cancer and anti-inflammatory actions of 1, 25 (OH)

- 2D3. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 25(4), 593-604.
- Vargo, M. (2020). Cancer of the Brain, Eye, and Other Parts of the Central Nervous System. In *Cancer Rehabilitation* (pp. 45-67): Springer.
- Vermeulen, K., Berneman, Z. N., & Van Bockstaele, D. R. J. C. p. (2003). Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation*, 36(3), 165-175. doi:10.1046/j.1365-2184.2003.00267.x
- Waterman, D. P., Haber, J. E., & Smolka, M. B. J. A. R. o. B. (2020). Checkpoint responses to DNA double-strand breaks. *Annual Review of Biochemistry*, 89, 103-133. doi:10.1146/annurev-biochem-011520-104722
- Weller, M., Le Rhun, E., Preusser, M., Tonn, J.-C., & Roth, P. J. E. O. (2019). How we treat glioblastoma. 4(Suppl 2), e000520.
- Wesolowski, J., Rajdev, P., & Mukherji, S. J. A. j. o. n. (2010). temozolomide (Temodar). *AJNR: American Journal of Neuroradiology*, 31(8), 1383-1384. doi:10.3174/ajnr.A2170
- Westphal, M., Heese, O., Steinbach, J. P., Schnell, O., Schackert, G., Mehdorn, M., . . . Senft, C. J. E. j. o. c. (2015). A randomised, open label phase III trial with nimotuzumab, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in the treatment of newly diagnosed adult glioblastoma. *European Journal of Cancer*, 51(4), 522-532. doi:10.1016/j.ejca.2014.12.019
- Westphal, M., Maire, C. L., & Lamszus, K. J. C. d. (2017). EGFR as a target for glioblastoma treatment: an unfulfilled promise. *CNS drugs*, 31(9), 723-735.
- Wong, R. S. J. J. o. E., & Research, C. C. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 30(1), 87. doi:10.1186/1756-9966-30-87
- Wood, R. D., Mitchell, M., Sgouros, J., & Lindahl, T. J. S. (2001). Human DNA repair genes. *Science*, 291(5507), 1284-1289. doi:10.1126/science.1056154
- Wu, C., Muroski, M. E., Miska, J., Lee-Chang, C., Shen, Y., Rashidi, A., . . . Medicine. (2019). Repolarization of myeloid derived suppressor cells via magnetic nanoparticles to promote radiotherapy for glioma treatment. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 16, 126-137. doi:10.1016/j.nano.2018.11.015
- Wu, H.-Y., Yang, F.-L., Li, L.-H., Rao, Y. K., Ju, T.-C., Wong, W.-T., . . . Wu, S.-H. J. S. r. (2018). Ergosterol peroxide from marine fungus *Phoma* sp. induces ROS-dependent apoptosis and autophagy in human lung adenocarcinoma cells. *Scientific Reports*, 8(1), 17956. doi:10.1038/s41598-018-36411-2
- Wu, W., Wu, Y., Mayer, K., von Rosenstiel, C., Schecker, J., Baur, S., . . . Schlegel, J. J. T. o. (2020). Lipid peroxidation plays an important role in chemotherapeutic effects of TMZe and the development of therapy resistance in human glioblastoma. *Translational Oncology*, 13(3), 100748. doi:10.1016/j.tranon.2020.100748
- Xiao, W., Wang, S., Zhang, R., Sohrabi, A., Yu, Q., Liu, S., . . . Nathanson, D. A. J. M. B. (2020). Bioengineered scaffolds for 3D culture demonstrate extracellular matrix-mediated mechanisms of chemotherapy resistance in glioblastoma. *Matrix Biology*, 85-86, 128-146. doi:10.1016/j.matbio.2019.04.003
- Xie, Y., Tan, Y., Yang, C., Zhang, X., Xu, C., Qiao, X., . . . Medicine. (2019). Omics-based integrated analysis identified ATRX as a biomarker associated with glioma diagnosis and prognosis. *Cancer biology & medicine*, 16(4), 784.

- Xu, Y., Shen, M., Li, Y., Sun, Y., Teng, Y., Wang, Y., & Duan, Y. J. O. (2016). The synergic antitumor effects of paclitaxel and TMZ co-loaded in mPEG-PLGA nanoparticles on glioblastoma cells. *Oncotarget*, 7(15), 20890-20901. doi:10.18632/oncotarget.7896
- Yamamura, H. I., & Enna, S. (1990). *Methods in neurotransmitter receptor analysis*: Raven Pr.
- Yang, T., Martin, P., Fogarty, B., Brown, A., Schurman, K., Phipps, R., . . . Bai, S. J. P. r. (2015). Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in Danio rerio. *Pharmaceutical Research*, 32(6), 2003-2014. doi:10.1007/s11095-014-1593-y
- Yang, Y., Luo, X., Yasheng, M., Zhao, J., Li, J., Li, J. J. F., & function. (2020). Ergosterol peroxide from *Pleurotus ferulae* inhibits gastrointestinal tumor cell growth through induction of apoptosis via reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress. *Food & function*, 11(5), 4171-4184.
- Yanumula, A., & Cusick, J. K. J. S. (2020). Biochemistry, Extrinsic Pathway of Apoptosis. *StatPearls*.
- Yi, G.-z., Huang, G., Guo, M., Zhang, X. a., Wang, H., Deng, S., . . . Pan, J. J. B. (2019). Acquired TMZ resistance in MGMT-deficient glioblastoma cells is associated with regulation of DNA repair by DHC2. *Brain*, 142(8), 2352-2366.
- Yu, X., Wang, M., Zuo, J., Wahafu, A., Mao, P., Li, R., . . . Wang, J. J. L. S. (2019). Nuclear factor IA promotes TMZ resistance in glioblastoma via activation of nuclear factor κB pathway. *Life sciences*, 236, 116917.
- Yu, Y., Chen, F., Yang, Y., Jin, Y., Shi, J., Han, S., . . . Wang, S. J. I. j. o. o. (2019). lncRNA SNHG16 is associated with proliferation and poor prognosis of pediatric neuroblastoma. *International journal of oncology*, 55(1), 93-102.
- Zandi, A., Moini Zanjani, T., Ziai, S. A., Khazaei Poul, Y., & Haji Molla Hoseini, M. J. M. E. J. o. C. (2017). The synergistic effects of the combination of ciprofloxacin and temozolomide on human glioblastoma A-172 cell line. *Middle East Journal of Cancer*, 8(1), 31-38.
- Zein, N., Aziz, S. W., El-Sayed, A. S., & Sitohy, B. J. B. R. (2019). Comparative cytotoxic and anticancer effect of Taxol derived from *Aspergillus terreus* and *Taxus brevifolia*. *Bioscience Research*, 16(2), 1500-1509.
- Zhang, A., Wu, Y., Lai, H. W., Yew, D. T. J. N., & Aging. (2004). Apoptosis—a brief review. *Neuroembryology and Aging*, 3(1), 47-59.
- Zhang, D., Yang, R., Wang, S., Dong, Z. (2014). Paclitaxel: new uses for an old drug. *Drug design, development and therapy*, 8, 279.
- Zhang, H. Y., Firempong, C. K., Wang, Y. W., Xu, W. Q., Wang, M. M., Cao, X., . . . Xu, X. M. (2016). Ergosterol-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles with enhanced in vitro antitumor activity and oral bioavailability. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37(6), 834-844. doi:10.1038/aps.2016.37
- Zhang, J., FG Stevens, M., & D Bradshaw, T. J. C. m. p. (2012). TMZ: mechanisms of action, repair and resistance. *Current molecular pharmacology*, 5(1), 102-114.
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., . . . longevity, c. (2016). ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Zhang, J., Zhuo, Z., Li, W., Zhu, J., He, J., & Su, J. J. A. (2018). XRCC1 gene polymorphisms and risk of neuroblastoma in Chinese children. *Aging (Albany NY)*, 10(10), 2944.

- Zhao, Q., Liu, Y., Zhang, Y., Meng, L., Wei, J., Wang, B., . . . Jiang, X. J. C. R. i. O. H. (2020). Role and toxicity of radiation therapy in neuroblastoma patients: A literature review. *Critical reviews in oncology/hematology*, 149, 102924.
- Zheng, X., Pang, B., Gu, G., Gao, T., Zhang, R., Pang, Q., & Liu, Q. (2017). Melatonin Inhibits Glioblastoma Stem-like cells through Suppression of EZH2-NOTCH1 Signaling Axis. *International journal of biological sciences*, 13(2), 245-253. doi:10.7150/ijbs.16818
- Zhou, N., Wei, Z. X., & Qi, Z. X. J. B. n. (2019). Inhibition of autophagy triggers melatonin-induced apoptosis in glioblastoma cells. *BMC neuroscience*, 20(1), 63.
- Zhou, Q., Gui, S., Zhou, Q., & Wang, Y. (2014). Melatonin inhibits the migration of human lung adenocarcinoma A549 cell lines involving JNK/MAPK pathway. *PLoS One*, 9(7), e101132. doi:10.1371/journal.pone.0101132
- Zhou, Y., Hileman, E. O., Plunkett, W., Keating, M. J., & Huang, P. J. B., The Journal of the American Society of Hematology. (2003). Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 101(10), 4098-4104.
- Zhu, L., Chen, L. J. C., & letters, m. b. (2019). Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. *Cellular & molecular biology letters*, 24(1), 1-11.