



**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**İNSAN GLİOBLASTOMA HÜCRE HATLARINDA AKT/FOXO3a/BİM
YOLAĞI ÜZERİNE MORİNGA OLEİFERA’NIN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. DİLŞAD ARISOY DEMİR

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GAZİANTEP
2021**

**T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**İNSAN GLİOBLASTOMA HÜCRE HATLARINDA AKT/FOXO3a/Bim
YOLAĞI ÜZERİNE MORİNGA OLEİFERA'NIN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. DİLŞAD ARISOY DEMİR

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. MEHMET YÜNCÜ
Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCIERİ**

**GAZIANTEP
2021**

TEZ ONAY SAYFASI

T.C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İNSAN GLİOBLASTOMA HÜCRE HATLARINDA AKT/FOXO3a/Bim YOLAĞI
ÜZERİNE MORİNGA OLEİFERA'NIN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Dilşad ARISOY DEMİR

28/12/2021

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

Prof. Dr. Can DEMİREL

Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Serap S. İNALÖZ DEMİR

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulundu.

Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ, Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCIERİ

Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1. Prof. Dr. Serap S. İNALÖZ DEMİR
2. Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ (Tez Danışmanı)
3. Prof. Dr. Şahin SIRMALI (SANKO Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD)
4. Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCIERİ (Tez II. Danışmanı)

I. ÖNSÖZ

Her nasip zamanına teslimmiş... Hayatın beni iyi ki karşılaştırmış dediği nice çok değerli hocalar, çalışma arkadaşları ve dostlar edindiğim uzmanlık eğitimimde kutsal hekimlik mesleğinin en önemli kilit taşlarından birinin iyi tıp eğitimi almış tıp öğrencileri yetiştirmek olduğu gerçeğini yüreğime anlattığınız ve beni bu yönde adeta nakış nakış işlediğiniz için tüm hocalarıma sonsuz minnetlerimi sunarak başlamak istiyorum. Yürekerinizdeki bilgi, bilim ve tecrübe ışığını biz asistanlarınızla paylaştığınız ve bizleri her insanın zigottan sonsuzluğa bir mucize olduğu gerçeğiyle tanıştırdığınız için minnettarım... Mesleğini vicdanıyla, merhametiyle ve saygınlığıyla en doğru şekilde yapabilme hevesi ve çabası içinde oluşunuza ayrı ayrı teşekkürler...

Varlığıyla huzur, güven ve düzen veren, ilk günden beri bana bilgi ve tecrübeleri ile sabırla yol gösteren, iş hayatında azmin, çalışkanlığın ve deontolojinin değerliliğini yüreğime hissettiren, meslektaş olmaktan iftihar ettiğim, hem bilimsel hem manevi olarak desteklerini hep yanıbaşımnda hissettiğim çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ'ye,

Pırlanta gibi yüreğiyle, güler yüzüyle, ilk günden beri bana bilgi ve tecrübeleri ile sabırla yol gösteren, paha biçilemez klinik bakış açısıyla histoloji sevgimi katlayarak önüme ışık tutan, hep huzur ve güven veren, meslektaş olmaktan iftihar ettiğim, hem bilimsel hem sosyal olarak desteklerini hep yanıbaşımnda hissettiğim, nice başarıları ile gururlanacağımız çok değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCIERİ'ne,

Keşke daha önce eğitim alma ve engin hayat ve bilim tecrübelerinden yararlanma fırsatı bulsaydım dediğim, yüreğinin güzelliğiyle, her embriyonun bir mucize olduğuna inanışı ve inandırışı, enerjisiyle desteğini her zaman yanımda hissettiğim Prof. Dr. Serap İNALÖZ'e,

Bilgi ve tecrübeleriyle her alanda hep destek olan, bilgi ve beceri donanımına her zaman yürekten saygı duyduğum ve duyacağım, içimdeki embriyoloji sevgisinin büyümesinde yol gösterici desteğini hep yanımda hissettiğim Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TÜRKER'e,

İçindeki eğitim öğretim sevdası, yüreğinin güzelliği ile hep huzur ile destek veren çok değerli çalışma arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Gülünar ERDEM KOÇ'a,
Meslektaşları olmaktan ve aynı uzmanlık eğitimi çatısı altında olmaktan her zaman gurur duyduğum ve duyacağım, bilgi ve tecrübelerimizi daha nice güzellikleri paylaştığımız ve paylaşacağımız çok değerli asistan arkadaşlarım Abdullah MAHİROĞLU'na, Gamze ÇAKMAK'a, Tuba ÖZTÜRK'e, Manolya SANCAKTAR'a, Miyase ERDOĞAN EROĞLU'na, Merve BOZKURT'a, Selin KENAN'a, Canan ÜNAL'a, Çiğdem KARACA'ya,
Özellikle tez sürecinde bilgi, tecrübelerini zamanlarını ayırarak benimle sabırla paylaşan, kaygılarımı kaygıları bilip her an yanımda olan, içlerindeki eğitim öğretim sevdası ve yüreklerinin güzelliğiyle nice başarılarını duyacağıma inandığım çok değerli çalışma arkadaşlarım Dr. Hülya ÖZTATLICI ve Dr. Büşra ŞEN HALICIOĞLU'na
Güzel ve nice başarılarıyla belki başka yerlerde yine karşılaşmayı ümit ettiğim çok değerli çalışma arkadaşlarım, Bermal BAŞBUĞ, Elif UYGUR, Esmâ İŞÇEL ve Zeynep MERCAN'a
Evlatları olmaktan hep gurur duyduğum, yüzlerinin akı olabilmek için var gücümle çalıştığım, içimdeki çocuğun yüreğini elleriyle sıcacık tutan, her anımda yanıbaşımdaya desteğim, iyi kilerim, canlarım, canım annem İmran ARISOY'a ve babam Ömer Ersen ARISOY'a,
Hem gölgesiyle tek yürüdüğüm hem de beraber yürüdüğümüz yollarda gözlerinde, yüreğinde ve ellerinde güven ve huzur bulduğum, bilgisiyle, sevgisiyle, desteğiyle yoluma ışık olan hayat arkadaşım ve canım eşim Op. Dr. İbrahim Halil DEMİR'e ve küçücük yüreğiyle, boncuk boncuk gözleriyle en büyük desteğim, bir sarılışı bir gülüşü dünyalara bedel canım kızım İdil DEMİR'e sonsuz teşekkürler...

Dilşad ARISOY DEMİR
Gaziantep, 2021

II. ÖZET

Gliomlar arasında en yaygın görülen glioblastom, WHO tarafından da hala evre 4 olarak kabul edilen, mevcut tedavilere rağmen mortal bir tümördür. *Moringa oleifera* birçok kanser türünde glioblastom ile ortak tümorogenez yolağı üzerinde antikanser ve apoptoz indükleyici etkileri keşfedilmiş bir bitkidir.

Bu çalışmada *Moringa oleifera*'nın, glioblastomun tedavi seçeneklerine katkı sağlamak üzere patogenezinde bilinen AKT/FOXO3a/Bim yolağı üzerine etkisi araştırıldı. U87-MG ve T98-G glioblastom hücreleri in vitro ortamda kültüre edildi. U87-MG ve T98-G hücre hatlarına sitotoksik aktivite tespiti için *Moringa oleifera* uygulandı.

U87-MG ve T98-G kontrol ve deney gruplarında Image J yazılımı kullanılarak immuositokimyasal optik dansite ölçümleri karşılaştırıldı. Ayrıca U87-MG ve T98-G kontrol ve deney gruplarında koloni oluşum yüzdeleri Colony Count J yazılımı ile değerlendirildi.

U87-MG ve T98-G deney gruplarında kontrol grubuna göre AKT'nin azalışı, FOXO3a ve Bim'in artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu. U87-MG ve T98-G deney gruplarında kontrol grubuna göre koloni oluşum yüzdelerindeki azalma da anlamlıydı.

Sonuç olarak *Moringa oleifera*'nın U87-MG ve T98-G glioblastom hücre hatlarında apoptozu AKT/FOXO3a/Bim yolağı üzerinden tetiklediği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: U87-MG ve T98-G, AKT/FOXO3a/ Bim Yolağı, *Moringa oleifera*.

III. ABSTRACT

Glioblastoma, which is the most common glioma among gliomas, is still considered as stage 4 by WHO and is a mortal tumor despite current treatments. *Moringa oleifera* is an herb whose anticancer and apoptosis-inducing effects have been discovered on the common tumorigenesis pathway with glioblastoma in many cancer types.

In this study, the effect of *Moringa oleifera* on the AKT/FOXO3a/Bim pathway known in the pathogenesis of glioblastoma was investigated to contribute to the treatment options. U87-MG and T98-G glioblastoma cells were cultured in vitro. *Moringa oleifera* was applied to U87-MG and T98-G cell lines for cytotoxic activity detection.

Immunocytochemical optical density measurements were compared in U87-MG and T98-G control and experimental groups using Image J software. In addition, colony formation percentages in U87-MG and T98-G control and experimental groups were evaluated with Colony Count J software.

The decrease in AKT and the increase in FOXO3a and Bim were found statistically significant in the U87-MG and T98-G experimental groups compared to the control group. The decrease in colony formation percentages was also significant in the U87-MG and T98-G experimental groups compared to the control group.

As a result, it was determined that *Moringa oleifera* triggered apoptosis in U87-MG and T98-G glioblastoma cell lines via the AKT/FOXO3a/Bim pathway.

Key Words: U87-MG and T98-G, AKT/FOXO3a/ Bim Pathway, *Moringa oleifera*

IV. İÇİNDEKİLER

I. ÖNSÖZ.....	i
II. ÖZET.....	iii
III. ABSTRACT.....	iv
IV. İÇİNDEKİLER.....	v
V. KISALTMALAR.....	viii
VI. TABLO LİSTESİ	xi
VII. ŞEKİL LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Sinir Sistemi.....	4
2.1.1. Merkezi Sinir Sistemi Embriyolojisi ve Histolojisi	4
2.1.2. Merkezi Sinir Sistemindeki Glia Hücreleri.....	7
2.1.2.1. Astrositler	7
2.1.2.2. Oligodendrositler.....	8
2.1.2.3. Mikroglialar.....	8
2.1.2.4. Ependim Hücreleri	9
2.2. Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri	9
2.2.1. Epidemiyoloji.....	9
2.2.2. Güncel Tanı ve Tedavi Yaklaşımları	12
2.2.3. Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Sınıflandırılması	15
2.2.3.1. Glioblastoma Multiforme.....	19
2.3. Forkheadbox Protein Ailesi	21
2.3.1. FOXO Ailesi	23
2.3.1.1. FOXO3a	25
2.4. Glioblastomada Bazı Genetik Hedefler	26
2.4.1. İzositrat Dehidrogenaz Mutasyonu	27
2.4.2. TERT Promotor Mutasyonu.....	27
2.4.3. EGFR Amplifikasyonu	28
2.4.4. Kromozom 7+/10-.....	28
2.5. Akt/Foxo3a /Bim Yolağı.....	28

2.4.1. Glioblastoma'da Akt/FOXO3a/Bim Yolağı İlişkisi	30
2.6. Kanser Tedavisinde Fitoterapötik Ajan Kullanımı	33
2.5.1. Glioblastoma Multiforme'de Fitoterapötik Ajan Kullanımı	35
2.6. Moringa Oleifera.....	36
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	39
3.1. Deney Basamaklarının Planlanması.....	39
3.2. Hücre Kültürü Uygulamaları	39
3.2.1. Hücre Dondurma ve Saklama	39
3.2.2. Kullanılan Hücre Hatları	39
3.2.3. Kullanılan Etken Madde ve Özellikleri	39
3.2.4. Deney aşamalarında kullanılacak solüsyonlar	39
3.2.4.1. PBS Hazırlama:	39
3.2.4.2. Crystal violet hazırlama:	40
3.2.4.3. PFA (Paraformaldehit)Hazırlama:	40
3.2.4.4. %0,1'lik Triton X solüsyonu hazırlama	40
3.2.5. Besiyerlerinin Hazırlanması.....	40
3.2.6. Hücre Çözme Aşamaları	40
3.2.7. Hücrelerin Büyütülmesi ve Pasajlanması.....	41
3.2.8. Hücre sayımı	41
3.2.9. Deney Gruplarımız.....	41
3.3. Kullanılacak MOLE konsantrasyonunun Belirlenmesi	42
3.3.1. MOLE Çözme ve Kullanım Prosedürü	42
3.3.2. Sitotoksik Aktivite Tayini-MTT testi.....	42
3.4. İmmunositokimyasal Boyama.....	43
3.4.1. İmmunositokimyasal Bulguların Değerlendirilmesi	44
3.5. Koloni oluşturma deneyi.....	44
4. BULGULAR	46
4.1. U 87-MG Hücre Kültürü Uygulama Bulguları	46
4.1.1. U 87-MG Hücre Hattı MTT Bulguları.....	46
4.1.2. U87-MG Hücre Hatları için U87-MG+MOLE Grubunda IC 50 değeri Inverted Mikroskop İncelemesi	47

4.1.3. U87-MG Hücre Hattı İmmunositokimya Bulguları	47
4.1.3.1. AKT Bulguları	47
4.1.3.2. FOXO3a Bulguları	49
4.1.3.3. Bim Bulguları	51
4.2. T 98-G Hücre Kültürü Uygulama Bulguları	52
4.2.1. T98-G Hücre Hatları için T98-G+MOLE Grubunda IC 50 değeri Inverted Mikroskop İncelemesi	53
4.2.2. T98-G İmmunositokimya Bulguları	53
4.2.2.1. AKT Bulguları	53
4.2.2.2. FOXO3a Bulguları	55
4.2.2.3. Bim Bulguları	56
4.3. Koloni Oluşturma Deneyi (CFA) Bulguları	58
4.3.1. U87-MG CFA Bulguları	58
4.3.2. T98-G CFA Bulguları	59
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ	67
7. KAYNAKLAR	68

V. KISALTMALAR

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

Akt: Protein kinaz B

AKT: Antianjiojenik Kombinasyon Terapi

ALT: Alternative Longation of Telomer

ATRX: X'e Bağlı alfa-Talasemi geni

BEV: Bevacizumab

BOS: Beyin OmurilikSıvısı

BRAF: B-raf Protoncogene, SerineThreonineKinase

CBTRUS: The Central Brain Tumor Registry of the United States

C-IMPACT-NOW: The Consortium to Inform Molecular and PracticalApproaches to CNS Tumor Taxonomy

C19MC: micro RNA Cluster on Chromosome 19

CDKN2A/B: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A/B

CSLC: Cancer Stem Like Cells

DAF-16: DauerAssociated Factor-16

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

EMT: Epithelial Mesenchymal Transition

FDA: Food and Drug Administration

FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor

FOX: Forkhead Box(ÇatalBaşlı)Transkripsiyon FaktörüAilesi

GADD45: Growth Arrest and DNA Damage 45 geni

GBM: Glioblastome Multiforme

GLOBOCAN: Global Cancer Observatory

GMP: Granulocyte-Monocyte Progenitor

H3K27M: Histone 3 epigenetic modification- H3Histone Ailesi-27(Lysinaminosidinin 27.pozisyonu-M (MetilGrubu)

HDI: Human Development Index

2-HG: 2-HidroksiGlutarat

IDH: Isocitrate Dehydrogenase enzimi

IGF-1: Insulin like Growth Factor-1

IRN: Irinotekan(kemoterapötik)

ISN: International Society of Neuropathology

KonkT: Konkomitan Tedavi

MGMT: O-6-MethylGuanineDNAMethylTransferase

MYB: MYeloblastosis protooncogen,transcription factor

MYBL1: MYB protooncogenlike 1

NEC: Not Elsewhere Classified

NOS: Not Otherwise Specified

PDGFRA: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü ReseptörüA

PTEN: Fosfatase ve Tensin Homoloğu

R132H: Arjinin132Histidin

PI3K: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase

Shh: Sonic Hedgehog sinyali

TERT: Telomerase Reverse Transcriptase

TMZ: Temozolomid(kemoterapötik ajan)

TP53: TumorProtein p53

TTF: TumorTreatmentFields

WHO: World Health Organisation

WNT: Wingleless+Int-1

wt: wild type (vahşi tip)



VI. TABLO LİSTESİ

Tablo 2-1. GLOBOCAN 2020 verileri ve Türkiye Birleşik Veri Tabanı Kansere Verilerinin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Cinsiyete Göre İnsidans Hızları.	10
Tablo 2-2. Türkiye’de yaşa göre standardize edilmiş kanser hızı	11
Tablo 3-1. Deney grupları.	41
Tablo 4-1. U87-MG Kontrol ve U87-MG+MOLE Grupları anti-AKT Optik Dansite İmmünotokimyasal Analiz İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları.....	48
Tablo 4-2. U87-MG Kontrol ve U87-MG+MOLE Grupları anti-FOXO3a Optik Dansite İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları	50
Tablo 4-3. U87-MG Kontrol ve U87-MG+MOLE Grupları anti-Bim Optik Dansite İmmünotokimyasal Analiz İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları.....	51
Tablo 4-4. T98-G Kontrol ve T98-G+MOLE Grupları anti-AKT Optik Dansite İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları.	54
Tablo 4-5. T98-G Kontrol ve T98-G+MOLE Grupları anti-FOXO3a Optik Dansite İmmünotokimyasal Analiz İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları.....	55
Tablo 4-6. T98-G Kontrol ve T98-G+MOLE Grupları anti-Bim Optik Dansite İmmünotokimyasal Analiz İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları.....	57
Tablo 4-7. U87-MG Kontrol ve U87-MG+MOLE Grupları Koloni Oluşumu İstatistiksel Değerlendirme ImageJ.	59
Tablo 4-8. T98-G Kontrol ve T98-G+MOLE Grupları Koloni Oluşumu İstatistiksel Değerlendirme ImageJ.	60

VII. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Gelişim esnasında 3 primer ve 5 sekonder beyin vezikülü ile gelişen yapılar.....	5
Şekil 2.2: Merkezi nörogliaların gelişimi.....	6
Şekil 2.3: Merkezin sinir sisteminin glia hücreleri.	7
Şekil 2.4. Türkiye Birleşik Veri Tabanı 2017 verilerine göre merkezi sinir sistemi tümörlerinin cinsiyete göre yaşa standardize edilmiş hızı	12
Şekil 2.5: GBM tanılı 52 yaşında kadın hasta, kontrastlı MRI.....	13
Şekil 2.6. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018.....	20
Şekil 2.7: Forkhead Box Protein Ailesi.	22
Şekil 2.8: FOXO3a yapısı.	25
Şekil 2.9. Glioblastom moleküler patolojik yaklaşım şeması.	26
Şekil 2.10: Akt(PKB)/FOXO3/Bim yolağı.	29
Şekil 2.11: BMP4 gliomatogenezin önemli inhibitör düzenleyici mekanizmalarındandır.....	31
Şekil 2.12: Moringa Oleifera.....	37
Şekil 4.1. U87-MG artan MOLE konsantrasyonu ile % hücre canlılığı ve MTT sonucu ve elde edilen IC50 değeri	46
Şekil 4.2. U 87-MG hücre hatlarının kontrol grubu (a) ve IC50 değeri olarak belirlenen 216,8 µg/ml dozda MOLE uygulamasının ardından U87-MG+MOLE deney grubu (b) 24 saat inkübasyon sonrası inverted mikroskop görüntüsü, Büyütme 200X.....	47
Şekil 4.3. U87-MG Kontrol (A) ve U87-MG+MOLE (B) anti-AKT, İmmunositokimya, Büyütme 400X.....	47
Şekil 4.4. U87-MG Kontrol ve U87-MG+MOLE Grupları, anti-AKT, İmmunositokimyasal Analiz Optik Dansite İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları. .	48
Şekil 4.5. U87-MG Kontrol (A) ve U87-MG+MOLE (B) anti-FOXO3a, İmmunositokimya, Büyütme 400X.....	49
Şekil 4.6. U87-MG Kontrol ve U87-MG+MOLE Grupları anti-FOXO3a Optik Dansite İmmunositokimyasal Analiz İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları.....	50
Şekil 4.7. U87-MG Kontrol (A) ve U87-MG+MOLE (B) anti-Bim, İmmunositokimya, Büyütme 400X.....	51
Şekil 4.8. U87-MG Kontrol ve U87-MG+MOLE Grupları anti-Bim Optik Dansite İmmunositokimyasal Analiz İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları.....	52

Şekil 4.9. U87-MG artan MOLE konsantrasyonu ile % hücre canlılığı MTT sonucu ve elde edilen IC50 değeri.....	52
Şekil 4.10. T98-G hücre hatlarının kontrol grubu (a) ve IC50 değeri olarak belirlenen 291,3 µg/ml dozda MOLE uygulamasının ardından T98-G deney grubu (b) 24saat inkübasyon sonrası inverted mikroskop görüntüsü, Büyütme 200X.	53
Şekil 4.11. T98-G Kontrol (A) ve T98-G+MOLE (B) anti-AKT, İmmunositokimya, Büyütme 400X.	53
Şekil 4.12. U87-MG Kontrol ve U87-MG+MOLE Grupları anti-AKT Optik Dansite İmmunositokimyasal Analiz İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları.....	54
Şekil 4.13. T98-G Kontrol (A) ve T98-G+MOLE (B) anti-FOXO3a, İmmunositokimya, Büyütme 400X.	55
Şekil 4.14. T98-G Kontrol ve T98-G+MOLE Grupları anti-FOXO3a Optik Dansite İmmunositokimyasal Analiz İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları.....	56
Şekil 4.15. T98-G Kontrol (A) ve T98-G+MOLE (B) anti-FOXO3a, İmmunositokimya, Büyütme 400X.	56
Şekil 4.16. T98-G Kontrol ve T98-G+MOLE Grupları anti-Bim Optik Dansite İmmunositokimyasal Analiz İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları.....	57
Şekil 4.17. U87-MG Kontrol (1) ve U87-MG+MOLE (2) CFA, Crystal Violet.....	58
Şekil 4.18. U87-MG Kontrol ve U87-MG+MOLE grupları Koloni Oluşum Yüzdeleri İstatistiksel Değerlendirme ImageJ, Colony Count J.....	58
Şekil 4.19. T98-G Kontrol (1) ve T98-G+MOLE (2) CFA, Crystal Violet.....	59
Şekil 4.20. T98-G Kontrol ve T98-G+MOLE Grupları Koloni Oluşumu İstatistiksel Değerlendirme ImageJ, Colony Count J	60

1. GİRİŞ

Kanser, günümüzde hem ülkemizde hem de dünyada oldukça yaygınlaşan bir sağlık sorunu olarak önemini her geçen gün artırmaktadır (1). Amerika Birleşik Devletleri'ndeki santral sinir sisteminin primer tümörlerinin yaşa göre yıllık insidansı 100.000'de 28,57 olup bu sayı her yıl 77.000 yeni vakaya denk gelmektedir (2).

Teşhis ve tedavi sürecindeki yeni gelişmeler ile umut veren ancak yeni birçok keşfe rağmen gizemini koruyan ve keşfedilmeyi bekleyen süreç araştırmacıları yeni bilimsel araştırmalara yönlendirmiştir. Kanserler aynı zamanda mortalite ve morbiditesiyle iş gücü kaybına neden olduğundan ekonomik kayıplar göz önüne alındığında sağlık sistemlerinin de tedavi açısından öncelikleri arasındadır (3).

Merkezi sinir sistemi vücudun dış dünya ile iletişimini ve uyumunu sağlayan bir kontrol ve koordinasyon merkezidir. Merkezi sinir sistemi tümörleri yerleştikleri bölge bakımından kanser hücrelerinin normal doku işlevlerini bozmalarıyla hem fonksiyon kaybına yol açarak ciddi morbidite yaratırlar hem de tanı, teşhis ve tedavi süreçleri zorludur (4). Tüm malign merkezi sinir sistemi tümörleri içerisinde beş yıllık sağ kalım oranları %34,4'tür ancak bu oran tümörün histopatolojisine göre büyük farklılık gösterir ki pilositik astrositom gibi daha genç yaşlarda gözlenen tümörler için beş yıllık sağ kalım %94,2 iken genellikle yaşlı popülasyonda gözlenen glioblastoma multiforme için maalesef %5,1'dir (5).

Gliomlar, tüm merkezi sinir sistemi tümörlerinin %80'ini oluşturur, bunların da %70 i astrositom, içlerinde en yaygını ise glioblastoma multiformedir (5).

Glioblastom, santral sinir sisteminin 100.000'de 3 sıklıkla en sık görülen ve beyin tümörleri arasında en sık rastlanan histolojik tipidir(2). WHO tarafından kılavuzlarda evre 4 yani en kötü prognozlu olarak kabul edilen tümör histolojik olarak pleomorfizm, belirgin nükleer atipi ve artmış mitotik indeksin yanında mikrovasküler proliferasyon ve nekroz da içermektedir.

Patolojik olarak belirgin mikrovasküler proliferasyon ve/veya nekroz varlığı esas tanısal işaretlerdir (6, 7). Yenilenen tanı kılavuzları kapsamında bazı genetik profiller desteklenerek tanı portföyü genişletilmiştir (8). Tedavisi, mevcut cerrahi teknikteki ilerlemeler, radyoterapi ve kemoterapideki bilimsel gelişmelere rağmen kompleks ve zordur(5). Bu tümör konusunda uzun yıllar içinde oluşan büyük bilgi birikimine rağmen küratif tedavi; mevcut tedavi seçeneklerine gelişen ilaç direnci, tümörün genetik heterojenitesi gibi sebeplerden halen mümkün değildir. Fakat teknik ve teknolojik gelişmeler ve moleküler biyolojisini anlayarak hedefe yönelik yeni tedavi seçenekleri sayesinde tedavi her zamankinden daha iyi şekilde yapılabilmekte, hasta sağkalımı ve hayat kalitesi yüksek tutulabilmektedir (9, 10).

GBM'in moleküler patolojisinde suçlanan mekanizmalardan biri PI3K/Akt/FoxO3a sinyal yolağıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalar FoxO3a ekspresyonunu prognoz ile de ilişkilendirmiştir. Glioblastoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada da sitoplazmik translokasyondaki FoxO3a'nın kötü prognoz ve metastaz kabiliyeti ile korele olduğu gösterilmiştir (11).

WHO'ya göre bitkisel kaynaklı ilaç kullanımı özellikle gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere örneğin Afrika'da %80, Çin'de %30-50, Avrupa ve Kuzey Amerika'da %50 gibi yüksek oranlarda tercih edildiğini sürdürmektedir (12).

Batı toplumlarında da başlayan 'doğaya dönüş' akımının etkisiyle bitkisel ürünlerin kullanımı oldukça popüler hale gelerek yaygınlaşmıştır. Hatta gelişmiş birçok ülkede insanların alternatif ya da tamamlayıcı tedavi metodlarından en sık bitkisel ürünleri tercih ettikleri gösterilmiştir (12).

Moringa oleifera, 'HayatAğacı' veya 'Mucize Ağacı', 'Drumstick (Bage) Ağacı', 'Yaban turpu Ağacı' veya 'Ben yağı Ağacı' olarak da adlandırılabilen oldukça büyük bir ağaçtır. Ağacın yaprakları, baklaları, çiçekleri gibi hemen hemen tüm bölümleri yenilebilir veya geleneksel bitkisel ilaç yapımında kullanılabilir özelliktedir. Ağacın neredeyse tüm bölümlerinin bu şekilde faydalı oluşu ona mucizevi ağaç olarak anılma şerefine erdirmiştir ki, hala yeni bilimsel keşiflerle yeni faydaları ortaya çıkmaktadır (13).

Moringa oleifera'nın yapılan birçok çalışma ile antiviral (14-16), antibakteriyel (17), antioksidan (17-21), antiinflamatuvar (21, 22), antiangiogenik (21), antiaterosklerotik (21), hipolipidemik (22) ve antihipertansif (23) etkileri saptanmıştır. Ayrıca hepatosellüler kanserde (16, 24), miyelomada (25), lösemide (24), deri papillomagenzinde (18), kolon kanserinde (26) ve meme kanserinde (27) antikanser etkileri gösterilmiştir.

Biz de çalışmamızda mevcut tedavi yöntemlerine rağmen halen küratif tedaviye ulaşılamamış, mortalitesi oldukça yüksek yeni tedavi arayışlarının sürdüğü glioblastoma multiforme tedavilerine katkı sağlamayı amaçlıyoruz. Tümörögenез ve metastaz süreçlerinde hem glioblastom hem de birçok kanserde önemi keşfedilmiş Akt/FoxO3a/Bim apoptotik yolağı üzerinde *Moringa oleifera*'nın apoptotik etkisi olup olmadığını araştırıyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sinir Sistemi

Sinir sistemi vücudun iç ve dış uyaranlara karşı uyum, tepki ve koordinasyonunu sağlayan en önemli sistemlerdendir. Anatomik olarak merkezi ve periferik sinir sistemi olarak ikiye ayrılır (28).

Merkezi sinir sistemi kraniyal kavite içinde korunan beyin, beyincik ile spinal kanal içerisinde korunan spinal korddan oluşur (28, 29).

Periferik sinir sistemi kraniyal, spinal, periferik sinirler, ganglionlar ile özelleşmiş motor ve duysal sinir sonlanmalarını kapsar (28).

Sinir sisteminin hücresel boyutu incelendiğinde nöronlar (sinir hücreleri) ve destek (glia) hücrelerinden oluşmuştur. Nöronlar sinir sisteminin fonksiyonel birimi iken fonksiyonlarının düzgün biçimde yerine getirebilmeleri için destek sağlayan glia hücreleri ile mutlaka iletişim içinde olmalıdırlar (28-30).

Nöronlar, dış ortamdan ve diğer hücrelerden impulsları alarak uzantıları aracılığıyla uyarıyı elektriksel impuls olarak gönderme konusunda özelleşmiş hücrelerdir. Destek hücreleri nöronlara yakın yerleşimli ancak iletim yapmayan hücrelerdir. Bu hücreler glia hücreleri olarak adlandırılırlar (28).

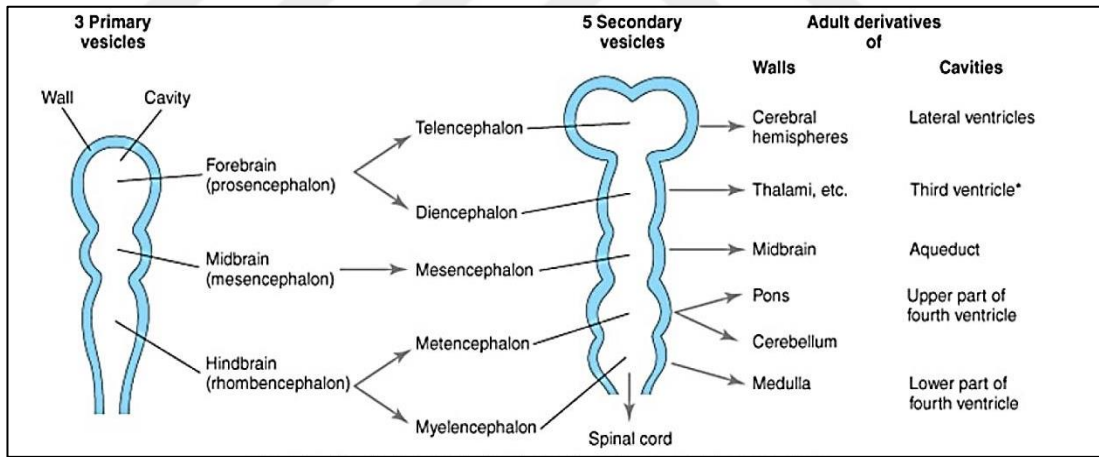
2.1.1. Merkezi Sinir Sistemi Embriyolojisi ve Histolojisi

Sinir sistemi üç erken embriyonik tabakadan biri olan ektoderm kökenlidir (29). 3.haftanın başlarında orta dorsal bölgede primitif düğümün önünde ektodermal bir kalınlaşma olan nöral plak oluşumu ile başlar daha sonra nöral katlantıların dış kenarları yükselerek orta hatta birleşip nöral tüpü oluşturur (30). Bu kaynaşma servikal bölgede başlayarak hem sefalik hem de kaudal yönde ilerleme ile gerçekleşir. Kraniyal nöropor 25. günde, kaudal nöropor ise 28. günde kapanana dek nöral tüp amniyon boşluğu ilişkisi korunacaktır (30).

Bu katlantıların birleşerek nöral tüpün üzerindeki epidermisi oluşturacak yüzey ektoderminden ayrılması ile nöral krista hücreleri oluşur ki bu hücreler de geniş alanlara yayılarak periferik sinir sistemi hücrelerine ve diğer bazı nöron dışı hücrelere farklılaşacaklardır (29).

Nöral tüpün oluşumunu takiben sefalik ucunda 3 (üç) dilatasyon bölgesi olarak 3 primer beyin vezikülü oluşur. Bunlar prosensefalon (ön beyin), mezensefalon (orta beyin) ve rombensefalon (arka beyin) dur. (30, 31)

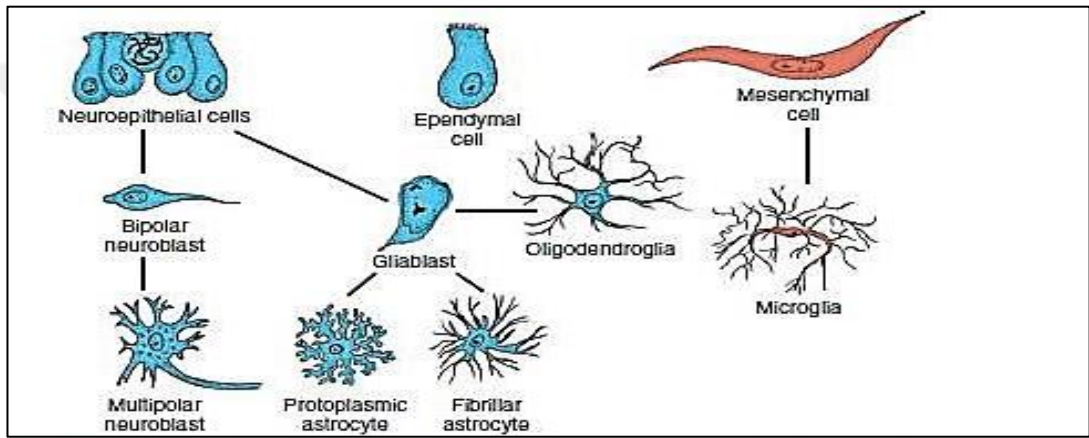
5. haftada primer beyin vezikülleri 5 sekonder veziküle farklılaşır. Bunlar prosensefalon'dan gelişen telensefalon ve diensefalon, mezensefalon (aynen kalır), rombensefalon'dan gelişen metensefalon ve myelensefalon'dur. Oluşan her sekonder vezikül gelişimin ileri evrelerinde beynin farklı birer parçasının oluşumuna katılacaktır. Bu bölümün altında kalan nöral tüp kısmından ise spinal kord gelişir (30).



Şekil 2.1: Gelişim esnasında 3 primer ve 5 sekonder beyin vezikülü ile gelişen yapılar (31).

Telensefalon serebral hemisferleri; diensefalon optik veziküller, talamus, hipotalamus ve epifiz bezini; mezensefalon görmeye ait anterior ve işitmeye ait posterior kollikulusları; metensefalon serebellum ve ponsu; myelensefalon ise medulla oblongatayı oluşturur. Aşağıya doğru spinal kord lümeni yani diğer adıyla canalis centralis beyin vezikülleri ile devamlılık halindedir (30, 31).

Hüresel düzeyde incelendiğinde nöral tüpün kapanmasının ardından nöral tüp duvarının döşeyen nöroepitelyal hücreler duvar boyunca ilerleyerek kalın bir yalancı çok katlı epitel oluşturur ki, bu da daha fazla nöroepitelyal hücre üretimini tetikleyerek nöroepitelyal tabakayı veya nöroepitelyumu oluşturur (30). Nöroepitelyal hücreler de bölünerek nöroblastlar yani primitif sinir hücrelerine dönüşürler. Bu hücreler daha geniş, yuvarlak nükleuslu, koyu nükleolusludurlar (28, 30). Göç hareketleri ve uzantı kazanma gibi farklılaşma evreleri ile polarite kazanmış bipolar, multiploar gibi isimlendirilen nöron oluşumu gerçekleşir (30, 31).



Şekil 2.2: Merkezi nörogliaların gelişimi (30).

Sinir sisteminde nöronlara fonksiyonel ve metabolik birçok alanda desteklik sağlayan glia hücreleri de bulunur (29). Memeli beyinde nöronlardan on kat daha fazla miktarda bulunan glial hücreler nöronların hayatta kalmalarını sağlayacak kadar değerli ve önemlidirler (29).

Glia hücreler nöronlara olan yakın komşulukları nedeniyle uzun süre sadece fiziksel anlamda destekleyici olarak tanımlanmalarına rağmen yeni görüşlere göre nöronların glial hücrelere fonksiyonel olarak bağımlı olduğu ortaya konmuştur (28).

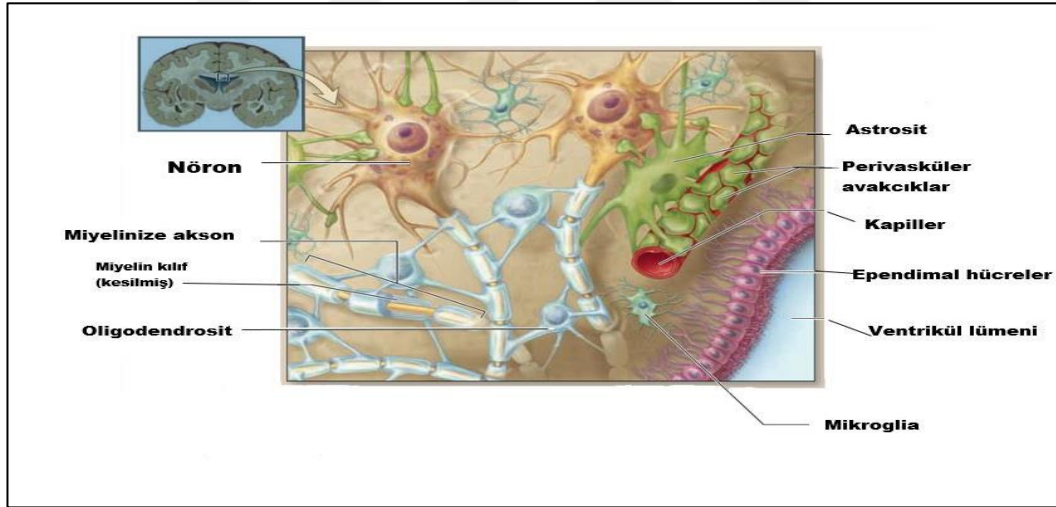
Bazı araştırmacılara göre glial hücreler bağ doku görevi üstlenirler çünkü hem nöron hücre gövdelerini hem de akson ve dendrit uzantılarını sararak nöronlar arasındaki boşluğu kapatırlar (29).

Böylece nöronal aktivite için uygun ortam sağlanabilmiş olur. Bu desteğin en önemli kanıtlarından biri de embriyonik dönemde gerçekleşir (28, 30). Beyin gelişiminin erken dönemlerinde embriyonik glial hücreler nöral tüp boyunca ışınal tarzda uzanarak fiziksel bir iskelet görevi yaparak nöronların beyindeki uygun yerlerine doğru bir şekilde göç etmelerine öncülük ederler.(28, 31)

Gliablastlar ilkel destek dokusu hücreleridir. Nöroblast üretiminin durmasıyla nöroepitelyal hücreler tarafından nöroepitelyumun tabakalarına göç edip farklılaşarak oluşurlar (30, 31).

2.1.2. Merkezi Sinir Sistemindeki Glia Hücreleri

Merkezi sinir sisteminde astrositler, oligodendrositler, mikrogliya ve ependim hücreleri olmak üzere 4 tip glia hücresi bulunmaktadır ve bu hücreler merkezi nöroglia olarak adlandırılırlar (28).



Şekil 2.3: Merkezin sinir sisteminin glia hücreleri (29).

2.1.2.1. Astrositler

Gliablastların nöroepitelyal tabakadan göçü ile oluşurlar (30). Astrositler Yunanca (astron, yıldız+kytos, hücre) ‘yıldız şekilli hücre’ anlamına gelir ve 2 (iki) tipi tanımlanmıştır (29). Fibröz astrositler daha az sayıda ve daha uzun uzantılara sahipken, protoplazmik astrosit daha çok sayıda ve dallanmış ancak daha kısa

uzantıları ile tanınır (28, 29, 32). Beyin tümörlerinin büyük çoğunluğu fibröz astrositlerden kaynaklanan astrositomalardır (29, 32). Astrositler morfolojik olarak heterojenite gösteren merkezi sinir sistemi hücrelerine fiziksel ve metabolik destek sağlayan hücrelerdir (28). Merkezi sinir sisteminin en yaygın bulunan glial hücreleridir (29, 33).

Astrositler kan damarlarıyla nöronlar arasında yerleşmiş hücrelerdir (29). Perivasküler son ayaklarıyla kapillerler ile nöronlar arasında metabolik denge sağlamak, embriyonik dönemde farklılaşan nöronların hareket ve konumlarını yönlendirmek, beyin zarlarını döşeyen glial sınırlayıcı zar olarak da isimlendirilen kan beyin bariyerinin yapısına katılmak, herhangi bir yaralanma ya da doku hasarını nedbe dokusu ile kapatabilmek gibi görevleri vardır (29, 32).

2.1.2.2. Oligodendrositler

Oligodendrositlerin kökenleri bazı kaynaklara göre glioblastlar olarak gösterilse de net bir ifade bulunmamaktadır (30, 31). Yunanca (oligos, küçük, az+; dendron, ağaç+; kytos, hücre) kelimelerinin birleşiminden oluşmuş her biri yaprak gibidir ve yakınındaki aksonu sararak çok sayıda oligodendrosit tarafından miyelin kılıf yapılır (28, 29). Oligodendrositler merkezi sinir sisteminde iletiyi hızlandıracak miyelin kılıf sentez ve devamlılığını sağlamada görevlidir (28, 33).

Miyelin kılıfın oluşumu aksondaki elektriksel olarak yalıtımını sağlayarak iletiyi hızlandırır (29). Yoğun lipit içerikleri nedeniyle rutin histolojik boyalar ile beyaz görünürler ve koyu, yuvarlak çekirdekleri ve bol miktarda golgi aygıtı içermelerinden dolayı renksiz sitoplazmaları ile tanınabilirler (29, 33).

2.1.2.3. Mikroglialar

Gelişimin ikinci yarısında oluştuğu bilinen bir diğer önemli destek hücresi tipi olan mikroglialar diğerlerinden farklı olarak vasküler mezensekimden yani mezodermal makrofaj prekürsörlerinden-spesifik olarak da kemik iliğindeki granülosit/monosit progenitör (GMP) hücrelerinden- köken alıp nöral tüpü infiltre ederek CSF-1 (koloni stimüle edici faktör-1) etkisiyle proliferer olur ve ameboid

özelliik gösteren, fagositoz yapabilme yetenekleri olan glia hücreleri olarak gelişimlerini tamamlarlar (28, 30).

Mikroglialar da diğler glial hücreler gibi en az nöronlar kadar yaygın bulunsalar da miktar olarak astrosit ve oligodendrositlere göre daha azdırlar (29). Nöral progenitör hücrelerden değıil, kan dolaşımındaki monositlerden köken alışı onu makrofajlar ve antijen sunan hücreler ile aynı ailenin bir üyesi olarak tanımlatır (29, 33).

Hücre çekirdekleri rutin histolojik boyamada daha küçük, koyu renk çekirdekleri ile ayırt edilseler de immunohistokimyasal olarak özel boyalarla uzantıları da gösterilebilir (28, 29).

2.1.2.4. Ependim Hücreleri

Nöroepitelyal hücreler spinal kordun canalis centralisini döşemek üzere nöroblast ve gliablast üretimi tamamlandıktan sonra ependimal hücrelere farklırlar (30). Ependim hücreleri beyinde ventriküller ile spinal kordun santral kanalını döşeyerek destek olan kübik prizmatik glial hücrelerdir (28). Bu hücrelerin apikal uçları beyin omurilik sıvısının (BOS) hareketini sağlamak üzere silyumlara ve emilim gerçekleştirmek üzere uzun mikrovilluslara sahiptir (29, 32).

2.2. Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri

2.2.1. Epidemiyoloji

GLOBOCAN dünyanın birçok ülkesinin kanser verilerini analiz eden, başlıca kanser türlerinin insidans, morbidite ve mortalite düzeyleri ile bunların birbirleriyle karşılaştırmalı sonuçlarının ortaya koyulduğu bir projedir. Son yayınlanan rapor GLOBOCAN 2020'ye göre 2020 yılında 19,3 milyon yeni kanser vakası tespit edilmiş yaklaşık 10 milyon kanserden ölüm rapor edilmiştir. Bu veriler ışığında her 5 erkekten ya da kadından birinin kansere yakalandığı, yakalananlardan da 8 erkekten birinin ya da 11 kadından birinin kanser nedeniyle öldüğü belirtilmiştir (34).

2020 yılına ait 36 kanser türünün insidans ve mortalite oranlarında beyin (sinir sistemi) tümörleri %1,6 insidans oranı ile 308.102 yeni vaka ve %2,5 mortalite ile 251.329 ölüm sayısına sahiptir (34).

Türkiye’de ilk kez 1982 yılında kanser, bildiri zorunlu hastalıklar kapsamına alınarak akabinde 1983 yılında ‘Kanserle Savaş Daire Başkanlığı’ kurulmuştur. Kanser sıklığı araştırmaları yapılan bu dönemde organa özgü kanser sayılarının ortaya çıkması ile kanserin ülkemizdeki profili çizilmiştir (35, 36). Önce pasif sistem olarak başlayan ancak yeterince kaliteli ve verimli sonuç alınamaması nedeniyle 1992 yılında aktif kayıt sistemine geçilmiştir. Pilot uygulama ‘Kanser Kayıt ve İnsidans Projesi’ olarak İzmir’de başlamış ardından tüm ülkeye yayılarak 2013 yılında 81 ilde aktif kanser kayıtçılığı başlamıştır (1). Hatta veriler için tamlık, geçerlilik ve zamanındalık ifadeleri de tanımlanarak veri kalitesi standardize edilmiştir (1).

Tablo 2-1. GLOBOCAN 2020 verileri ve Türkiye Birleşik Veri Tabanı Kanser Verilerinin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Cinsiyete Göre İnsidans Hızları (1).

	Erkek*	Kadın*
Dünya	222,0	186,0
Batı Asya	198,3	162,3
Orta ve Doğu Avrupa	293,8	220,9
ABD	400,9	333,2
Türkiye**	259,2	187,0

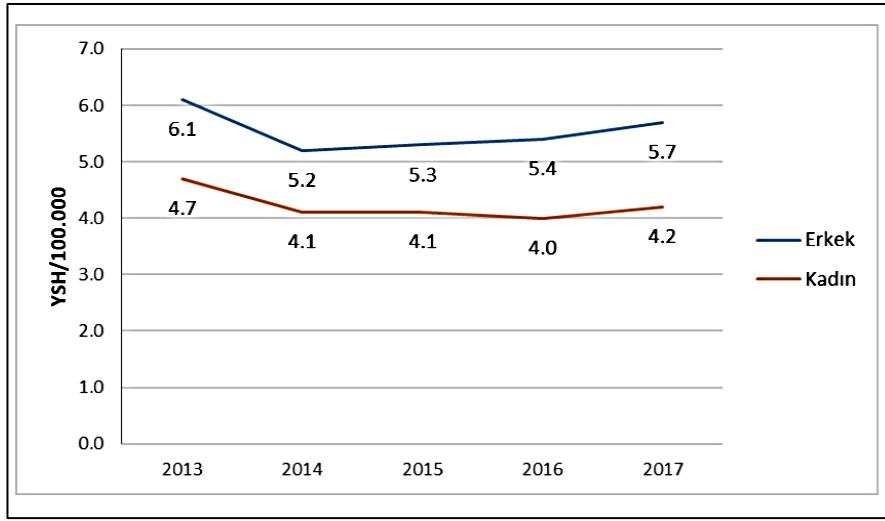
*Yaşa göre standardize edilmiş hız 100.000 kişide ** Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2017

2021 yılında Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü tarafından yayınlanan Türkiye 2017 kanser verileri Dünya’da Orta ve Doğu Avrupa verileri, Batı Asya verileri ve ABD (Amerika Birleşik Devletleri)’nin son kanser verileri olan 2020 yılı LOBOCAN raporu verileri ile karşılaştırılarak hazırlanan raporda Türkiye’deki kanser insidansının dünya insidansının bir miktar üzerinde olduğu bulunmuştur(1). Ancak Orta ve Doğu Avrupa ile Amerika gibi gelişmişlik düzeyi yüksek olan ülkelerin kanser insidansları, ülkemize göre daha da yüksektir (34).

Tablo 2-2. Türkiye’de yaşa göre standardize edilmiş kanser hızı (Türkiye Kanser İstatistikleri, Ankara, 2021)(1).

ERKEK			KADIN		
KD-10	Topograf	YSH	KD-10	Topograf	YSH
C00-96	Tüm Topografiler	259,2	C00-96	Tüm Topografiler	187,0
C00	Dudak	0,9	C00	Dudak	0,2
C01-C02	Di	0,7	C01-C02	Di	0,5
C03-C06	Ağız	0,9	C03-C06	Ağız	0,4
C07-C08	Tükürük Bezi	0,5	C07-C08	Tükürük Bezi	0,4
C09	Tonsil	0,3	C09	Tonsil	0
C10	Diğer Oronazal	0,1	C10	Diğer Oronazal	0
C11	Nasofarinks	1,2	C11	Nasofarinks	0,4
C12-C13	Hipofarinks	0,3	C12-C13	Hipofarinks	0,1
C14	Farinks, tanımlanmamış	0	C14	Farinks, tanımlanmamış	0
C15-26	Sindirim Organları	53,9	C15-26	Sindirim Organları	29,7
C15	Özofagus	1,8	C15	Özofagus	1,0
C16	Mide	14,3	C16	Mide	6,4
C17	İnce Barak	0,7	C17	İnce Barak	0,5
C18	Kolon	15,3	C18	Kolon	9,6
C19-C20	Rektum	9,8	C19-C20	Rektum	5,1
C21	Anüs	0,4	C21	Anüs	0,2
C22	Karaciğer	4,1	C22	Karaciğer	1,7
C23-C24	Safra kesesi vb.	1,6	C23-C24	Safra kesesi vb.	1,3
C25	Pankreas	5,9	C25	Pankreas	3,9
C26	Diğer Sindirim Organları	0,1	C26	Diğer Sindirim Organları	0,1
C28-34,C37-C38	Solunum Organları	63,3	C28-34,C37-C38	Solunum Organları	12,1
C28-C31	Burun, sinüsler vb.	0,3	C28-C31	Burun, sinüsler vb.	0,2
C32	Larinks	5,7	C32	Larinks	0,4
C33-C34	Trakea, bronş, akciğer	56,7	C33-C34	Trakea, bronş, akciğer	11,1
C37-C38	Diğer Toraks organları	0,6	C37-C38	Diğer Toraks organları	0,4
C40-C41	Kelebek	1,1	C40-C41	Kelebek	0,8
C43	Deri Melanoma	1,7	C43	Deri Melanoma	1,2
C44	Diğer Deri	25,5	C44	Diğer Deri	16,7
C45	Melanolyoma	0,1	C45	Melanolyoma	0,4
C46	Kapıci sarkoma	0,9	C46	Kapıci sarkoma	0,3
C47,C49	Konjunktiv, Yassıyâk doku	1,8	C47,C49	Konjunktiv, Yassıyâk doku	1,5
C50	Meme	8,5	C50	Meme	47,7
C51-58	Erkek Genital Organları	39,9	C51-58	Kadın Genital Organları	23,2
C60	Penis	0,1	C51	Vulva	0,5
C61	Prostat	35,7	C52	Vajina	0,2
C62	Testic	4,0	C53	Uterus Serviksi	4,3
C63	Diğer erkek genital	0,1	C54	Uterus Korpusu	10,7
			C55	Uterus vâsvâsı	0,7
			C56	Over	6,3
			C57	Diğer Kadın Genital	0,5
			C58	Plevana	0,0
C64-68	Üriner Organlar	27,9	C64-68	Üriner Organlar	6,9
C64	Birlik	7,2	C64	Birlik	3,8
C65	Renal Pelvis	0,2	C65	Renal Pelvis	0,1
C66	Üriner	0,2	C66	Üriner	0,1
C67	Mesane	20,1	C67	Mesane	2,8
C68	Diğer Üriner organları	0,2	C68	Diğer Üriner organları	0,1
C70-C72	Beyle, Meniskuler, Merkezi Sinir Sistemi	5,7	C70-C72	Beyle, Meniskuler, Merkezi Sinir Sistemi	4,2
C73	Trakea	4,4	C73	Trakea	2,4
C74-75	Diğer Endokrin Bezi	0,4	C74-75	Diğer Endokrin Bezi	0,5
C74	Adrenal bez	0,3	C74	Adrenal bez	0,3
C75	Diğer Endokrin	0,1	C75	Diğer Endokrin	0,2
C81-85,88,90-96	Lenfoid ve Hematopoetik Dokular	18,9	C81-85,88,90-96	Lenfoid ve Hematopoetik Dokular	13,2
C81	Hodgkin hastalığı	2,1	C81	Hodgkin hastalığı	1,5
C82-C85,C96	Non-Hodgkin lenfoma	7,1	C82-C85,C96	Non-Hodgkin lenfoma	4,8
C88	İmmünoyokleniferatif has.	0,1	C88	İmmünoyokleniferatif has.	0,0
C90	Multiple Myelom	2,8	C90	Multiple Myelom	2,0
C91	Lenfoid Lüsemi	3,6	C91	Lenfoid Lüsemi	2,5
C92-C94	Myeloid Lüsemi	2,8	C92-C94	Myeloid Lüsemi	2,2
C95	Lüsemi, tanımlanmamış	0,4	C95	Lüsemi, tanımlanmamış	0,2
C98,C48,C76,C77,C99	Diğer&Tanımlanmamış	5,2	C98,C48,C76,C77,C99	Diğer&Tanımlanmamış	3,8

2021 yılında Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü tarafından yayımlanan 2017 Türkiye Kanser İstatistikleri verilerine göre Türkiye’de yaşa göre standardize edilmiş kanser hızı erkeklerde yüzde 259,2; kadınlarda yüzde 187,0’dır (Tablo 2-1,2-2). Toplam kanser insidansı 180.288 kişi ile yüzde 223,1’dir(1).



Şekil 2.4. Türkiye Birleşik Veri Tabanı 2017 verilerine göre merkezi sinir sistemi tümörlerinin cinsiyete göre yaşa standardize edilmiş hızı (100.000’de) (1).

2013-2017 Türkiye Birleşik Veri Tabanı verilerine göre; beyin, meninksler ve merkezi sinir sistemi tümörlerinin yaşa göre standardize edilmiş insidans hızlarını gösteren grafikte de görüldüğü üzere 2017 yılında erkeklerde 100.000’de 5,7 kadınlarda ise 100.000’de 4,2 olarak bildirilmiştir (Şekil 2-4).

Türkiye Birleşik Veri Tabanı verilerine göre merkezi sinir sistemi tümörleri Türkiye’de erkeklerde en sık 80-84 yaş aralığında %27,8 insidans ile, kadınlarda en sık 75-79 yaş aralığında %18,5 insidans ile gözlenmiştir(1). Veriler karşılaştırıldığında erkeklerde daha ileri yaşlarda ve daha yüksek insidans ile görüldüğü göze çarpmaktadır.

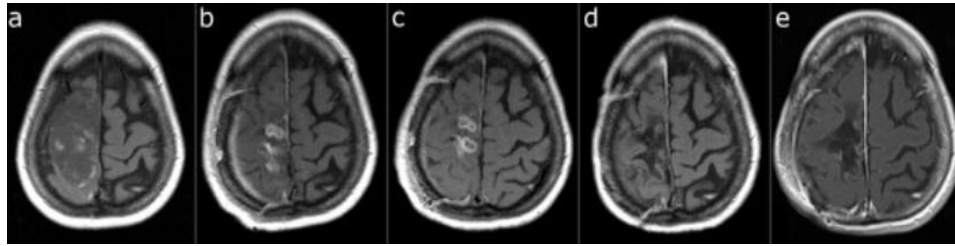
2.2.2. Güncel Tanı ve Tedavi Yaklaşımları

Merkezi sinir sistemi vücudun dış dünya ile iletişimini ve uyumunu sağlayan bir kontrol ve koordinasyon merkezidir. Merkezi sinir sistemi tümörleri yerleştikleri bölge bakımından kanser hücrelerinin normal doku işlevlerini bozmasıyla hem fonksiyon kaybına yol açarak ciddi morbidite yaratırlar hem de tanı, teşhis ve tedavi süreçleri zordur (4). Tüm malign merkezi sinir sistemi tümörleri içerisinde beş yıllık sağ kalım oranları %34,4’tür ancak bu oran tümörün histopatolojisine göre büyük farklılık gösterir ki, pilositik astrositom gibi daha genç yaşlarda gözlenen tümörler

için beş yıllık sağ kalım %94,2 iken genellikle yaşlı popülasyonda gözlenen glioblastoma multiforme için maalesef %5,1'dir (5).

Glioblastom tanılı hastalarda tedavi protokollerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada hastaların başvuru semptomlarının baş ağrısı, ekstermitede güçsüzlük, bilinç durumu değişikliği, bulantı- kusma, konsantrasyon bozukluğu, epileptik nöbet, ataksi, üriner inkontinans, görme bozukluğu gibi şikayetler olduğu hatta bunların %48,75'lik kısmının hastaları rahatsız ederek hekime erken başvurmayı gerektirecek düzeyde 1 aydan kısa süredir, sadece %7,5'lük kısmının ise 3 aydan fazla var olduğu gösterilmiştir (37).

Hastalarda en sık gözlenen şikayet baş ağrısıdır. Schankin ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı kesitsel bir araştırmada hastalarda baş ağrısı prevalansı %60 olup %52'sinde tek semptom olarak bulunmuştur (38). Ayrıca hastalarda hem primer hem de metastatik beyin tümörü varlığında baş ağrısı semptomlarının olduğu, tipik olarak bifrontal olup çoğu zaman pozisyonel artabildiği, genellikle eşlik eden anormal nörolojik muayene bulgularıyla beraber bulantı kusma gözlendiği ifade edilmiştir (39). Donuk tipte baş ağrısı olan hastalar genellikle glioblastoma multiforme ve meningiom tanısı almaktadır (38).



Şekil 2.5: GBM tanılı 52 yaşında kadın hasta, kontrastlı MRI

(Epileptik nöbet ve sol hemiparezi şikayeti ile gelen hastanın kontrastlı MRI ön tanısı yüksek dereceli glioma, patolojik sonuç GBM. a. Nisan 2004 preop sağ orta zonda tümör. b. Temmuz 2004 postop, GBM. Radyoterapi ve temozolomid kemoterapi kombine tedavi. c. Eylül 2004 TTF (Tumor TreatmentField) tedavisi başlanmış, nüks şüphesi d. Haziran 2005 TTF tedavisi devam, nüks yok. e. Ağustos 2011 nüks yok (40).)

Semptomatik hastalarda görüntüleme yöntemi olarak kontrastlı bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans (MR) kullanılarak tümörün anatomik lokalizasyonu yaygınlığı, tipi ve malignitesi belirlenebilir (41). Ayrıca BT ve MR

tedavi sürecinde stereotaksik biyopsi lokalizasyonu belirleme, rezeksiyon için yaklaşım yeri belirleme, radyasyon ve deneysel birtakım terapötiklerin rehberlik uygulanmasında, tümör regresyonu, radyasyon nekrozu varlığının tespiti gibi tedaviye yanıt değerlendirilmesinde de oldukça önemlidir (41). Pozitron Emisyon tomografi ve MR spektroskopi tanı sürecinde enflamatuar süreçler ile karışıklığa sebebiyet verebileceğinden birincil tanı yöntemi olarak kullanılmaz. Ancak tümör metabolizmasının ve metastatik yayılımının saptanmasında değeri oldukça büyüktür (41).

Glioblastoma multiforme tanılı hastaların tedavi seçenekleri cerrahi, kemoterapi ve adjuvan radyoterapidir. Ancak mevcut tedavi protokolleri arasında genellikle yüz güldürücü sonuçlar cerrahi rezeksiyonun ardından Temozolomid (TMZ) kemoterapötüğü ile yapılan tedavidir (42). 2005 yılından itibaren kullanılan cerrahi rezeksiyonun ardından Temozolamid (TMZ) konkomitan tedavisi (KonkT) ile hastaların median yaşam sürelerinin 13-17 aya kadar çıkabildiği gözlemlenmiştir (42).

Temozolomid GBM tedavisinde birincil tedavinin bir parçası olarak kabul görmüş ve uygulanmakta olan bir kemoterapötik ajandır (43) Ancak GBM'li hastaların çoğu muhtemelen tümör biyolojisindeki heterojenite vb. nedenlerle kemoterapötik ajanlara direnç geliştirmiştir. Tedaviye yanıtızsızlık mortalite oranlarını önemli ölçüde artırmaktadır(43, 44).

2009 yılında tümörün yüksek anjiogenez yapabilme özelliğine yönelik ABD'de hızlandırılmış Food and Drug Administration (FDA) onayı almış bir antianjiogenik ajan olan Bevacizumab (BEV) ile Irinotecan (IRN)'ın özellikle nüks GBM vakalarında umut vaad edici sonuçları olduğu ortaya konmuştur.

Antianjiogenik Kombinasyon Terapi (AKT) adıyla anılan bu tedavi ile nüks GBM tanılı hastalarda 6 aylık progresyonsuz sağkalım %50 gibi yüksek orandadır (42, 45).

Nüks GBM vakaları için bir diğer yeni yöntem ise Novo-TTF (Tumour Treatment Fields) olarak tanımlanan tümör alanına hastanın ekstra ve intarkraniyal bağlantılı olarak yerleştirilen elektrotlarla orta frekanslı elektrik dalga,

pil prensibi ile çalışan tümör hücrelerinin anafaz telofaz siklus parçalarına etkiyerek mitozu engelleyen bir tedavi seçeneği olarak sunulmuş, yine glioblastom için FDA onayı almıştır (46). Klinisyenlere mevcut kanser tedavi protokolleriyle sinerjistik etkisinin iyi olabileceği ifade edilmiştir (46).

2.2.3. Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Sınıflandırılması

Dünya çapında ortak histopatolojik tanı kriterleri ile tanısal yaklaşımda bulunabilmek adına birçok kanser türü için de olduğu gibi merkezi sinir sistemi tümörlerinin tanısı için -belirli aralıklarla güncellemeler ile WHO (World Health Organisation) tanı kılavuzları yayınlamıştır. Tanı kılavuzları yıllar içerisinde tümör patogenezindeki yeni keşiflerin de etkisiyle genişletilmiştir. 1979 yılında kılavuzda sadece histopatolojik tanım kullanılırken 1993'te immnohistokimyasal analizler, 2000 yılında genetik birtakım profiller, 2007 yılında histopatolojik bazı tanımlamalar eklenmiştir (47, 48).

2007 yılı ve daha önceki sınıflandırmalarda olduğu gibi, ana kategorilerin çoğu, tümör hücrelerinin histolojik kökenine ve bunların gözlendiği alanlara dayandırılmaktaydı (48). Hücrel kaynakına göre ana gruplar glial, nöronal, embriyonel, meningeal, mezenkimal, melanositik, lenfositik, histiyositik ve germ hücreli tümörlerdir.

WHO 2016 sınıflaması yayınlanmadan önce 2014 yılında Uluslararası Nöropatoloji Topluluğu (International Society of Neuropathology-ISON) hem tümör patogenezi üzerine yapılan moleküler çalışmaların artması hem de daha önceki sınıflamaların artık yetersiz kalması nedeniyle yeni bir kitapçık yayınlamıştır (49). Bu kitapçıkla birlikte tümörün histopatolojik özelliklerine ek olarak moleküler bileşenler de katılarak yeni bir tanı sistemi önerisi ortaya konmuştur (47).

Tanı ve tedavi sürecinde hızla gelişen moleküler patolojiye yönelik araştırmalar yeni bir sınıflandırma yaklaşımını ihtiyaç haline getirmiş ve WHO (World Health Organisation) 117 katılımcının ortak kararı ile 2016 yılında histoloji ve moleküler patolojiyi birleştirmeye dayalı bir sınıflandırma sistemi geliştirmiştir (47). 2016 yılında yapılan bu sınıflama ile histopatolojik tanıya moleküler profil

tanımlanması eklenerek tanı koyma şekli güncellenmiştir. Bu yeni sınıflama ile ilk kez, tümör sınıflandırılmasında histolojik yapı ile birlikte bazı moleküler belirteçler beraber kullanılmıştır (47). Glial tümörler klinik pratikte WHO tarafından da kabul gördüğü gibi düşük ve yüksek dereceli gliomlar olarak sınıflandırılmışlardır. Grade I-II düşük dereceli, III-IV yüksek dereceli olarak tanımlanmıştır (50). Astrositik, oligodendrogial ve glioblastoma tümörleri tek bir başlık olarak 'diffüz glioma' olarak birleştirilmiştir. Diffüz astrositoma ve anaplastik astrositoma tanılarına genetik sınıflama eklenmiştir.

2016 WHO sınıflamasını yayın sürecinde emeği geçen ISN (International Society of Neuropathology daha sonra da cIMPACT-NOW (the Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy) adıyla toplantılarla da verilerini makaleler şeklinde yayınlamaya devam etmiştir (51-56).

Bu nakaleler yeniliklerin nöropatoloji, nöroonkoloji ve nöroşirurji uzmanlarının takip ve tedavide kullanabilmesi açısından yol gösterici olmuştur. Bilimsel çalışmalar ile de aynı hızda desteklenerek bilime ve kliniğe ciddi katkılar sunulmuştur. cIMPACT-NOW'un ilk güncellemesi 2018 Ocak (52) ayında yapıldıktan sonra bunu aynı yıl Mart (57) ve Eylül (53), 2019 Mart (54), 2020 Ocak (55), 2020 Nisan (51), 2020 Haziran (56), 2021 Haziran (8) ve güncellemeleri izlemiştir.

2018 Ocak güncellemesinde WHO 2016 sınıflamasına göre moleküler değişikliklere karar verilemeyen ya da test sonuçlarında uyumsuzluk olan tümörler için kullanılan NOS (Not otherwise specified-tanımlanmamış) ifadesi tanıda zorluk yaşanan her durumda kullanılmaya başlayıp klinik karmaşaya sebebiyet verdiği için NOS (Not otherwise specified-tanımlanmamış) ifadesinin artık sadece moleküler değişiklikler için test yapılamayan durumlarda kullanılmak üzere sınırlandırılmış, yeni ifade olarak NEC (Not elsewhere classified)'in ise gerekli moleküler testler yapılmasına karşın sonuçların tanı kılavuzu ile uyumsuz olduğu vakaları tanımlamak üzere kullanılması önerilmiştir (52).

2018 Mart ayında yapılan ikinci güncelleme ile WHO 2016 sınıflamasında H3K27M mutasyonlu tümörler için orta hat gliomlarından başka tümörler de saptanabileceği, ancak saptanması halinde tümörü doğrudan grade 4 olarak evrelendirmenin eksik veya yanlış olacağı ifade edilmiştir. Ayrıca diffüz glial tümörler için öncelikle IDH mutasyonunu araştırılması ancak ek olarak ATRX (X'e bağlı alfa-Talasemi) mutasyonuna ve 1p/19q kodelesyonuna da bakılarak; saptanmaları halinde p53 mutasyonunun da araştırılması önerilmiştir (57, 58).

2018 Eylül ayında yapılan güncelleme kapsamında genellikle kötü prognoz ile seyreden bir tip olan gliom-IDH wild type terimi genişletilmesi önerilmiştir (53). Bu güncelleme ile gliom-IDH wild type için WHO sınıflamasına göre mitoz, nekroz, vasküler proliferasyon ya da vasküler endotelial proliferasyon varlığı ya da yokluğu ile gradelendirme profiline histopatolojik inceleme glioblastomayı desteklese dahi TERT (Telomeraz Reverse Transkriptaz) mutasyonu, kromozom 7 kazanımı/kromozom 10 kaybı, EGFR (Epidemal Büyüme Faktörü Reseptörü) amplifikasyonu gibi ek profillere bakılmasının gerekliliği ve varlıklarında tanının 'Glioblastom moleküler özellikleri gösteren diffüz glial tümör, WHO derece IV olarak güncellenmesi önerilmiştir (53).

2019 Mart ayında yapılan güncelleme çocukluk çağı düşük dereceli diffüz glial tümörlerinin erişkin tipleri ile farkları ve tanıya yönelik farklı yaklaşımların izlenmesinin gerekliliği vurgulanmıştır. IDH-wt pediatrik tipte IDH-wt/H3-wt; diffüz glial tümörlerde MYB (MyeloBlastosis Protooncogen Transcription Factor), MYBL1 (MYB Protooncogen Like1), FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor) değişiklikleri ve BRAF (B-raf Protooncogen, Serine Threonine Kinase) mutasyonunun araştırılması, değişiklik saptanmaması halinde KRAS (KRAS Protooncogen, GTPase) mutasyonu, BRAF füzyonu gibi diğer MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) yolağına ait moleküler değişikliklere bakılması ve bunların hiçbirinin olmaması durumunda tanının 'Diffüz Astrositom, IDH-wt (Isocitrate Dehydrogenase-wild type)' yerine; 'Diffüz astrositom NEC (Not Elsewhere Classified)' olarak belirtilmesi önerilmiştir (54).

2020 Ocak ayında yapılan güncelleme yaygın astrositik gliomlar için kullanılan diffüz astrositom, anaplastik astrositom ve glioblastom terimlerin farklı genetik ve klinik özellik göstermeleri nedeniyle IDH mutant ve daha çok erişkinlerde gözlenip daha kötü prognozlu seyreden IDH- wt (59) alt gruplarının daha net ayırım ile tanımlanması önerisi sunulmuştur. Bu kapsamda IDH 1 ve 2 mutasyonu varlığı, histolojik özellik, mitotik aktivite, mikrovasküler proliferasyon, nekroz ve CDKN2A/B (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A/B) homozigot delesyonu gibi parametrelerin de beraber değerlendirilmesi önerilerek derece 2,3 ve 4 tanımının kullanılmasını önermiştir (55).

2020 Haziran ayında yapılan güncelleme ile ependimal tümörlerin 2020 Haziran ayında yapılan güncelleme ile ependimal tümörlerin sınıflandırılması için histolojik olarak tanımlamaya devam edilmesi, mikropapiller ependimom için derece 2 atanabileceği önerilmiştir (56).

2021 Haziran ayında yapılan güncelleme ile yine ependimal tümörlerin sınıflandırması ve isimlendirilmesinde bazı moleküler belirteçler eklenmiştir (56).

Nihayetinde c-IMPACT-NOW'un merkezi sinir sistemi tümörleri sınıflandırmasına önerileri baz alınarak WHO tarafından Haziran 2021'de yeni bir sınıflama yayınlanmıştır. Bu yeni sınıflamada isimlendirmeler basitleştirilmiş, yalnızca klinik kullanıma sahip lokalizasyon, yaş grubu, genetik değişiklikler gibi bilgiler ile sadeleştirilmiştir (8). Romen rakamları yerine Arap rakamlarının kullanılmaya başlanmış, net olunamayan durumlarda mutlaka bakılan gen mutasyonlarının hem varlıkları hem yokluklarının belirtilmesi, NOS ve NEC tanımlarının bilinçli kullanımı, patoloğun histopatolojik tanımlamasının dikkate alınmasının gerekliliği önerilmiştir. (8).

Ayrıca WHO 2021 sınıflamasına göre yetişkin ve çocuk gliomalarının birbirlerinden ayrı değerlendirilmeleri gerektiği, yeni moleküler yaklaşımlarda keşfedildiği üzere IDH-mutant ve IDH-wt olarak ayrılan gliomalar için bakılması önerilen farklı mutasyonlar da tanımlanmıştır. Gliomaların %90'ını oluşturup erişkin popülasyonu daha çok etkileyen IDH-wt gliomalarda (59) TERT promotör

mutasyonu, EGFR amplifikasyonu, kromozom 7 kazanımı/10 kaybı özelliği ile tanımlanmıştır. IDH-mutant olan %10'luk kesim ise tek tip astrositom, IDH-mutant olarak isimlendirilerek prognoz belirlenebilmesi açısından CDKN2A/B homozigot delesyon varlığı ile histolojik olarak mikrovasküler proliferasyon ve nekroz bulguları olmasa dahi en kötü prognozlu derece 4 sınıfına dahil edilmiştir (8).

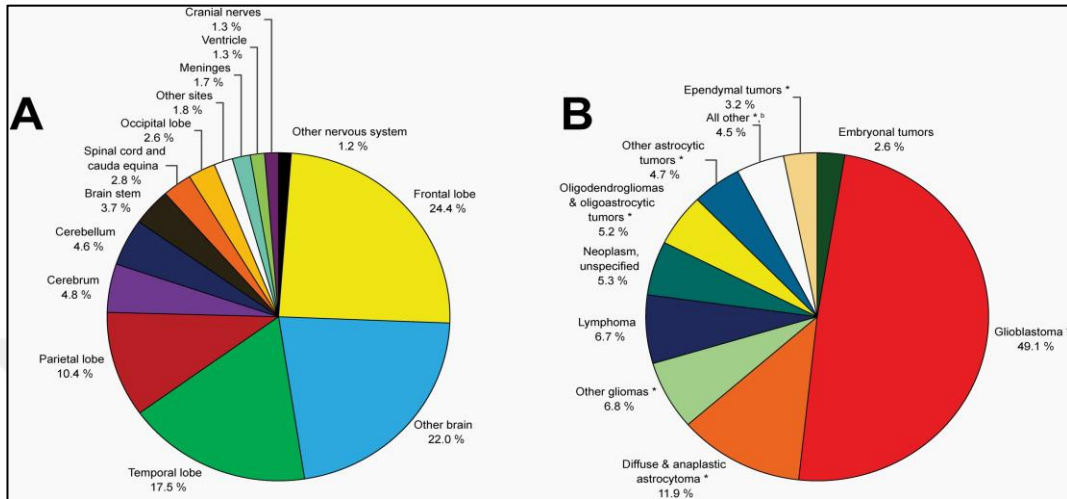
Görüldüğü üzere kanserin aktivasyonu, tümörün immünolojik özellikleri, tümör oluşumu için altta yatan genetik yatkınlıkların sürekli ilerleyen bilim ışığında yeni bilgilerle ilerlemesi göz önüne alındığında bilim ilerledikçe daha nice umut vaad eden yeni tanı ve klinik tedavi yaklaşımlarını içeren kılavuzlar yayınlanacağı aşikardır.

2.2.3.1. Glioblastoma Multiforme

Gliomlar, tüm merkezi sinir sistemi tümörlerinin %80'ini oluşturur, bunların da %70 i astrositom, içlerinde en yaygın ise glioblastoma multiformedir (5). Glioblastoma multiforme (GBM), ilk olarak 1863 yılında Virchow tarafından tanımlanmıştır ve glial orjinli olan bu tümör için 1914 yılında Mallory tarafından spongioblastoma multiform terimi kullanılmıştır. Daha sonra 1929'da Bailey ve Cushing bu terimi glioblastoma multiforme olarak değiştirmiştir. Günümüzde glioblastom, glioblastome multiforme ile eş anlamlı olarak kullanılabilir (60). Glioblastome multiforme'nin çeşitli genotiplerin varlığı nedeniyle heterojen bir histopatolojiye sahip olması multiforme ekiyle anılmasına sebep olmuştur (61).

CBTRUS (The Central Brain Tumor Registry of the United States) Ekim 2021 raporlarına göre glioblastoma en sık bildirilen merkezi sinir sistemi histopatolojik paterni ve en yaygın malign tümördür. Tüm primer merkezi sinir sistemi tümörlerinin %14,3'ünü, primer beyin tümörlerinin %49,1'ini oluşturduğu rapor edilmiştir . Ayrıca yaşlı erişkinlerde ve erkeklerde 1,6 kat daha yaygın olduğu, hatta yaşla birlikte insidansının artarak en yüksek oranlarda 75 ila 84 yaş aralığında görüldüğü ifade edilmiştir (62). Gliomalar genellikle supra tentoryal yerleşimli olup temporal, parietal, oksipital birkaç lobu kapsayabilen oldukça malign tümörlerdir. Gliomaların da %58,4'lük kısmını glioblastomlar oluşturur (62).

Ancak yine aynı raporda yer alan medyan sağ kalım oranlarının karşılaştırmasında en yüksek sağ kalım oranı ile oligodendroglioma (yaklaşık 16 yıl), en düşük sağ kalım oranı ile glioblastom (8 ay) göze çarpmaktadır.



Şekil 2.6. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018.(October 2021) (62)

WHO tarafından eski kılavuzlarda da evre 4 yani en kötü prognozlu olarak kabul edilen tümör histolojik olarak pleomorfizm, belirgin nükleer atipi ve mitotik indeks artışının yanında mikrovasküler proliferasyon ve nekroz da içermektedir. Patolojik olarak belirgin mikrovasküler proliferasyon ve/veya nekroz varlığı esas tanısal işaretlerdir (6, 7). Yenilenen tanı kılavuzları kapsamında bazı genetik profiller desteklenerek tanı portföyü genişletilmiştir (8). Tedavisi, mevcut cerrahi teknikteki ilerlemeler, radyoterapi ve kemoterapideki bilimsel gelişmelere rağmen kompleks ve zordur(2). Bu tümör konusunda uzun yıllar içinde oluşan büyük bilgi birikimine rağmen küratif tedavi mevcut tedavi seçeneklerine gelişen ilaç direnci, tümörün genetik heterojenitesi gibi sebeplerden halen mümkün değildir. Fakat teknik ve teknolojik gelişmeler ve moleküler biyolojisini anlayarak hedefe yönelik yeni tedavi seçenekleri sayesinde tedavi her zamankinden daha iyi şekilde yapılabilmekte, hasta sağkalımı ve hayat kalitesi yüksek tutulabilmektedir (9, 10).

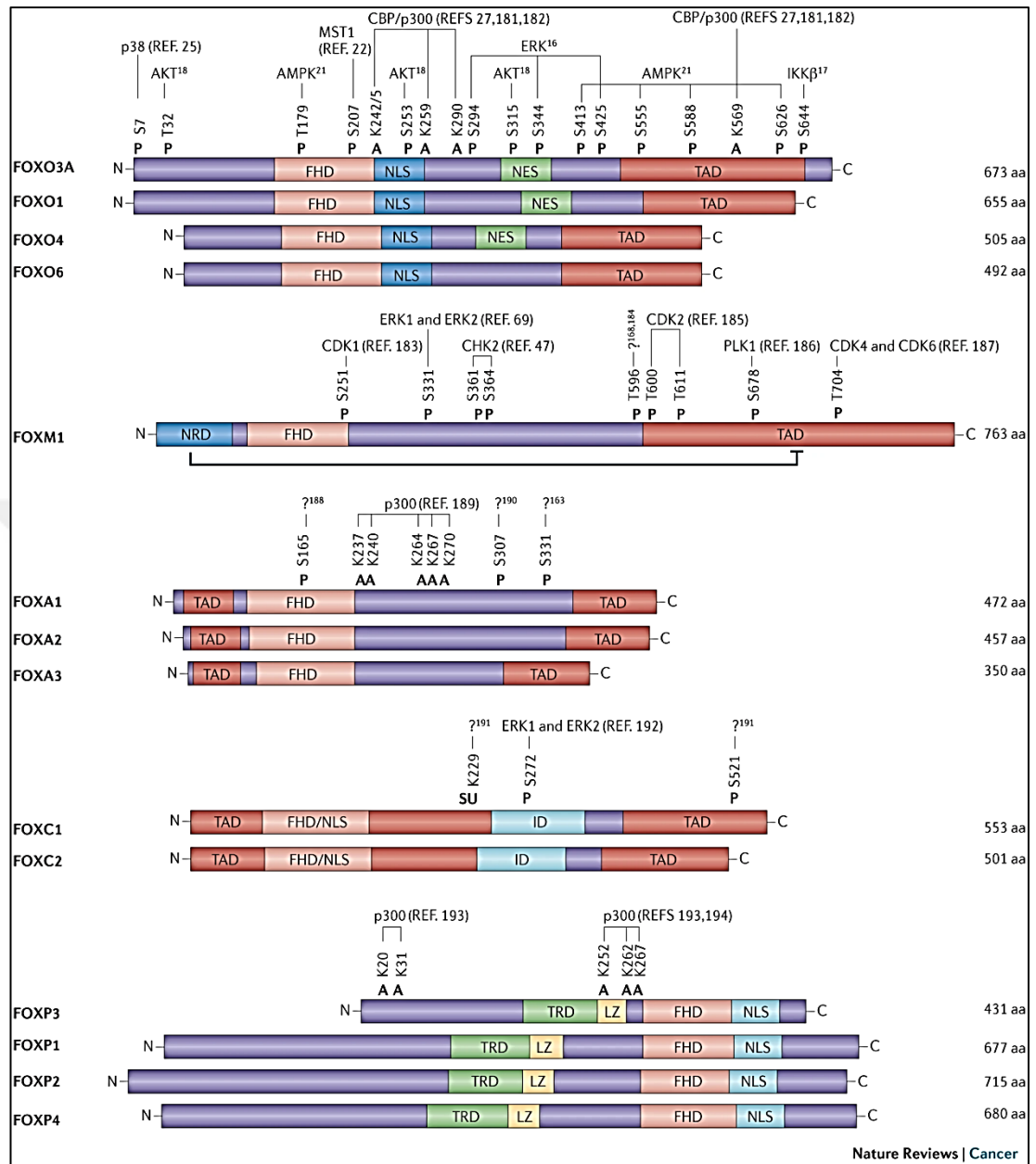
Glioblastoma tedavilerinde apoptoz mekanizmaları aydınlatılarak başarı sağlanacağı düşünülmektedir. Bu nedenle moleküler mekanizmalara ve hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin araştırıldığı birçok çalışma yapılmaktadır.

2.3. Forkheadbox Protein Ailesi

Forkheadbox (FOX-çatal başlı kutu) sınıfı protein ailesi yapısı itibariyle çatal başlı olarak tanımlanan bir transkripsiyon faktörü ailesi üyesidir. Adını ilk kez tanımlandığı ve kodladığı gen işlevi olarak gözlenen ‘Drosophila melanogaster’ adı verilen meyve sineğinde ortaya çıkardığı ‘çatal baş’ embriyonik kafadan almaktadır (63, 64). ‘Drosophila melanogaster’ ile insan hastalık genleri karşılaştırıldığında, bilinen insan hastalık genlerinin yaklaşık olarak %77’lik kısmı ortolog yani evrimsel süreçte korunmuş fonksiyonludur (46).

FOX transkripsiyon faktörleri 3 alfa sarmal ve 2 büyük halka ya da kanatlar yapısı içeren DNA bağlanma bölgelerine sahip olmaları nedeniyle ‘winged helix’ transkripsiyon faktörleri olarak da adlandırılırlar. Evrimsel süreçte yüksek derecede korunmuş olan bu ailenin üyeleri 100 aminoasitlik bir DNA bağlanma bölgesi ile transkripsiyonu düzenlerler. Forkhead box (FOX) proteinleri, hem gelişim hem de erişkin hücre homeostasisinde düzenleyicidirler(65).

FOX ailesinin FOXA’dan FOXS’ye 19 alt gruptan oluşan 50 üyesi vardır (63). Bunlardan FOXA, FOXC, FOXM, FOXO, FOXP proteinleri özellikle onkogenik araştırmaların hedefi moleküllerdir. Hatta bazı FOX proteinlerinin kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlara direnç mekanizmalarında da rol aldıkları, transkripsiyonel olarak hem aktivatör hem baskılayıcı işlevleri ile epigenetik faktörleri düzenledikleri bilinmektedir (63).



Şekil 2.7: Forkhead Box Protein Ailesi (63).

FOX proteinleri değişen çevresel koşullara göre hücre kaderini belirleyecek cevaplar verirler. Esas fonksiyonları gen ekspresyonu için transkripsiyon aktivatörlüğü yapmaktır ancak aynı zamanda transkripsiyon için değişen koşullarda baskılayıcı ya da sadece öncü molekül görevi görebilirler (66).

Dünya genelinde en yaygın hastalıklardan biri haline gelen kanserlerde de transkripsiyon faktörlerinin birçok kanserde uygun gen ekspresyonunu sağlayamayacak şekilde hasara uğradıklarının keşfedilmesinden sonra transkripsiyon faktörlerini düzenleyecek ajanlar yeni terapötik hedefler haline gelmiştir (67).

2.3.1. FOXO Ailesi

Bu ailenin alt gruplarından O sınıf alt grubu çatal başlı kutu proteinleri yani FOXO proteinleri özellikle hücre için DNA hasarı onarımı, reaktif oksijen radikallerinin ortadan kaldırılması, hücre döngüsü durdurucu, apoptoz gibi önemli işlevleri nedeniyle tümör baskılayıcılar olarak özelliklerini ve önemlerini evrimsel süreç ilerlese de korumuşlardır (63).

O alt sınıfı FOX alt aile üyeleri özellikle kanser metabolizması yönünden en iyi çalışılmış olanıdır. Bu grubun üyeleri yaygın olarak vücutta bulunurlar. Ancak tüm memeli dokularında çeşitli oranlarda eksprese olan FOXO'lardan FOXO1 adipoz dokuda, FOXO3a beyinde, FOXO4 kalpte yüksek oranda eksprese edilir (65). Forkhead box O protein ailesi omurgasızlarda DAF-16, Drosophila melanogaster meyve sineği türünde dFOXO olmak üzere tek üyeli, memelilerde FOXO1, FOXO3, FOXO4 ve FOXO6 olmak üzere 4 üyelidir. Hücrel sinyal yollarındaki yüksek benzerlik nedeniyle Drosophila insan hastalıkları ile ilgili gen çalışmalarında en yaygın kullanılan türlerden biridir (68). Örneğin; hem büyüme hem de metabolizma düzenlenmesinde önemli bir sinyal yolağı olan insülin-insülin benzeri büyüme faktörü 1(IGF-1) ortolog alanlardan biridir. Bu yolağın akış şeması memelilerde 4 üye FOXO ile temsil edilirken Drosophila'da dFOXO olarak adlandırılan tek üye ile temsil edilir. Drosophila'daki araştırmalar FOXO transkripsiyon faktörlerinin insülin-IGF 1 sinyal yolağını nasıl düzenlediği moleküler mekanizmaları ile aydınlatmada kritik bir yere sahiptir (68). Omurgasızlardaki karşılık olan DAF-16'nın insülin/PI3K/Akt sinyal yolağı ilişkisi de daha sonra memelilerde yapılan çalışma sonucu keşfedilmiştir (66).

“O” alt grubunun FOXO1, FOXO3, FOXO4 ve FOXO6 olmak üzere 4 üyesi vardır. FOXO ailesinin 3 üyesi FOXO1, FOXO3, FOXO4 ilk olarak bazı insan tümörlerindeki kromozomal translokasyonlarda saptanmışlardır. Bu da FOXO aile

üyelerinin bazı tümörlerin moleküler patogeneğinde kritik rolü olduğunu göstermektedir (66). FOXO1, FOXO3 ve FOXO4 rabdomiyosarkom ve AML insan kanserlerinde saptanmış proteinlerdir. FOXO5, FOXO3'ün balıklardaki ortoloğudur (66). FOXO2 ile FOXO3 daha çok da FOXO3b ile yani işlev olarak pasif gen olarak ifade edilen psödogen olan alt türü ile yapısal benzerlik gösterir (66).

FOXO transkripsiyon faktörleri, hücrel homeostazisin düzenlenmesi ve antitümöral etkinlikleri olan bir protein ailesidir. Yapılan yeni çalışmalar kanserli hücre ölümünü tetikleme, hücre döngüsünü duraklatma gibi kritik işlevlerinin yanı sıra kanser hücrelerinin metabolizmalarını da düzenlediğini ortaya koymuştur (63). Homeostazisin sağlanması hem hücre içi hem de hücre dışı ortamdaki değişikliklerin algılanarak bunlara uygun metabolik yanıtın düzenlenmesi ile mümkündür. Gelişmiş canlılarda değişen fizyolojik koşullarda homeostazisin korunması ve başarılı adaptasyon süreci için transkripsiyon faktörlerinin canlıdaki gen ekspresyonunu kontrol etmesi ile hücrelerin bir nevi kaderleri belirlenir (63, 69).

Birçok çalışma FOXO ekspresyonu ile kanser metastazı arasında bağlantı keşfetmiştir (65). Metastaz açısından kritik rol oynayan mekanizmalardan biri olan EMT (Epitelial Mesenchymal Transition) sürecidir. Bu süreci tetiklediği ile ilgili bulgular elde edilen siRNA ile FOXO1 geni susturulan hepatosellüler karsinomda metastatik EMT geçişinin gözlenmesi ile desteklenmiştir (70). Ayrıca metastatik süreçlerde önem kazanan yeni damar oluşumu olarak tanımlanan anjiogenezde FOXO1 ve 3'ün susturulmasının anjiogenez artırıcı yönlerinden de bahsedilmiştir (65).

FOXO ailesinin birçok metabolik yolakta önemli rolleri vardır. FOXO uyarımının en bilinenlerinden biri insülin/IGF-1 uyarımına cevaben Akt fosforilasyonudur (68).

Süreç daha sonra proapoptotik Bcl-2 ailesi üyesi Bim ve apoptoz lehine gidebilir ya da G1 ve G2 hücre döngüsü fazlarını p27Kip1 gibi GADD45 (GrowthArrestandDNADamage 45) gibi proteinlerin ekspresyonu ile durdurma lehine ilerleyebilir (66).

Birçok yönü hala keşfedilmeye devam etse de FOXO ailesinin uzun yaşam ile ilişkilendirilmiş ve özellikle omurgasızlarda ve Drosophila'da bu yönü kanıtlanmıştır (66).

2.3.1.1. FOXO3a

FOXO3a 71k Da ağırlığında bir transkripsiyon faktörüdür. 5 alan içerir.

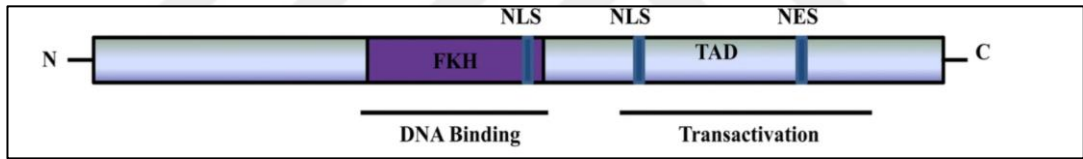
Bunlar:

1.FKH: ForkHeadDomain (Çatal başlı kanatlı sarmal dönüş ve sarmal DNA bağlanma alanı)

2&3.NLS: NuclearLocationSequence (NükleerLokalizasyonDizisi)

4. NES: Nuclear Export Sequence (NükleerEksportDizisi)

5.TAD: C-Terminal Transaktivasyon Alanı



Şekil 2.8: FOXO3a yapısı (71).

Bölgelerin işlevleri kısaca şöyle ifade edilebilir:

- ✓ FKH, FOXO3a ve DNA arasındaki etkileşiminden sorumlu.
- ✓ TAD, hedef genin transaktivasyonu için önemli.
- ✓ NLS, FOXO3a'nın sitoplazmadan çekirdeğe translokasyonu için önemli.
- ✓ NES, FOXO3a'nın çekirdekten sitoplazmaya translokasyon için önemli.

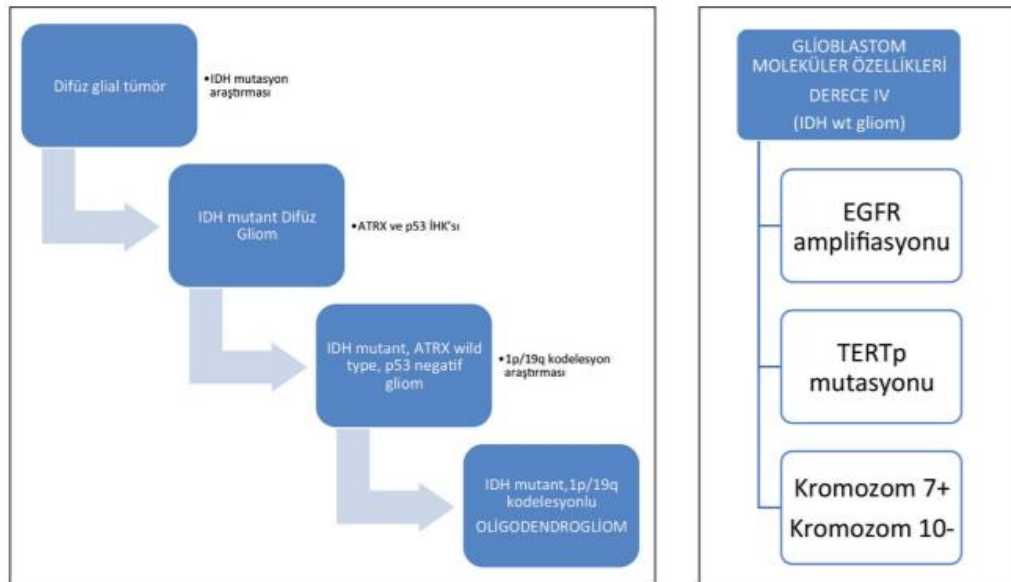
FOXO3a inaktivasyonu ya da susturulması tümörogeneze karşı korunmada belirgin azalma davranışı ile sonuçlanır(71).

2.4. Glioblastomada Bazı Genetik Hedefler

Glioblastoma multiforme heterojenitesi yüksek bu nedenle genetik olarak birden fazla hedef içeren bir tümördür. Tümörün genetik yapısının anlaşılması hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır (61).

ABD’de yaşa göre standardize edilmiş genel glioblastoma insidansı 3,22/100.00 kişidir (72). Daha çok erkek ve ileri yaş popülasyonunda saptanır. Glioblastoma gelişimi için baş ve boyuna iyonize radyasyon maruziyetinin risk artırıcı, atopik hastalığın ise koruyucu bir faktör olduğu birçok bağımsız çalışmada tartışılmıştır (72).

Glioblastom tanısında yeni bakış açısı profillerinde hastaların benzer histolojik yapıya rağmen prognozlarındaki ve tümör davranışındaki farklılıklar akla genetik heterojeniteyi bir kez daha getirmiştir. Bu kapsamda IDH mutasyonunun yokluğu, TERT mutasyonu, kromozom 7 kazanımı/kromozom 10 kaybı, EGFR amplifikasyonu histolojik inceleme WHO derece 2 ya da 3 kriterlerini karşılarsa da derece 4 e yükseltebilir ve klinisyene genotipe yönelik tedavi geliştirme fırsatı sunabilir (8).



Şekil 2.9. Glioblastom moleküler patolojik yaklaşım şeması (73).

2.4.1. İzositrat Dehidrogenaz Mutasyonu

İzositrat dehidrogenaz (IDH) 1 ve 2 enzimindeki mutasyonlar insanda merkezi sinir sistemi kanserlerinde gözlenen önemli bir mutasyondur (74). IDH enziminin mutasyona uğraması ile izositratın alfa keto glutarata dönüştürülme sürecinde katalizleyici görevini yerine getirememesine neden olur. Enzim yapısındaki aminoasit adlandırma konumu itibariyle (Arginine132Histidin) (R132H) lokasyonundaki mutasyon sonucu kanserojenik metabolit olan 2-hidroksiglutaratın (2-HG) artışı ile sonuçlanır (74). 2-HG, IDH mutant gliomlarda artmış seviyelerinin desteklediği üzere protoonkogen ekspresyonunu artırarak insan astrositlerinde proliferasyonu artırır (75). WHO sınıflamasına göre sekonder gelişen gliomlar IDH mutant, de novo gelişenlerse IDH -wild type olarak isimlendirilir. IDH-wt daha sık ve daha çok erişkinlerde görülen sıklıkla yaşlı popülasyonu etkileyen daha kötü prognozlu tip olarak bilinir (59).

2020 Ocak ayında yapılmış c-IMPACT-NOW güncellemesinde de bahsedildiği üzere IDH mutasyonu glioblastomlar için oldukça önemli bir yer tutar. Moleküler hedeflerin tanı kılavuzlarına eklendiği yakın geçmiş için glioblastom patofizyolojisinde önemli yollardan biri olan PI3K/Akt/FOXO3a yolağından FOXO ve IDH mutasyonunun hücre akıbetindeki rolleri araştırılmıştır (76).

2.4.2. TERT Promotor Mutasyonu

Kanser hücreleri gibi kontrolsüz aktif olarak büyüyen hücreler telomerlerini ve telomerlerini uzatacak olan telomeraz aktivitelerini korumak zorundadırlar (77). Tümörlerde telomerin korunmasından sorumlu bazı genetik mekanizmalardan biri de ATRX mutasyonu ve TERT promotor mutasyonudur. ATRX proteininin işlev kaybı bazı tümörlerde hücreleri alternatif telomer uzatma (ALT) yollarına iterken TERT promotor mutasyonunda telomeraz aktivitesinin reverse transkripsiyon mekanizması ile ekspresyonu artar (78). Melanom, liposarkom, hepatosellüler karsinom, medullablastom ve yüksek dereceli gliomlarda TERT mutasyonu tespit edilmiştir. ATRX ve TERT promotor mutasyonları hem erişkin hem pediatrik popülasyonda gözlenen yüksek dereceli astrositomlarla yaygındır (77, 78).

2.4.3. EGFR Amplifikasyonu

IDH-wt için histolojik olarak mitoz, nekroz, vasküler ya da endotelial proliferasyon gibi özelliklere bakılmaksızın EGFR mutasyonunun varlığı tanıyı Glioblastom moleküler özellikleri gösteren diffüz glial tümör, WHO derece 4 olarak güncellenen EGFR amplifikasyonu (53), primer glioblastomlar için EGFR ilişkili hücrel yolaklardaki değişiklikler ile tümör büyümesini ve migrasyonunu angiogenezi artıran oldukça yaygın genetik değişikliklerden biridir(79).

2.4.4. Kromozom 7+/10-

IDH mutasyonunun yokluğunda, TERT mutasyonu, kromozom 7 kazanımı/kromozom 10 kaybı profillerini birliktelik ve hasta yaşam beklentisi açısından değerlendirilen bir çalışmada kromozom 7 kazanımı/kromozom 10 kaybı olan profilin daha kötü prognozlu ve daha mortal seyrettiği ancak vakaların bir çoğunda TERTp mutasyonu saptanmış olsa da tek başına kromozom 7 kazanımı/kromozom 10 kaybının anlamlı sonuçlar vermediği, iki profilin beraber değerlendirilmesinin daha doğru sonuçlar vereceği ifade edilmiştir (80).

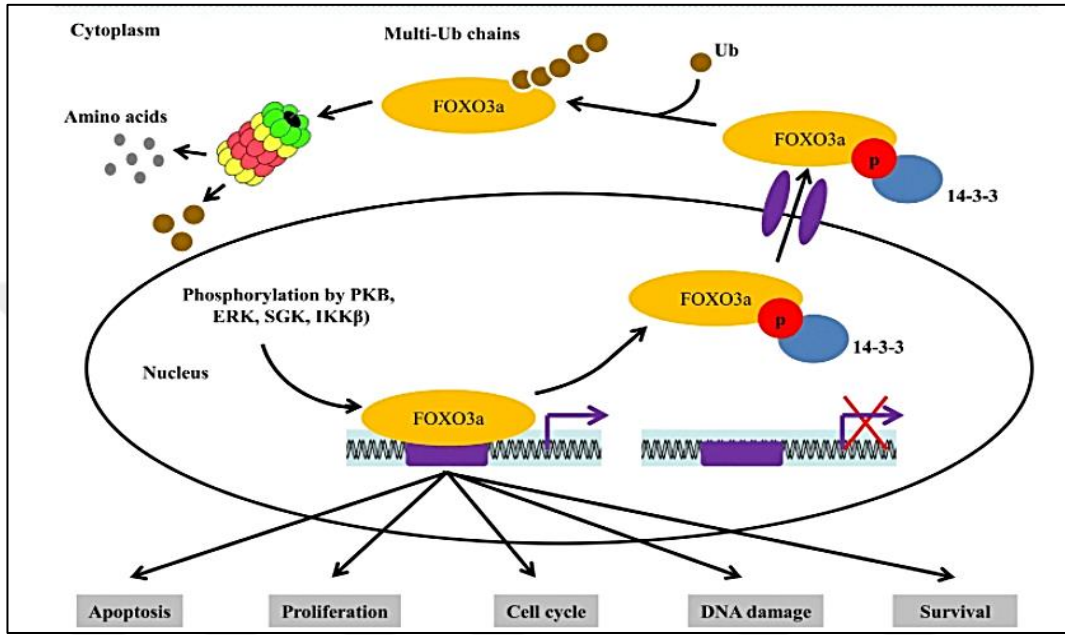
2.5. Akt/Foxo3a /Bim Yolağı

Birçok sinyal yolağı gibi PI3K/Akt FOXO'ların hücre içi lokalizasyonlarını düzenleyerek tümörojenez mekanizmalarına etkir. Aktive edilmiş bu yolak ile kanser geliştiği, düzenleyici mekanizma olarak da FOXO'lar keşfedilmiştir(81).

Hücreler için büyüme faktörü olarak düzenlenen PI3K-Akt sinyal yolağı kanser hücrelerinde bozulan önemli yolaklardan biridir (82).

Hücreler için DNA hasarı, besin ve enerji yetersizliği, iskemi, reaktif oksijen radikallerinin oluşumu, yaşlanma vb. stres faktörlerine cevaben oluşturulan hayatta kalma faktörleri mevcuttur. Bunlar stres durumunda serin/treonin kinaz Akt'yi fosforilleyip aktive ederek süreci hücre için apoptoz lehine ilerletir. Bunu fosforilasyon ile transkripsiyon faktörlerinin lokasyonlarını değiştirip aktivasyonunu etkileyerek yaparlar (83).

Bim apoptotik geninin transkripsiyonu stres koşullarının olmadığı ortamda büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından baskılanır. Hücrede büyüme faktörleri ortamdaki çekildiğinde ya da hücrel stres durumunda Bim, FOXO3a tarafından uyarılır (84).



Şekil 2.10: Akt(PKB)/FOXO3/Bim yolu (71).

FOXO transkripsiyon faktörleri posttranslasyonel modifikasyona uğrarken fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon, ubikütinasyon gibi kovalent modifikasyonlara uğrarlar. Bu modifikasyonlar sayesinde FOXO aktivitesi aktive ya da inhibe olabilir. Bunlardan FOXO transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonu serin/treonin kinaz gibi protein kinazlar tarafından düzenlenir. (85).

Brunet ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada FOXO3a'nın direkt Akt fosforilasyonunun hedefi olduğu gösterilmiştir. FOXO3a hücrenin stres faktörlerine cevap olarak çekirdek lokalizasyonunda kalarak hücreyi koruyacak apoptoz sürecini başlatacak süreçleri tetikler. Büyüme faktörleri Akt'ye bağlı fosforilasyonu ve FOXO3a fonksiyonunu inaktivasyonunu tetikleyerek apoptotik gen transkripsiyonunu baskılayarak hücre sağ kalımını destekler (83).

FOXO ailesinin birçok metabolik yolda önemli rolleri vardır. FOXO uyarımının en bilinenlerinden biri insülin/IGF-1 uyarımına cevaben Akt fosforilasyonudur (68).

Akt fosforilasyonu ile çekirdekten sitoplazmaya geçen FOXO3a'ya bağlı transkripsiyon bloke olup Bim apoptotik cevabını engelleyerek serebellar nöronların hayatta kalması desteklenir (86).

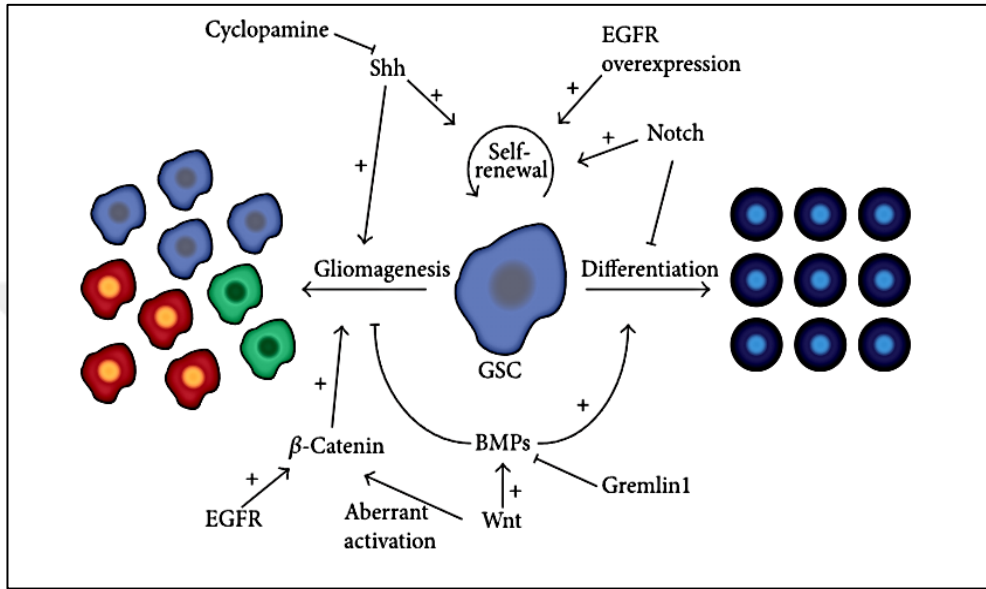
Hücrede Akt fosforillendiğinde, sitoplazmada FOXO3a transkripsiyon faktörünün gen ekspresyonu artar. Sitoplazmik lokasyonun doğurduğu sonuç apoptozun inhibisyonu ve hasarlı, stres altındaki hücre için tümörögenез ve metastaz gibi kötü sonuçlara sebep olur. Ancak Akt defosforile halde kalırsa FOXO3a da nükleer lokalizasyonda kalarak apoptotik gen olan Bim indüksiyonu ile apoptozu tetikleyebilecek gereken hücre sel yanıt oluşturulabilmiş olacaktır. Sitoplazmada artan FOXO3a ekspresyonu tümörögenезde apoptoz inhibisyonuna yol açtığından kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (11, 83).

FOXO'lar PI3K/Akt sinyal yolağının inhibisyonu üzerinde tümör supresör etki ortaya çıkarırlar. Fosforilasyon gerçekleştiğinde FOXO'lar çekirdek dışına yani sitoplazmaya çıkar ve inaktifleşir bu da transkripsiyon faktörlerin inhibisyonuna yol açar. Bu nedenle FOXO'ların nükleer lokalizasyonu, proliferasyon düzenleme görevleri açısından gereklidir (83).

2.4.1. Glioblastoma'da Akt/FOXO3a/Bim Yolağı İlişkisi

Glioblastomanın tedavi direnci ve metastaz özelliklerinden sorumlu tutulan glioma kök hücreleri (GSC) kendilerini yenileme yetenekleri ve kemoterapötik direncinden sorumlu tutulan BMP4 sekresyonları ile tanınırlar. Ciechomska ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları kemoterapötiklere (özellikle TMZ) direnç gösteren tümör tiplerinde saptanmış olan EGFR gen ekspresyonu yapan glioblastoma hücre hatları ile yapılan çalışmada, EGFR geninin farklı ekspresyon seviyelerinde GSC'lerin tedavilere farklı tepkiler verdikleri gösterilmiştir. Ancak EGFR gen ekspresyonu düşük hücreler BMP4 ekspresyonu ile GSC dönüşümü göstererek kemoterapötik direnci kazansa da hücrelerin proliferasyon aşamasında G1'de

durdukları gösterilmiştir. EGFR gen ekspresyonu yüksek hücrelerde ise BMP4 kaynaklı GSC dönüşümü göstererek kemoterapötik direnç kazansalar dahi apoptotik kontrolün Akt/FOXO3a/Bim yolağı üzerinden kontrol edildiği keşfedilmiştir (73, 87).



Şekil 2.11: BMP4 gliomatogenezin önemli inhibitör düzenleyici mekanizmalarındandır (73).

MikroRNA (miRNA) mRNA yıkımını aktive ederek ya da translasyon baskılayıcı olarak posttranskripsiyonel düzeyde gen ekspresyonlarının negatif yönde düzenleniminde kullanılan kısa tek sarmallı spesifik protein kodlamayan RNA molekülleridir (88).

İnsan astrositom ve glioblastomlarında tümör baskılayıcı olarak bilinen microRNA-370 (mi-R370) ekspresyon seviyesi oldukça azdır. Hatta derece 3 ve 4 tümörlerde 1 ve 2'ye göre daha da az olduğu keşfedilmiştir. 2018 yılında yapılan bir çalışma ile miR-370 transfeksiyonu yapılan U 87 ve U 251 insan glioblastoma hücre hatlarında proliferasyon engellenebilmiştir (89). Sürecin moleküler yönden aydınlatılması için beta katenin ve nükleer FOXO3a seviyeleri açısından değerlendirildiğinde, miR-370 transfeksiyonunun beta katenin seviyesi ile negatif korelasyon gösterdiği ancak nükleer FOXO3a aktivasyonu üzerinden glioblastom

hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Yani miR-370 seviyesinin azlığı beta katenin fazlalığı ile benzer şekilde gliomatogenezisi uyarır. Ancak FOXO3a'nın nükleer lokalizasyonda kalışı glioblastom hücre hatlarında proliferasyonunu inhibe ettiği ifade edilmiştir (73, 89).

Sfingokinaz1 (SPHK 1) insan SPHK1 geni tarafından kodlanan gliomalarda yüksek ekspresyon seviyesine sahip ve hücre proliferasyonunu tetikleyici apoptoz direnci gibi işlevleri nedeniyle onkojenik bir enzimdir (90, 91). Glioma hücrelerinde artan SPHK1 ekspresyonunun Akt'nin fosforile olarak FOXO3a'nın fosforile inaktivasyonuna ve sonuç olarak Bim'in aşağı regülasyonuna neden olduğu ortaya konmuştur. Aynı çalışmada yapılan Western Blot analizinde SPHK1 ekspresyonunun az olduğu hücrelerde nükleer FOXO3a ekspresyonunun arttığı ancak toplam FOXO3a ekspresyon seviyesinin değişmediği saptanmıştır. Destekler şekilde RT-PCR analizinde FOXO3a'nın transkripsiyonel düzeyi de değişmemiştir (92). FOXO3a'nın Akt fosforilasyonu ile nükleer lokalizasyondan ihraç edilen FOXO3a ile Akt/FOXO3a/Bim yolağında SPHK 1'in onkolojik etki adı altında antiapoptotik sürece hizmet eden bir enzim olduğu bu yolak üzerinden de ortaya konmuştur (91, 92).

Caffeine (1, 3, 7 trimethylxanthine) ile U251 insan glioblastoma hücre hatlarında yapılan bir çalışmada deney grubunda FOXO1'in nükleer translokasyonunu indüklediği ve hem FOXO1'in hem de Bim ekspresyonunu Western Blot analizi ile de gösterildiği üzere artırdığı saptanmıştır (93).

Lipid düşürücü ilaçlar olarak günümüzde yaygın olarak kullanılan fenofibratlar ile glioblastoma hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışmada hipotez fenofibratların metabolik süreci glikolizden yağ asidi oksidasyonuna kaydırması ve glikolize bağımlı glioblastoma hücrelerinin zayıf metabolik noktalarından yaklaşmak üzerine kurulmuştur. 25 uM fenofibrat uygulanan glioblastoma hücrelerinde proliferasyon inhibisyonu gözlenirken 50 uM fenofibrat uygulanan grupta ciddi bir apoptoz gözlenmiştir. Apoptotik etkinin de FOXO3a'nın nükleer birikimi ve tetiklenen Bim aktivasyonu üzerinden gerçekleştiği saptanmıştır. FOXO3a'nın siRNA ile inhibisyonunda glioblastom hücre hatlarında fenofibrat kaynaklı apoptoz

etkisinin zayıfladığı gözlenmiştir. Bu da glioblastoma tedavisinde kullanılan fenofibratın etki yolağının FOXO3a üzerinden gerçekleştiğini desteklemiştir. (94).

Epimedeum koreanumdan üretilen aktif flavonoid bir bileşik olan Icariside II bitki özütü ile yapılan bir çalışmada Icariside II'nin glioblastom hücre hatlarında Akt'nin fosforilasyon ile aktivasyonunu baskılayarak FOXO3a'nın sitoplazmadan nükleer translokasyona geçişini desteklediği ifade edilmiştir. Ayrıca CFA (Coloni Formation Assay) deneylerinde gözlenen hücre proliferasyonu azalışı hem Western Blot analizinde G1/S geçişi için önemli cyclin D azalışı ile hem de apoptotik yolağa gidiş göstergelerinden sitokrom c, parçalanmış caspase 3 seviyelerinin artışı ile desteklenmiş, sürecin apoptoz lehine ilerlediği gösterilmiştir (95).

2.6. Kanser Tedavisinde Fitoterapötik Ajan Kullanımı

Yunanca (phytos, bitki+therapy, tedavi) kökenli 'fitoterapi' kelimesi bitkilerin tedavi amaçlı kullanılması ile ilgilenen bir bilim dalıdır.

İnsanoğlunun bitkilerden ilaç olarak yararlandıkları Yontma Taş Devri'nde Anadolu mezarlarında bulunmuş bitki kalıntılarının da desteklediği üzere insanlığın var oluşuna kadar dayanmaktadır (96). İklimsel özellikleri açısından birçok bitkinin yetiştiği Hindistan'da 'Ayurveda Tıbbı' olarak günümüze kadar gelmiş fitoterapötik uygulamalar vardır (96).

Bitkiler ile tedavi alanında önemli uygulamaları bilinen bir diğer önemli isim tıbbın babası sayılan Hippokrat'tır, Atina'daki bahçesinde bitki yetiştirerek çeşitli tıbbi tedaviler uyguladığı bilinmektedir (96). Kendi çağını ve daha sonraki yüzyılları da etkilemiş bir diğer önemli isim Adana civarında yaşamış Dioscorides'tir (97). Farabi, Biruni, İbn-i Baytar, İbn-i Sina gibi büyük İslam alimleri de bitkilerle tıbbi tedaviye önemli katkılar sunmuşlardır (96, 97). Teknoloji ve kimyanın bu kadar gelişmediği o dönemlerde bitkilerin yaprak, meyve, tohum, kök gibi kısımları direkt kullanılmış ya da çeşitli formüller şeklinde hazırlanarak damla, losyon, krem, pomatlar ile tedavi yapılmaya çalışılmıştır (96, 98).

Yüzyıllardır bitkiler ile tedavi yöntemleri uygulansa da fitoterapi terimi ilk kez Fransız hekim Henri Leclerc (1870-1955) tarafından kullanılmıştır. Aynı şekilde bitkilerin çeşitli kısımlarının direkt ya da bitki çayları da dahil olmak üzere çeşitli formlarda tedavi için kullanılacak müstahzar haline getirilmiş hallerini tanımlar (98).

WHO'ya göre bitkisel kaynaklı ilaç kullanımı özellikle gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere örneğin Afrika'da %80, Çin'de %30-50, Avrupa ve Kuzey Amerika'da %50 gibi yüksek oranlarda tercih edilmektedir (12).

Batı toplumlarında da başlayan 'doğaya dönüş' akımının etkisiyle bitkisel ürünlerin kullanımı oldukça popüler hale gelerek yaygınlaşmıştır. Hatta gelişmiş birçok ülkede insanların alternatif ya da tamamlayıcı tedavi metodlarından en sık bitkisel ürünleri tercih ettikleri gösterilmiştir (12).

Newman ve Cragg tarafından ilaçların kaynağı olarak kullanılan doğal bitkisel tedavi edici (fitoterapötik) ajanlar Ocak 1981'den Eylül 2019'a kadarki son güncellemenin yapıldığı Mart 2020 yayımı ile birlikte farklı aralıklarla 1997, 2003, 2007, 2012, 2016'da güncellemeleri ile 6. kez yayınlanmıştır (99).

Modern tıp ile bitkisel tıbbın bütünleşebilmesi için kullanılan bitkisel ürünlerin etkin bileşenlerinin belirlenerek standardize edilmesi ve kalite ve güvenilirliğinden emin olunması oldukça önemlidir (100).

Tıbbi kullanımı olan birçok bitkisel ajanın etkinliğinin, akut ve kronik toksisitesinin, doz aralıklarının net bir şekilde ifade edilebilmesi için daha çok bilimsel veri ve çalışmaya ihtiyaç vardır (100).

Bitkisel ajanların doğal oldukları için güvenilir oldukları kanısı maalesef yanlıştır ve faydaları olduğu kadar toksik, karsinojenik, mutajenik etkileri olduğu gösterilmiştir (100).

MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada *Glycyrrhiza glabra*' (meyan kökü) dan elde edilen bitkisel özüt (GRA) ile apoptotik aktivitenin artırılıp artırılmadığı araştırılmıştır. GRA'nın, MCF-7 insan meme

kanseri hücrelerinde apoptoz artışı yaptığı ortaya koyularak antitümöral etkinliği rapor edilmiştir (27).

SNU-423 karaciğer kanser hücreleri üzerinde Haplophyllum ptilostylum bitki özütünün apoptoz artışı ile antikanser aktivitesi gösterilmiştir (101).

Bazı bitkisel ajanlar günümüzde onkologlar tarafından uygulanan kemoterapinin zararlı etkilerini azaltmak ya da kemoterapötığın etkinliğini artırmak üzere kullanılmaktadır (97). Bazıları ise rutin tedavi seçeneklerine yanıtız kalanlara alternatif tedavi şansı sunar. Bunlara örnek olarak kastrasyona dirençli prostat kanseri olgularında Pao pereira özütünün apoptoz indükleyici etkisi olduğu gösterilmiştir (102).

Tümör genetiği ve biyolojisinde yapılan onca çalışmaya rağmen genetik hedefe yönelik tedaviler maalesef henüz klinik kullanıma girmemiştir. Glioblastomaların rutin tedavi protokolü hala cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi ile sınırlıdır. Ancak moleküler düzeyde kemoterapötiklere direnç mekanizmaları, genetik değişikliğin tümör yapısına katkısı gibi alanlardaki araştırmaların çoğaltılması ve tümörün çoğalma yeteneğine katkı sağlayan mekanizmaların keşfi ile klinik kullanıma girmeleri için çalışmalar sürmektedir.

2.5.1. Glioblastoma Multiforme’de Fitoterapötik Ajan Kullanımı

Kanser tedavisinde kullanılan bazı bitkisel ajanların klinik kullanımları ile örneklerin de verildiği 2010 yılında yapılan Bitkilerle Tedavi Sempozyumu’nda Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı’ndan Doç. Dr. Canfeza SEZGİN’in makalesinde (97) paylaşılan vakaya tedaviye fitoterapötik ajanlar ekleniyor.

Bu vaka sunumunda 55 yaşında kadın hasta, 2 aydır süren baş ağrısı yakınması ile başvuruyor, yapılan tetkikler sonucu beyin dokusuna yayılmış bir kitle tanısı alıyor ardından cerrahi uygulanan hastanın patoloji sonucu glioblastom olarak raporlanıyor, hastaya rutin verilen kemoterapötik ajan olan temozolamid ve radyoterapi başlanıyor. Ek olarak özellikle glioblastomda ilaç direnci de çok sık

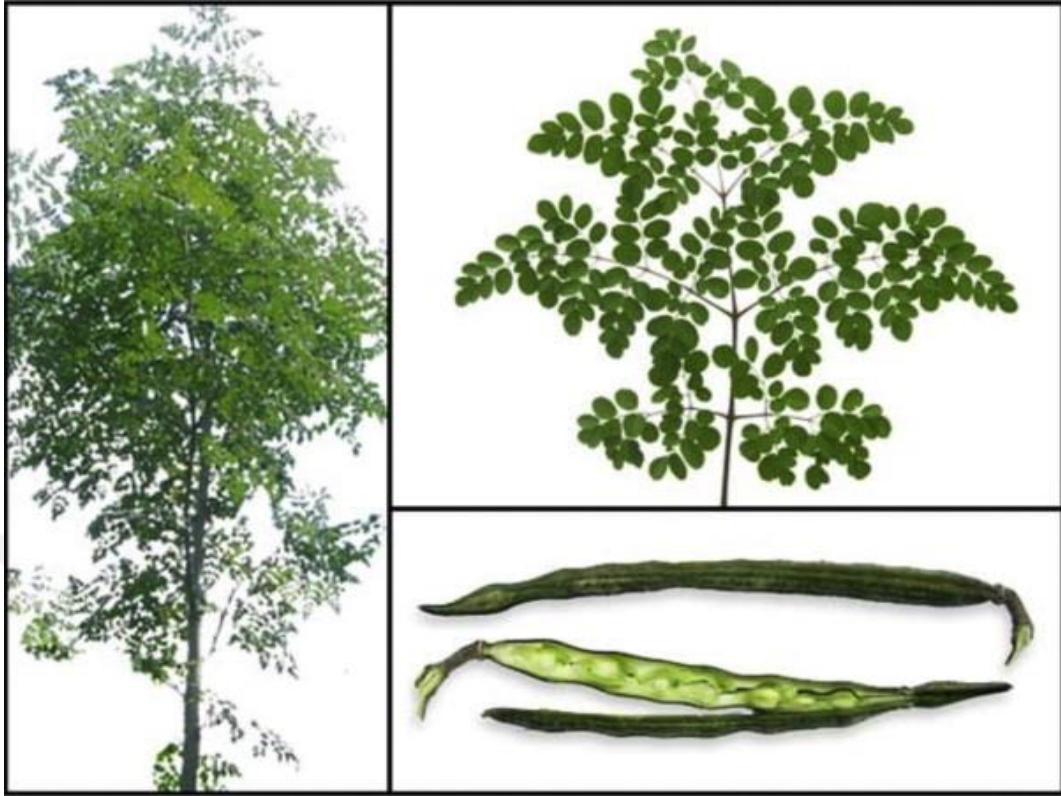
görüldüğünden farklı yaklaşımlar denenemeye çalışılıyor. Laboratuvar ve hayvan çalışmalarında tümör hücreleri üzerine öldürücü etkinliği gösterilmiş yeşil çay, üzüm çekirdeği ekstraktı, pelin otu gibi ajanlar da tedaviye ekleniyor. Beklenen yaşam süresi 3-5 ay olan hastanın 9. Ayında klinik olarak hafif baş ağrısı şikayeti dışında şikayetinin olmayışı; ayrıca 9. Ayda radyolojik olarak tümörün kontrol altına alındığının gösterilmesi bitkisel ajanların mevcut kemoterapötiklerin etkisini artırıcı, belki ilaç direncini kırıcı olumlu etkileri olacağı yönünde bilimsel araştırmaları artırmıştır (97).

2.6. Moringa Oleifera

Moringa oleifera taksonomik sınıflamada etki alanı ökaryotik olan, *Plantae* alemi, *Tracheobionta-Spermatophyta* şubesi, *Magnoliphyta-Magnoliphisida* sınıfı, *Capparales* takımı, *Moringaceae* familyası, *Moringa* cinsine ait bir türdür. *Moringaceae* familyasında yaklaşık 33 türü rapor edilmiştir. Bunlardan *M. arborea*, *M. drouhardi*, *M. longituba*, *M. oleifera*, *M. uspoliana* iyi bilinen türlerden bazılarıdır (13).

Moringa oleifera, Afrika; Asya; Güney Amerika ülkeleri başta olmak üzere dünya çapındaki ülkelere dağılmıştır. Ancak diğer türleri gibi Asya'ya özgü olan tropikal ve subtropikal iklimde yetişebilmesine karşın en çok da Hindistan'ın kuzey kesimlerinde yetişebilen oldukça değerli bir bitkidir. Hem hafif don koşullarına hem de sert kuraklığa dayanıklı oluşu özellikle de sıcak ülkelerde yaygın yetişebilmesi bu değerli bitkiyi dünyanın birçok yerinde yetişebilir ve ulaşılabilir kılmıştır (103).

'HayatAğacı' veya 'Mucize Ağacı', 'Drumstick (Baget) Ağacı', 'Yaban turpu Ağacı' veya 'Ben yağı Ağacı' olarak da adlandırılabilen oldukça büyük bir ağaçtır. Ağacın yaprakları, baklaları, çiçekleri gibi hemen hemen tüm bölümleri yenilebilir veya geleneksel bitkisel ilaç yapımında kullanılabilir özelliktedir. Ağacın neredeyse tüm bölümlerinin bu şekilde faydalı oluşu onu mucizevi ağaç olarak anılma şerefine erdirmiştir ki hala yeni bilimsel keşiflerle yeni faydaları ortaya çıkmaktadır (13).



Şekil 2.12: *Moringa oleifera* (104).

Moringa oleifera, hızlı büyüyebilen çok yıllık yaklaşık 10-12 metre boya ulaşabilen bir ağaçtır. Kabuğunun beyazımsı gri bir rengi vardır ve genellikle kalın bir mantar tabakası ile çevrilidir. Genç sürgünler morumsu ya da yeşilimsi beyaz kabuklu olabilirler. Yaprakları yeşil renktedir. Çiçekleri sarımsı krem renkte ve hoş kokuludur. Meyveleri içinde 20'ye yakın kahverengi tohum içeren 20-45 cm boyutlarında asılı halde bulunurlar (13).

Moringa oleifera yaprakları, birçok vitamin ve mineral için mükemmel bir kaynaktır. İçeriğinde flavonoidler, saponinler, sitokininler gibi fitokimyasallar ve linoleik asit (omega 6) ile linolenik asit (omega 3) gibi doymamış yağ asitlerini de içerir. Ayrıca yağ, protein, A vitamini (beta-karoten), bakır, B2 vitamini (riboflavin), B6 vitamini, C vitamini, çinko, demir, kükürt, magnezyum, manganez, potasyum, selenyum gibi önemli içerikleri nedeniyle oldukça besleyicidir (105, 106).

Birçok ülkede kurutulmuş yapraklar toz ya da kapsül haline getirilmiş halleriyle bitkisel tedavi ajanı olarak kullanılmak üzere piyasadadır. Gelişmekte olan ülkelerde insanların diyetlerindeki eksik protein, vitamin ve mineral ihtiyacını karşılamada da *Moringa oleifera* oldukça önemli bir yer tutmaktadır (106).

Moringa oleifera'nın kurutulmuş yaprakları %30,3 protein ve kalsiyum (%3,65) potasyum (%1,5), sodyum (%0,164), kükürt (%0,063), çinko (13,03mg/kg), bakır (%8,25), manganez (86,8mg/kg), demir (490 mg/kg), selenyum (363 mg/kg) içermektedir. Ayrıca yağ asitlerinden en yüksek değere sahip olanı alfa linolenik asit (%44,57) olmak üzere heksaeikosaenoikasit (%14,41), palmitik asit (%0,17) ve kaprik asit (%0,07) gibi 17 farklı yağ asidi içerdiği saptanmıştır. Bitkinin yaprakları vitamin ve mineral bakımından bitkinin baklalarından daha zengindir. Ancak baklalarının da C vitamini bakımından oldukça zengin olduğu hatta 100 gram dilimlenmiş bakladaki düzeyin günlük C vitamini ihtiyacını karşılayabileceği gösterilmiştir (105, 106). Vitaminlerden E vitamini 77 mg/100 gr ve A vitamini 18,5 mg/100 gr içerikleri de oldukça yoğun olarak tespit edilmişlerdir (106).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Basamaklarının Planlanması

- Hücre Kültürü Uygulamaları
- *Moringa oleifera* (MOLE) Doz Tayini ve MTT Analizi
- İmmünotokimyasal Boyama
- Koloni Oluşumu Deneyi (CFA- Coloni Formation Assay)
- Sonuçların Değerlendirilmesi

3.2. Hücre Kültürü Uygulamaları

Hücre kültürü uygulamalarının tamamı ve gerekli ortamın hazırlanması steril laminar hava akımlı kabinlerde biyogüvenlik önlemlerine dikkat edilerek gerçekleştirildi (JSR, JSCB-1200SB).

3.2.1. Hücre Dondurma ve Saklama

Hücreler her kriyotüpte 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde %7-10 DMSO (Neofroxx, Germany LOT:5F3CFA27) çözeltisi eklenerek -80°C 'de saklandı.

3.2.2. Kullanılan Hücre Hatları

Çalışmamızda kullanılan hücre hatları insan glioblastoma hücre hattı olan U 87 ve T 98 American Type Culture Collection (ATCC)'den (Manassas, VA, ABD) alındı.

3.2.3. Kullanılan Etken Madde ve Özellikleri

Çalışmamızda kullanılacak olan *Moringa oleifera* Lam. Extract (MOLE) liyofilize halde Eczacıbaşı (İstanbul, Türkiye)'nden alındı.

3.2.4. Deney aşamalarında kullanılacak solüsyonlar

3.2.4.1. PBS Hazırlama:

100ml 1x PBS için 25x'lik Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS, 003002, İnvitrogen) solüsyonundan 4 ml+96 ml distile su eklendi.

3.2.4.2. Crystal violet hazırlama:

%0,1'lik crystal violet solüsyonu hazırlamak için 0,05 gr crystal violet (Carlo Erba, France) hassas terazi (Denver Instrument) ile tartılarak 2,5 cc etil alkol (%100'lük) eklendi. 17,5 cc distile su ile karıştırılarak hazırlandı.

3.2.4.3. PFA (Paraformaldehit)Hazırlama:

%4'lük PFA için 10 ml'ye 0,4 gr PFA olacak şekilde hassas terazide (Denver Instrument) 0,4 gr PFA (Carlo Erba Reagents, France) tartılarak 60°C'de yüksek devirde PFA tamamen çözdürülerek hazırlandı.

3.2.4.4. %0,1'lik Triton X solüsyonu hazırlama

%0,1'lik Triton X solüsyonu için 10 ml PBS'ye ile 10 mikrolitre TritonX100 (Merck, 1.08603) solüsyonu eklendi.

3.2.5. Besiyerlerinin Hazırlanması

Hücrelerin yaşamlarını sürdürebilmeleri ve çoğalmalarını sağlayacak ortam sağlamak üzere DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture) (Merck, katalog no: DF-041-B) besiyerine %10 fetal sıgır serum (FBS) (Sigma Aldrich, katalog no: F4135), %1 penisilin-streptomisin (Capricorn PS-B,)ve %1 L-glutamin (Sigma Life Science, LOT:RNBJ8361) ilave edilerek besiyerleri hazırlandı.

3.2.6. Hücre Çözme Aşamaları

-80°C'de dondurulmuş olarak muhafaza edilen U87-MG ve T98-G hücreleri açılmaya başlanmadan laboratuvar ortamı hazırlık aşamaları kapsamında sıcak su banyosunun sıcaklığı 37°C'ye ayarlandı. Kriyotüpler -80°C'den direk 37°C'de dengelenmiş su banyosunda yaklaşık 3 dakika içerisinde eritildi ve üzerine 1ml taze besiyeri eklendi. Hücreleri dondurma aşamasında kriyoprotektan olarak kullandığımız DMSO (Dimethylsulfoxid) (Neofroxx, Germany LOT:5F3CFA27) solüsyonundan kurtarmak üzere falkon tüpler (Eppendorf, katalog no: 5427R) 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi (Centurion Scientific Limited). Santrifüj sonrası

süpernatant alınarak atıldı ve kalan çökelti 5 ml taze besiyeri ile karıştırılarak 25 cm²'lik T 25 flask kültür kabına (SPLLife Sciences Co.Ltd., Korea) aktarıldı. 37 ° C'de, %5 CO₂'li ortamda (ESCO, CCL-170B-8) ile inkübe edildi.

3.2.7. Hücrelerin Büyütülmesi ve Pasajlanması

Hücreler flask yüzeyinin yaklaşık olarak %80'ini kapladığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Üst besiyeri atılarak PBS (TA-999-PB, Thermofisher Scientific) ile yıkandı. Hücrelerin flask yüzeyinden nazikçe ayrılması için 2,5 ml %0.25 Tripsin-EDTA (PanBiotech, P10-0231SP) ortama eklendi ve 37 °C %5 CO₂ inkübatörde 5 dakika inkübe edildi. Böylece hücrelerin yüzer hale gelmeleri sağlandı. Hücrelerin üzerine tripsin reaksiyonunu durdurmak için 2,5 ml taze besiyeri eklendi. Tekrar 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Elde edilen hücreler 2 ayrı T 25 flaska bölündü.

3.2.8. Hücre sayımı

Hücreler tripsinizasyon ile süspansiyon haline getirildikten sonra hücre sayımı aşamasına geçildi. Oransal olarak değerlendirme ile toplam hücre süspansiyonunda mililitre başına hücre sayısını hesaplamak için 10 µl hücreye 10 µl Trypan mavisi eklenerek Thoma 35 lamına koyuldu ve üzeri lamelle kapatıldı. Canlı hücre zarı negatif yüklüdür bu halde iken trypan mavisi geçişine izin verilmezken ölü hücre zarı pozitif yüklü olduğundan Trypan mavisi kolayca içeriye girebilir. Trypan mavisi ile boyanan hücreler inverted mikroskop ile hücre sayım kriterlerine uygun şekilde sayım yapılarak oransal olarak çözelti için ml başına düşen hücre sayısı hesaplandı.

3.2.9. Deney Gruplarımız

Tablo 3-1. Deney grupları.

U 87	Kontrol (U 87)
	Deney (U 87+MOLE)
T 98	Kontrol (T 98)
	Deney (T 98+MOLE)

3.3. Kullanılacak MOLE konsantrasyonunun Belirlenmesi

3.3.1. MOLE Çözme ve Kullanım Prosedürü

Literatürde daha önce insan pankreas hücre hatları olan Panc-1 ve COLO357 üzerinde *Moringa oleifera*'nın etkisinin araştırıldığı bir çalışma hücre hatlarına MOLE ekstraktının uygulanması açısından baz alındı (107). *Moringa oleifera*'nın kurutulmuş ve toz haline getirilmiş yapraklarını içeren *Moringa oleifera* Lam. Extract (MOLE)'nin hücre hatlarına uygulanabilecek sulu ekstraktı 1 gr toza 10 ml kaynar su ile karıştırılıp 2 µm gözenekli steril filtreden steril bir tüpe alınarak +4°C 'de 5 güne kadar muhafaza edildi.

3.3.2. Sitotoksik Aktivite Tayini-MTT testi

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) testi hücresel proliferasyonu tayin ettiren standart bir kolorimetrik testtir. Sarı MTT boyasının mor formazona indirgenme miktarının spektrofotometrik ölçümü temeline dayanır. Ancak canlı hücrelerde bulunabilecek mitokondriyal bir redüktaz olan süksinat DHG aktivitesi ile NADH NAD'a dönerken MTT ise formazon kristaline döner. Bu indirgenme reaksiyonu yalnızca canlı hücrelerde gerçekleşebidiğinden sarı rengin mor renge dönüş miktarı ortamdaki canlı hücre sayısı ile koreledir. Başlangıçta sarı renkli olan MTT canlı kalan hücrelerin kullanımı ile mor renk alır

MTT boyası (Boster Biological Technolgy, AR1156, CA) 1 ml'de 5 mg olacak şekilde PBS 'te çözülüp filtre edilerek hazırlandı. U87-MG ve T98-G hücrelerinden her kuyucukta 10^4 hücre olacak şekilde 96'lık platalere 3 tekrarlı olacak şekilde ekildi. 37°C'de %5 CO₂ ortamda 24 saat inkübasyon yapıldıktan sonra taze besiyeri ile değiştirilerek MOLE'nin artan konsantrasyonları (0, 25, 50, 100, 200, 400 µg/ml) uygulandı. Doz uygulamaları 3 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. 17 saat inkübasyondan sonra renk değişimi spektrofotometrik olarak 570 nm deki absorbans ölçümü ile tayin edildi (Synergy H1 Microplate Reader, Biotek).

Artan konsantrasyonlarda MOLE uygulanan U87-MG ve T98-G deney gruplarından elde edilen absorbans değerlerinin ortalamaları alınarak Graphpad

Prism 7.0 yazılımında dozlara göre hücre canlılığı grafiği elde edildi. Grafikten IC 50 değeri hesaplandı.

3.4. İmmunositokimyasal Boyama

İmmunositokimyasal boyama aşamasında U87-MG ve T98-G hücre hatlarında MOLE uygulaması ile tümör patogenezinde bilinen AKT/FOXO3a/Bim yolağının nasıl etkilendiğini göstermek amaçlandı.

İndirekt immunositokimyasal boyama için 24 kuyucuklu hücre kültür plağının her gözünde 5×10^4 üzeri kaç hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı ve hücreler 37°C ve %5 CO_2 içeren inkübasyon koşullarında 24 saat inkübe edildi (ESCO, CCL-170B-8). Ertesi gün kontrol grubuna taze besiyeri, deney gruplarına MTT yöntemiyle belirlenen dozlarda MOLE ile hazırlanmış taze besi yeri uygulandı. 24 saat inkübasyondan sonra besiyerleri uzaklaştırıldı yerine hücre fiksasyonu için %4'lük PFA (Paraformaldehit) (Carlo Erba, 387507) 10 dakika uygulandı. Dökülerek 3 kez PBS solüsyonu ile yıkandı. %3'lük H_2O_2 (hidrojen peroksit) 10 dakika uygulandı yine dökülerek 3 kez daha PBS ile yıkama yapıldı. Bir yandan da %0,1'lik TritonX solüsyonu (1.08603.100, Atom scientific) hazırlandı. 15 dakika uygulanıp dökülerek tekrar 3 kez PBS ile yıkama yapıldı. Ardından bloklama solüsyonu (TA-060-UB, Thermo scientific) eklenerek 1 saat bloklama işlemi yapıldıktan sonra bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı ve yıkama yapılmadan anti-Akt antibody (STJ97771, St. John'sLab, UK) (1/1000), anti-FOXO3a (STJ93128, St. John'sLab, UK) (1/1000), anti-Bim (STJ91855, St.M John'sLab, UK) (1/250) primer antikoları eklenerek $+4^\circ\text{C}$ 'de 1 gece inkübe edildi. Ertesi sabah tekrar 3 kez PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Ticari olarak gelen kitin biotinli sekonder antikor (TP-060-BN, ThermoScientific) solüsyonu ile 15 dakika inkübasyonun ardından 3 kere PBS ile yıkama tekrarlandı. Kitin içerisindeki Streptavidin peroksidaz (TS-060-HR, Thermo scientific) koyularak 15 dakika daha oda sıcaklığında inkübasyon ve 3 kez PBS yıkaması tekrarlandı. İmmunoreaktivite reaksiyonunun gözlenebilirliği için Diaminobenzidin (DAB, TA-125-HD, Thermoscientific) ile 1 dakikalık boyama işleminin ardından dökülerek 30 saniye Hematoksilen (Harris, Merck) uygulandı ve distile su ile yıkama yapıldı. Lamalar hücre kuyucuklarına yazılan kontrol ve deney

gruplarına göre isimlendirip lamaları plate'lerden çıkarılarak mounting medium ile kapatıldı. Kamera entegreli ışık mikroskobu (Olympus DP26-CU;Leica MD750) ile fotoğraflandı.

3.4.1. İmmunositokimyasal Bulguların Değerlendirilmesi

Kontrol ve deney grubundaki hücre hatlarının immunreaktivitesinin değerlendirilmesi için çift kör iki histolog tarafından ışık mikroskobu incelemesi yapıldı.

İstatistiksel olarak immunreaktivitenin değerlendirilmesi için U87-MG kontrol ve deney grupları ile T98-G kontrol ve deney gruplarında optik dansite (OD) ölçümü yapıldı. Optik dansite ölçümü ve değerlendirmesi için bir görüntü işleme ve analiz yazılımı olan ImageJ (NIH) (Software, version 2.0.0- Beta4) (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) yazılımı kullanıldı. İmmunositokimya boyamasının ardından x40'lık büyütmede 10 farklı alan seçildi. DAB pozitif boyanma, kahverengi renkli hücre görünümü ile kanıtlandı. Her görüntü ilk olarak DAB vektörü kullanılarak üç farklı görüntüye (yeşil, mavi, kahverengi) ayrılarak kahverengi DAB görüntüsünün kalibrasyonu, üst üste binmemiş beş lekeli hücre alanının ortalama yoğunlukları (mean gray value) ölçülerek hesaplandı. Yoğunluk değerleri ($OD = \log(\frac{\text{max intensity}}{\text{mean intensity}})$) denklemi kullanılarak OD (optic density) değeri elde edildi. Max.intensity olarak 250, mean intensity olarak mean gray value baz alındı. Sonuçlar Microsoft Excel elektronik tablosuna aktarıldı. İstatistiksel analizler için GraphPad Prism version 7.0 kullanıldı. Kontrol ve deney gruplarından elde edilen verileri karşılaştırmak için Student's T testi yapılarak ortalama \pm standart sapma olarak sunuldu. p değeri $<0,05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

3.5. Koloni oluşturma deneyi

Koloni oluşturma deneyi kanserli hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerinin etkilenip etkilenmediğinin tespiti için yapılan bir deneydir. 6'lık well plate'lere her grup için 500 hücre ekildi besiyeri eklenerek inkübe edildi (ESCO, CCL-170B-8). 24 saatlik inkübasyon sonunda ertesi gün taze besiyeri ile değişim yapıldıktan sonra

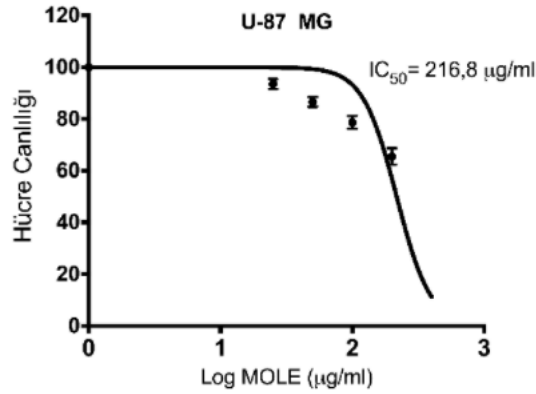
deney grubuna U87-MG ve T98-G hücre hatlarının deney gruplarına belirlenen dozda MOLE uygulaması yapıldı. Ardından hücreler 14 gün inkübe edildi. Daha sonra PBS ile yıkanarak %100 metanol ile 10 dakika fikse edildi. Elde edilen %0,1'lik Crystal .Violet solüsyonu kontrol ve deney gruplarındaki hücreler 30'ar dakika uygulanarak ardından distile su ile yıkandı. Boyanan hücrelerin koloni oluşturma potansiyelleri pixel ölçümleri karşılaştırılarak Image J (Colony Count J) yazılımı ile değerlendirildi.



4. BULGULAR

4.1. U 87-MG Hücre Kültürü Uygulama Bulguları

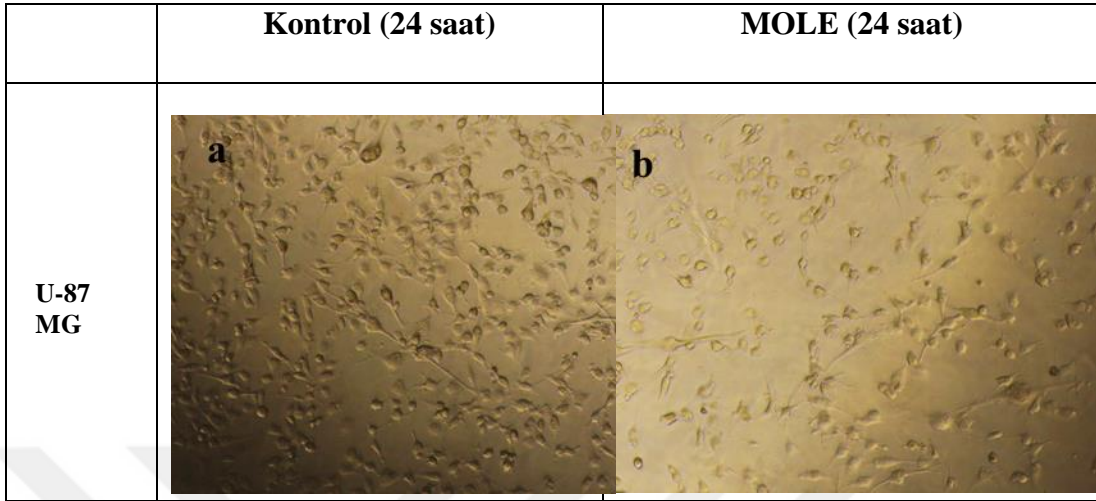
4.1.1. U 87-MG Hücre Hattı MTT Bulguları



Şekil 4.1. U87-MG artan MOLE konsantrasyonu ile % hücre canlılığı ve MTT sonucu ve elde edilen IC₅₀ değeri

In vitro şartlarda yapılan MTT analizinde 96'lık platalere her kuyucuğa 10^4 olacak şekilde ekilen U87-MG hücrelerinden deney grubuna (U87-MG+MOLE) MOLE'nin artan konsantrasyonları (0, 25, 50, 100, 200, 400 µg/ml) uygulanarak 24 saat inkübe edildi. Doz uygulamaları 3 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. MOLE'nin artan konsantrasyonlarında hücre canlılığının azaldığı gözlemlendi. 570 nm'deki spektrofotometrik absorbans değerlerinin analizinde U 87-MG için IC 50 değeri 216,8 µg/ml olarak belirlendi. (Şekil 4-1)

4.1.2. U87-MG Hücre Hatları için U87-MG+MOLE Grubunda IC 50 değeri Inverted Mikroskop İncelemesi

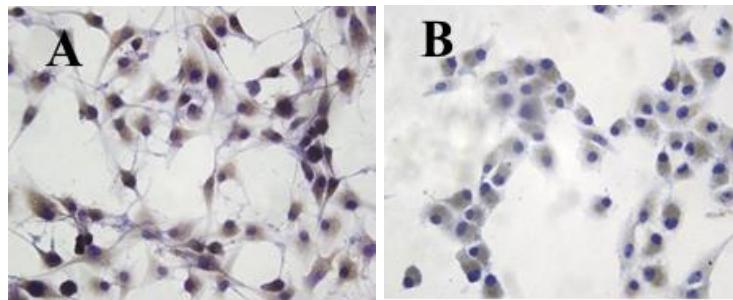


Şekil 4.2. U 87-MG hücre hatlarının kontrol grubu (a) ve IC50 değeri olarak belirlenen 216,8 µg/ml dozda MOLE uygulamasının ardından U87-MG+MOLE deney grubu (b) 24 saat inkübasyon sonrası inverted mikroskop görüntüsü, Büyütme 200X.

IC 50 değerince MOLE uygulanan deney grubunda (U87-MG+MOLE) hücrelerin %50'sinin öldüğü gözlemlendi. (Şekil4-2)

4.1.3. U87-MG Hücre Hattı İmmünohistokimya Bulguları

4.1.3.1. AKT Bulguları



Şekil 4.3. U87-MG Kontrol (A) ve U87-MG+MOLE (B) anti-AKT, İmmünohistokimya, Büyütme 400X.

U 87-MG+MOLE deney grubunun AKT için immunreaktivitesi U87-MG kontrol grubuna göre azalmış olarak gözlemlendi. Ayrıca U87-MG+MOLE deney grubunda hücreler arası bağlantıların azaldığı, hücrelerin birbirlerine yaklaştıkları gözlemlendi (Şekil4-3).

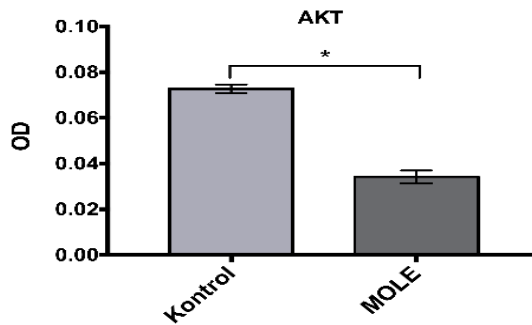
U 87-MG Kontrol ve U 87-MG+MOLE gruplarından immunositokimya boyamasının ardından x40'lık büyütmede 10 farklı alan seçildi. Image J programı kullanılarak optik dansite değerleri ölçüldü. AKT için optik dansite değeri U87-MG kontrol grubu için $0,072 \pm 0,002$; U87-MG+MOLE grubu için $0,034 \pm 0,003$ olarak bulundu. İstatistiksel değerlendirme sonucunda U 87-MG+MOLE grubunda U87-MG Kontrol grubuna göre AKT'deki azalma istatistiksel olarak anlamlı olarak bulundu ($P < 0,001$) (Tablo4-1)

Tablo 4-1. U87-MG Kontrol ve U87-MG+MOLE Grupları anti-AKT Optik Dansite İmmunositokimyasal Analiz İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları, (ortalama \pm standart sapma), (ImageJ (NIH) (Software, version 2.0.0- Beta4) (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

U87-MG	Kontrol	MOLE	p
AKT	$0,072 \pm 0,002$	$0,034 \pm 0,003$	$p < 0,001$

$p < 0,05$

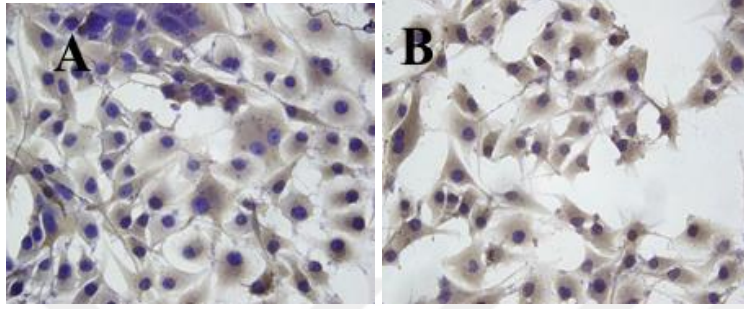
Gruplar arası karşılaştırmada Student's t testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme için $p < 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi ($p < 0,001$) (Tablo 4-1).



Şekil 4.4. U87-MG Kontrol ve U87-MG+MOLE Grupları, anti-AKT, İmmunositokimyasal Analiz Optik Dansite İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları, (ortalama \pm standart sapma), (ImageJ (NIH) (Software, version 2.0.0- Beta4) (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

U87-MG hücre hattı için U87-MG+MOLE grubunda kontrol grubuna göre AKT antikorumun immunositokimyasal boyamada daha az optik dansitede olduğu yani azaldığı gözlemlendi. (Şekil4-4).

4.1.3.2. FOXO3a Bulguları



Şekil 4.5. U87-MG Kontrol (A) ve U87-MG+MOLE (B) anti-FOXO3a, İmmunositokimya, Büyütme 400X.

U87-MG+MOLE deney grubunun FOXO3a için immunreaktivitesi U87-MG kontrol grubuna göre artmış olarak gözlemlendi. Ayrıca U87-MG+MOLE deney grubunda hücreler arası bağlantıların azaldığı, hücrelerin birbirlerine yaklaştıkları gözlemlendi (Şekil4-5).

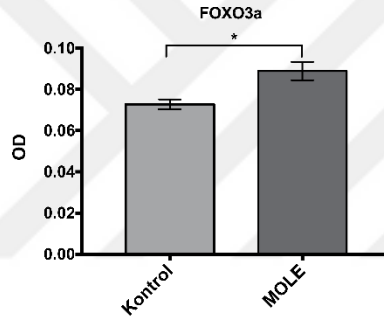
U 87-MG Kontrol ve U 87-MG+MOLE gruplarından immunositokimya boyamasının ardından x40'lık büyütmede 10 farklı alan seçildi. Image J programı kullanılarak optik dansite değerleri ölçüldü. FOXO3a için optik dansite değeri U87-MG kontrol grubu için $0,073 \pm 0,002$; U87-MG+MOLE grubu için $0,089 \pm 0,004$ olarak bulundu. İstatistiksel değerlendirme sonucunda U 87-MG+MOLE grubunda U87-MG Kontrol grubuna göre FOXO3a'daki artma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,0052$). (Tablo 4-2).

Tablo 4-2. U87-MG Kontrol ve U87-MG+MOLE Grupları anti-FOXO3a Optik Dansite İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları, (ortalama \pm standart sapma), ImageJ (NIH) (Software, version 2.0.0- Beta4) (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

U87-MG	Kontrol	MOLE	p
FOXO3a	0,073 \pm 0,002	0,089 \pm 0,004	p=0,0052

p<0,05

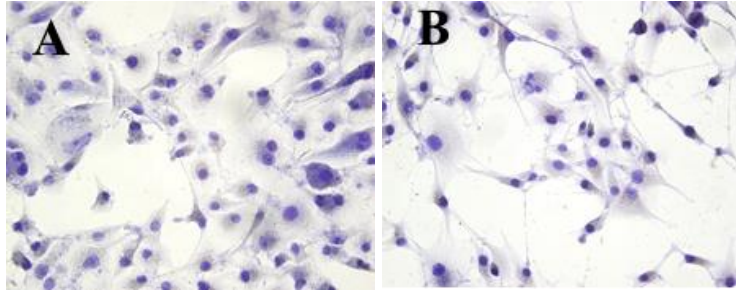
Gruplar arası karşılaştırmada Student's T testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme için p<0,05 değeri anlamlı olarak kabul edildi (p<0,0052) (Tablo 4-2).



Şekil 4.6. U87-MG Kontrol ve U87-MG+MOLE Grupları anti-FOXO3a Optik Dansite İmmünohistokimyasal Analiz İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları, (ortalama \pm standart sapma), ImageJ (NIH) (Software, version 2.0.0- Beta4) (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

U87-MG hücre hattı için MOLE grubunda kontrol grubuna göre FOXO3a antikorunun immünohistokimyasal boyamada daha fazla optik dansitede olduğu yani arttığı gözlemlendi (Şekil 4-6).

4.1.3.3. Bim Bulguları



Şekil 4.7. U87-MG Kontrol (A) ve U87-MG+MOLE (B) anti-Bim, İmmünositokimya, Büyütme 400X.

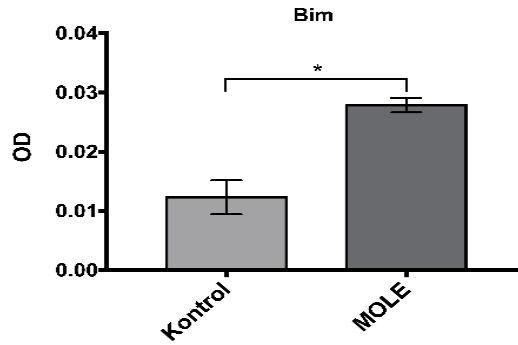
U87-MG+MOLE deney grubunun Bim için immunreaktivitesi U87-MG kontrol grubuna göre artmış olarak gözlemlendi (Şekil4-7).

U87-MG Kontrol ve U87-MG+MOLE gruplarından immunositokimya boyamasının ardından x40'lık büyütmede 10 farklı alan seçildi. Image J programı kullanılarak optik dansite değerleri ölçüldü. Bim için optik dansite değeri U87-MG kontrol grubu için $0,012 \pm 0,003$; U 87-MG+MOLE grubu için $0,028 \pm 0,001$ olarak bulundu. İstatistiksel değerlendirme sonucunda U 87-MG+MOLE grubunda U87-MG Kontrol grubuna göre Bim'deki artma istatistiksel olarak anlamlıydı ($P=0,001$) (Tablo 4-3).

Tablo 4-3. U87-MG Kontrol ve U87-MG+MOLE Grupları anti-Bim Optik Dansite İmmünositokimyasal Analiz İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları, (ortalama \pm standart sapma), ImageJ (NIH) (Software, version 2.0.0- Beta4) (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

U87-MG	Kontrol	MOLE	p
Bim	$0,012 \pm 0,003$	$0,028 \pm 0,001$	$p=0,001$

$p < 0,05$

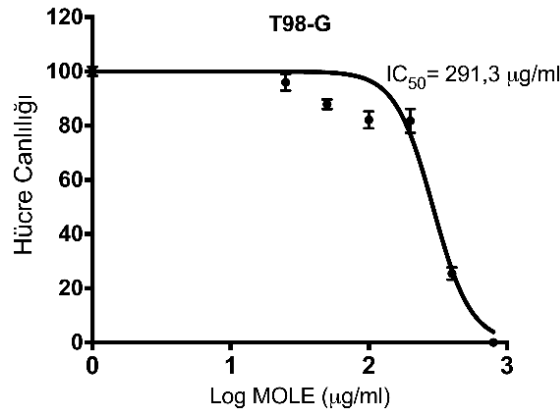


Şekil 4.8. U87-MG Kontrol ve U87-MG+MOLE Grupları anti-Bim Optik Dansite İmmunositokimyasal Analiz İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları, (ortalama \pm standart sapma), ImageJ (NIH) (Software, version 2.0.0- Beta4) (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Gruplar arası karşılaştırmada Student's T testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme için $p < 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi. ($p < 0,001$).

U87-MG hücre hattı için MOLE grubunda kontrol grubuna göre Bim antikörünün immunositokimyasal boyamada daha fazla optik dansitede olduğu yani arttığı gözlemlendi (Şekil 4-8).

4.2. T 98-G Hücre Kültürü Uygulama Bulguları

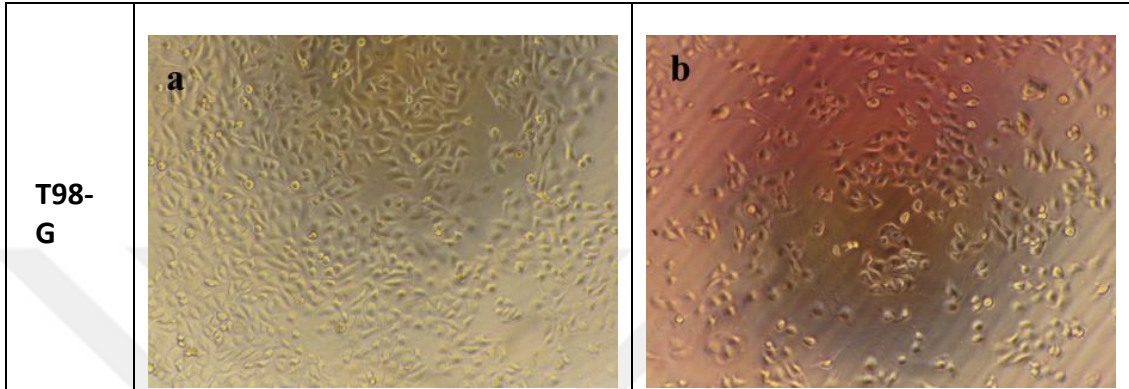


Şekil 4.9. U87-MG artan MOLE konsantrasyonu ile % hücre canlılığı MTT sonucu ve elde edilen IC50 değeri

In vitro şartlarda yapılan MTT analizinde 96'lık platelere her kuyucuğa 10^4 olacak şekilde ekilen T98-G hücrelerinden deney grubuna MOLE'nin artan konsantrasyonları (0, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$) uygulanarak 24 saat inkübe edildi. Doz uygulamaları 3 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. MOLE'nin artan

konsantrasyonlarında hücre canlılığının azaldığı gözlemlendi. 570 nm'deki spektrofotometrik absorpsiyon değerlerinin analizinde T98-G için IC 50 değeri 291,3 µg/ml olarak belirlendi (Şekil4-9).

4.2.1. T98-G Hücre Hatları için T98-G+MOLE Grubunda IC 50 değeri Inverted Mikroskop İncelemesi

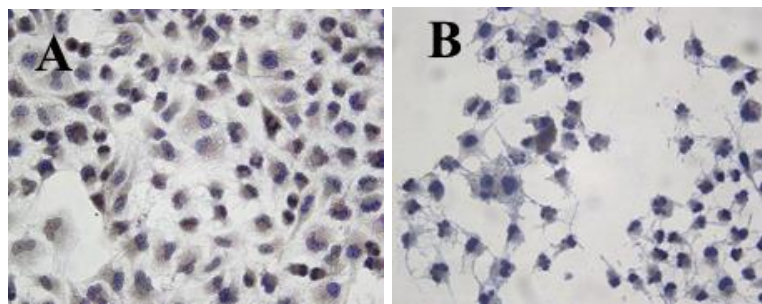


Şekil 4.10. T98-G hücre hatlarının kontrol grubu (a) ve IC50 değeri olarak belirlenen 291,3 µg/ml dozda MOLE uygulamasının ardından T98-G deney grubu (b) 24saat inkübasyon sonrası inverted mikroskop görüntüsü, Büyütme 200X.

IC 50 değerincede MOLE uygulanan deney grubunda hücrelerin %50'sinin öldüğü gözlemlendi (Şekil 4-10).

4.2.2. T98-G İmmünohistokimya Bulguları

4.2.2.1. AKT Bulguları



Şekil 4.11. T98-G Kontrol (A) ve T98-G+MOLE (B) anti-AKT, İmmünohistokimya, Büyütme 400X.

T98-G+MOLE deney grubunun AKT için immunreaktivitesi T98-G kontrol grubuna göre azalmış olarak gözlemlendi. Ayrıca T98-G+MOLE deney grubunda

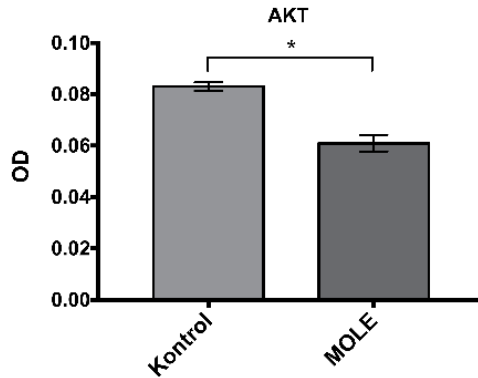
hücreler arası bağlantıların azaldığı, hücrelerin birbirlerine yaklaştıkları gözlemlendi (Şekil4-11).

T98-G Kontrol ve T98-G+MOLE gruplarından immunositokimya boyamasının ardından x40'luk büyütmede 10 farklı alan seçildi. Image J programı kullanılarak optik dansite değerleri ölçüldü. AKT için optik dansite değeri T98-G kontrol grubu için $0,083 \pm 0,002$; T98-G+MOLE grubu için $0,061 \pm 0,003$ olarak bulundu. İstatistiksel değerlendirme sonucunda T98-G+MOLE grubunda T98-G Kontrol grubuna göre AKT'deki azalma istatistiksel olarak anlamlı olarak saptandı. ($p < 0,001$) (Tablo4-4).

Tablo 4-4. T98-G Kontrol ve T98-G+MOLE Grupları anti-AKT Optik Dansite İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları, (ortalama \pm standart sapma), ImageJ (NIH) (Software, version 2.0.0- Beta4) (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

T98-G	Kontrol	MOLE	p
AKT	$0,083 \pm 0,002$	$0,061 \pm 0,003$	$p < 0,001$

$p < 0,05$

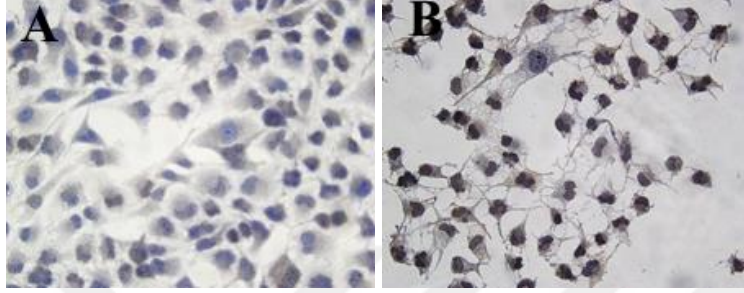


Şekil 4.12. U87-MG Kontrol ve U87-MG+MOLE Grupları anti-AKT Optik Dansite İmmünohistokimyasal Analiz İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları, (ortalama \pm standart sapma), ImageJ (NIH) (Software, version 2.0.0- Beta4) (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Gruplar arası karşılaştırmada Student's T testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme için $p < 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi. ($p < 0,001$)

T98-G hücre hattı için T98-G+MOLE grubunda T98-G Kontrol grubuna göre AKT antikorumun immunositokimyasal boyamada daha az optik dansitede olduğu yani azaldığı gözlemlendi (Şekil4-12).

4.2.2.2. FOXO3a Bulguları



Şekil 4.13. T98-G Kontrol (A) ve T98-G+MOLE (B) anti-FOXO3a, İmmunositokimya, Büyütme 400X.

T98-G+MOLE deney grubunun FOXO3a için immunreaktivitesi T98-G kontrol grubuna göre artmış olarak gözlemlendi. (Şekil 4-13).

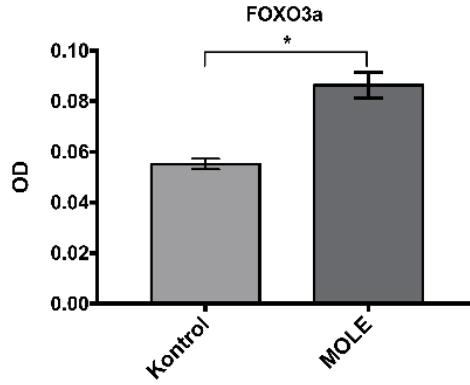
T98-G Kontrol ve T98-G +MOLE gruplarından immunositokimya boyamasının ardından x40'lık büyütmede 10 farklı alan seçildi. Image J programı kullanılarak optik dansite değerleri ölçüldü. FOXO3a için optik dansite değeri T98-G kontrol grubu için $0,055 \pm 0,002$; T98-G+MOLE grubu için $0,086 \pm 0,005$ olarak bulundu. İstatistiksel değerlendirme sonucunda T98-G+MOLE grubunda T98-G Kontrol grubuna göre AKT'deki azalma istatistiksel olarak saptandı ($p < 0,001$) (Tablo 4-5).

Tablo 4-5. T98-G Kontrol ve T98-G+MOLE Grupları anti-FOXO3a Optik Dansite İmmunositokimyasal Analiz İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları, (ortalama \pm standart sapma), ImageJ (NIH) (Software, version 2.0.0- Beta4) (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

T98-G	Kontrol	MOLE	p
FOXO3a	$0,055 \pm 0,002$	$0,086 \pm 0,005$	$p < 0,001$

$p < 0,05$

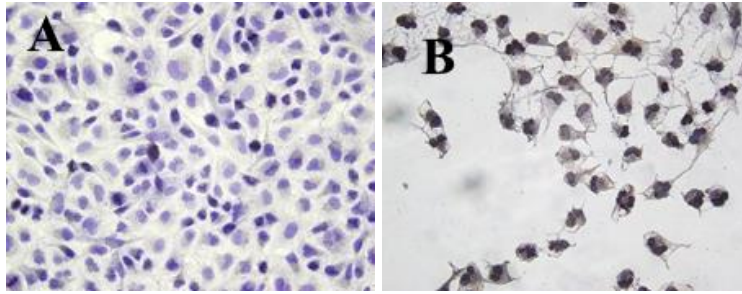
Gruplar arası karşılaştırmada Student's T testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme için $p < 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi ($p < 0,001$) (Tablo 4-5).



Şekil 4.14. T98-G Kontrol ve T98-G+MOLE Grupları anti-FOXO3a Optik Dansite İmmünohistokimyasal Analiz İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları, (ortalama \pm standart sapma), ImageJ (NIH) (Software, version 2.0.0- Beta4) (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

T98-G hücre hattı için MOLE grubunda kontrol grubuna göre FOXO3a antikorunun immünohistokimyasal boyamada daha fazla optik dansitede olduğu yani arttığı gözlemlendi (Şekil 4-14).

4.2.2.3. Bim Bulguları



Şekil 4.15. T98-G Kontrol (A) ve T98-G+MOLE (B) anti-FOXO3a, İmmünohistokimya, Büyütme 400X.

T98-G+MOLE deney grubunun Bim için immunreaktivitesi T98-G kontrol grubuna göre artmış olarak gözlemlendi. (Şekil4-3)

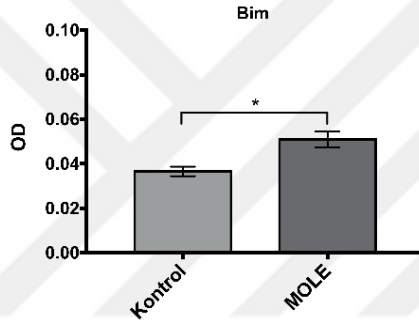
T98-G Kontrol ve T98-G +MOLE gruplarından immünohistokimya boyamasının ardından x40'luk büyütmede 10 farklı alan seçildi. Image J programı kullanılarak optik dansite değerleri ölçüldü. Bim için optik dansite değeri T98-G

kontrol grubu için $0,036 \pm 0,002$; T98-G+MOLE grubu için $0,051 \pm 0,003$ olarak bulundu. İstatistiksel değerlendirme sonucunda T98-G+MOLE grubunda T98-G Kontrol grubuna göre Bim'deki artma istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,004$).

Tablo 4-6. T98-G Kontrol ve T98-G+MOLE Grupları anti-Bim Optik Dansite İmmünotokimyasal Analiz İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları, (ortalama \pm standart sapma), ImageJ (NIH) (Software, version 2.0.0- Beta4) (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

T98-G	Kontrol	MOLE	p
Bim	$0,036 \pm 0,002$	$0,051 \pm 0,003$	$p = 0,004$

$p < 0,05$



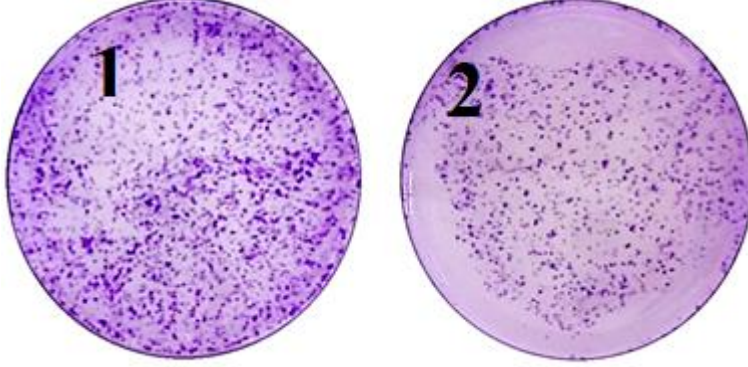
Şekil 4.16. T98-G Kontrol ve T98-G+MOLE Grupları anti-Bim Optik Dansite İmmünotokimyasal Analiz İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları, (ortalama \pm standart sapma), ImageJ (NIH) (Software, version 2.0.0- Beta4) (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Gruplar arası karşılaştırmada Student's T testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme için $p < 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi. ($p = 0,004$).

T98-G hücre hattı için MOLE grubunda kontrol grubuna göre Bim antikorunun immünotokimyasal boyamada daha fazla optik dansitede olduğu yani arttığı gözlemlendi (Şekil 4-16).

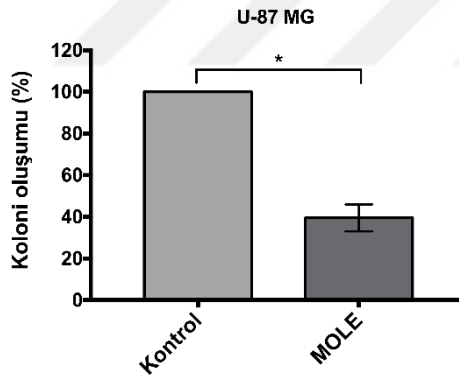
4.3.Koloni Oluşturma Deneyi (CFA) Bulguları

4.3.1. U87-MG CFA Bulguları



Şekil 4.17. U87-MG Kontrol (1) ve U87-MG+MOLE (2) CFA, Crystal Violet.

U87-MG hücre hatlarında IC50 dozunda MOLE uygulaması yapıldı. Hücrelerin koloni oluşturma potansiyelleri U87-MG+MOLE deney grubunda U87-MG Kontrol grubuna göre azalmış olarak gözlemlendi (Şekil 4-17).



Şekil 4.18. U87-MG Kontrol ve U87-MG+MOLE grupları Koloni Oluşum Yüzdeleri İstatistiksel Değerlendirme ImageJ (Colony Count J) (NIH) (Software, version 2.0.0-Beta4) (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

U87-MG+MOLE deney grubunda U87-MG Kontrol grubuna göre koloni oluşturma yüzdelerinin azaldığı görülmüştür (Şekil 4-18).

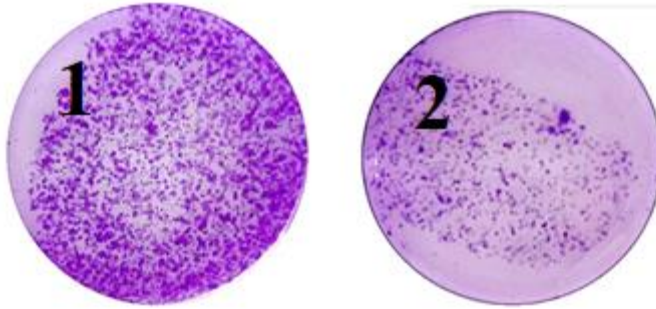
Tablo 4-7. U87-MG Kontrol ve U87-MG+MOLE Grupları Koloni Oluşumu İstatistiksel Değerlendirme ImageJ (NIH) (Software, version 2.0.0- Beta4) (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

	Kontrol (%)	MOLE (%)	p
U-87 MG	100	39,48±6,48	p<0,001

p<0,05

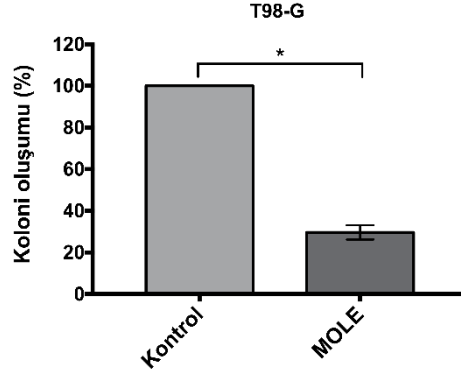
Image J (Colony Count J) yazılımı kullanılarak her iki grubun görüntüleri Colony Count J yazılımında değerlendirildi. U87-MG+MOLE deney grubunda koloni sayısı U87-MG Kontrol grubuna göre %39,48±6,48 ile azalmış olarak hesaplandı. İstatistiksel değerlendirmede bu azalmanın anlamlı olduğu saptandı (p<0,001) (Tablo 4-7).

4.3.2. T98-G CFA Bulguları



Şekil 4.19. T98-G Kontrol (1) ve T98-G+MOLE (2) CFA, Crystal Violet.

T98-G hücre hatlarında IC50 dozunda MOLE uygulaması yapıldı. Hücrelerin koloni oluşturma potansiyelleri deney grubunda kontrol grubuna göre azalmış olarak gözlemlendi (Şekil 4-19).



Şekil 4.20. T98-G Kontrol ve T98-G+MOLE Grupları Koloni Oluşumu İstatistiksel Değerlendirme ImageJ (Colony Count J) (NIH) (Software, version 2.0.0- Beta4) (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) .

T98-G+MOLE deney grubunda T98 kontrol grubuna göre koloni oluşturma yüzdelерinin azaldığı görülmüştür (Şekil 4-20).

Tablo 4-8. T98-G Kontrol ve T98-G+MOLE Grupları Koloni Oluşumu İstatistiksel Değerlendirme ImageJ (NIH) (Software, version 2.0.0- Beta4) (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

	Kontrol (%)	MOLE (%)	p
T98-G	100	29,64±3,40	p<0,001

p<0,05

Image J programı kullanılarak her iki grubun görüntüleri Colony Count J yazılımında değerlendirildi. T98+MOLE deney grubunda T98-G Kontrol grubuna göre %29,64±3,40 ile koloni sayısı azalmış olarak hesaplandı. İstatistiksel değerlendirmede bu azalma anlamlı olarak saptandı (p<0,001) (Tablo4-8).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada U87-MG ve T98-G insan glioblastoma multiforme hücre hatları üzerinde *Moringa oleifera*'nın Akt/FOXO3a/Bim apoptotik yolağı üzerine etkisi araştırılmıştır.

Ciechomska ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları kemoterapötiklere (özellikle TMZ) direnç gösteren tümör tiplerde saptanmış olan EGFR gen ekspresyonu yapan glioblastoma hücre hatları ile yapılan çalışmada EGFR gen ekspresyonu düşük hücreler BMP 4 ekspresyonu ile kemoterapötik direnci kazansa da hücrelerin proliferasyon aşamasında G1'de durdukları gösterilmiştir. EGFR gen ekspresyonu yüksek hücrelerde ise BMP4 kaynaklı GSC dönüşümü göstererek kemoterapötik direnç kazansalar dahi apoptotik kontrolün Akt/FOXO3a/Bim yolağı üzerinden kontrol edildiği keşfedilmiştir (73, 87). Biz de çalışmamızda bu yolağı glioblastomalar için metastatik süreçte ve kemoterapötik direncinde önemi nedeniyle tercih ettik.

Sfingokinaz1 (SPHK 1) insan SPHK1 geni tarafından kodlanan gliomalarda yüksek ekspresyon seviyesine sahip ve hücre proliferasyonunu tetikleyici apoptoz direnci gibi işlevleri nedeniyle onkojenik bir enzimdir (90, 91). Glioma hücrelerinde artan SPHK1 ekspresyonunun Akt'nin fosforile olarak FOXO3a'nın fosforile inaktivasyonuna ve sonuç olarak Bim'in aşağı regülasyonuna neden olduğu ortaya konmuştur. Aynı çalışmada yapılan Western Blot analizinde SPHK1 ekspresyonunun az olduğu hücrelerde nükleer FOXO3a ekspresyonunun arttığı ancak toplam FOXO3a ekspresyon seviyesinin değişmediği saptanmıştır. Destekler şekilde RT-PCR analizinde FOXO3a'nın transkripsiyonel düzeyi de değişmemiştir (92). FOXO3a'nın Akt fosforilasyonu ile nükleer lokalizasyondan ihraç edilen FOXO3a ile Akt/FOXO3a/Bim yolağında SPHK 1'in onkolojik etki adı altında antiapoptotik sürece hizmet eden bir enzim olduğu bu yolak üzerinden de ortaya konmuştur (91, 92). Zhu ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada küçük hücreli dışı akciğer kanserinde de yüksek olduğu bilinen SPHK1'in Akt yolunu aktive ederek hücre proliferasyonu artışı ve istilacı hücre davranışını indükleyen yolak için gerekli

olduğu ifade edilmiştir (90, 108). Liu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sisplatinin akciğer kanseri üzerinde etkisinin PI3K ve Akt fosforilasyonunu azaltarak ve FOXO3a'nın nükleer birikimini indükleyerek Bim apoptotik proteininin sekresyonunu artırdığı gösterilmiştir (109). Biz de çalışmamızda Image J kullanılarak yaptığımız immunositokimyasal analiz ile optik dansitenin AKT'de azaldığı, FOXO3a ve Bim'de arttığını saptadık.

Farklı insan glioblastoma hücre hatlarında yapılmış çalışmalarda farklı ajanlarla apoptotik yolların indüklenbildiği gösterilmiştir. Örneğin; Sun ve arkadaşlarını yaptığı çalışmada Caffeine (1, 3, 7 trimethylxanthine) ile U 251 insan glioblastoma hücre hatlarında deney grubunda FOXO1'in nükleer translokasyonunu indüklediği ve hem FOXO1'in hem de Bim ekspresyonunu Western Blot analizi ile de gösterildiği üzere artırdığı saptanmıştır (93). Epimedum koreanumdan üretilen aktif flavonoid bir bileşik olan Icariside II bitki özütü ile yapılan bir çalışmada Icariside II'nin glioblastom hücre hatlarında Akt'nin fosforilasyon ile aktivasyonunu baskılayarak FOXO3a'nın sitoplazmadan nükleer translokasyona geçişini desteklediği ifade edilmiştir. Ayrıca CFA (Coloni Formation Assay) deneylerinde gözlenen hücre proliferasyonu azalışı hem Western Blot analizinde G1/S geçişi için önemli cyclin D azalışı ile hem de apoptotik yolağa gidiş göstergelerinden sitokrom c, parçalanmış caspase 3 seviyelerinin artışı ile desteklenmiş, sürecin apoptoz lehine ilerlediği gösterilmiştir (95). Biz de çalışmamızda FOXO3a'nın MOLE uygulanan deney gruplarında Image J ile ölçülen optik dansite sonuçlarında deney gruplarında kontrol grubuna göre artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu saptadık.

Tüm memeli dokularında çeşitli oranlarda eksprese olan FOXO'lardan FOXO1 adipoz dokuda, FOXO3a beyinde, FOXO4 kalpte yüksek oranda eksprese edilir (65). FOXO3a aynı zamanda böbrek dokusunda da eksprese edildiği bilinen ve özellikle clear cell renal carcinomada azalan tümör baskılayıcı bir gen dir. FOXO3a'nın ekspresyon seviyelerinin nefroblastom hücre serilerinde de az olduğu bilinmektedir. Qian ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada nefroblastom hücre hatlarında FOXO3a'nın aşırı ekspresyonunun WNT/beta katenin sinyal yolağını da aşağı regülasyonu ile apoptozu indükleyerek hücre proliferasyonunu ve metastazı

inhibe ettiği gösterilmiştir (110). Biz de çalışmamızda immunositokimyasal olarak Bim'in MOLE uygulanan deney grubunda arttığını ve sürecin glioblastoma hücre hattı için apoptoz lehine ilerlediğini saptadık.

Bitkisel ajanların tedavilere destek tedavi olarak kullanılması açısından birçok hücre hattında apoptoz yollarına etkileri araştırılmıştır. Lee ve arkadaşları tarafından PC-3 ve DU145 insan prostat kanseri hücre hatlarında yapılan bir çalışmada işlenmiş sarımsağın bir bileşeni olan dialil trisülfid (DATS)'ın AKT sinyal yolağının inaktivasyonu üzerinden Bad sekestrasyonu ile apoptoz indükleyici etkisi gösterilmiştir (111). Meme kanseri hücre hatları MCF7 ve MDA-MB-231 üzerinde Harmin hydrochloride (HMH)'nin terapötik amaçlı kullanılıp kullanılmayacağına yönelik yapılan bir çalışmada HMH'nin Akt fosforilasyonunu azaltarak Akt/FOXO3a sinyal yolağında FOXO3a aktivitesinin artması ile birlikte hücreyi apoptoz lehine götürdüğü keşfedilmiştir (112). Biz de çalışmamızda daha önce U87-MG ve T98-G hücre hatlarında etkisi araştırılmamış *Moringa oleifera* (MOLE) ile çalıştık. MOLE'nin U87-MG ve T98-G hücre hatlarında apoptozu indüklediği Bim immunoreaktivitesinin artışı ile gösterdik.

Posttranskripsiyonel modifikasyonlar proteinlerin hücre içi konumlarında ve diğer hücre içi proteinlerinin etkileşimlerinde değişikliğe sebep olarak fonksiyon düzenlenmesinde rol oynayan metabolik olaylardır. FOXO3a'nın translokasyonunu değiştiren başlıca 4 temel modifikasyon fosforilasyon, ubiquitinasyon, asetilasyon ve metilasyondur. FOXO3a'nın aktivitesinin düzenlenmesinde önemli mekanizması FOXO3a'nın bir dizi kinaz tarafından gerçekleştirilen fosforilasyonu üzerinden çekirdek sitoplazma arası lokasyon değişikliğidir (71, 113). Prostat kanserinin patogenezinde de FOXO3a'nın kilit bir rol oynadığı, FOXO3a'nın aktivite kaybının hücre proliferasyonu, metastaz ve nüks ilişkili olduğu ifade edilmiştir hatta FOXO3a aktivitesinin kaybını önlemek için etkili stratejiler geliştirilmesi gerekliliği vurgulanmıştır (90).

FOXO3a yapısında hem NLS hem NES alanlarının mevcudiyeti FOXO3a'nın hücre için farklı stres koşulları altında koruyucu görevini açıklayıcı olabilir. *Moringa oleifera* ekstraktının vücutta bazen de apoptozdan kaçınma üzerinden koruyucu

fonksiyonu olduğu keşfedilmiştir. Örneğin; hücrel stres kaynağı oluşturabilecek maddelerden kurşun maruziyetinde serebral korteks üzerinde yapılan bir hayvansal deney çalışmasında MDA gibi reaktif oksijen radikallerinin üretimini ve proinflamatura sitokinlerin sentezini azaltarak etki gösteren bir fitoterapötik ajan olduğu desteklenmiştir (114). Yine benzer şekilde geleneksel Çin tıbbında önemli Sal-A (Salvianic acid) ekstraktının da oluşturulmuş iskemi modelinde Akt'nin ve FOXO3a fosforilasyonunun artırılması üzerinden Bim apoptotik yolak inhibisyonu ile iskeminin yıkıcı etkisinden vücudun korunmasında rol üstlendiği gösterilmiştir (115).

Tümörün hücre içi yollar ile ilişkisi günümüzde oldukça önem arz etmektedir. Birçok kemoterapötik ve metabolizma düzenleyici ilaçlar hücre içi yollara etkileri açısından araştırılmışlardır. Sisplatin birçok kanser türünde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötik ajandır. 2014 yılında Liu ve arkadaşlarının yaptığı sisplatinin akciğer kanseri üzerinde sisplatinin sitotoksik etkisinin moleküler dayanağının araştırıldığı çalışmada sisplatin tedavisi altında PI3K ve Akt fosforilasyonunu azaltarak Akt'nin inhibisyonu ile FOXO3a'nın da fosforilasyonunun da inhibisyonu üzerinden FOXO3a'nın nükleer birikimini indükleyerek Bim apoptotik proteininin sekresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Yani FOXO3a Sisplatinin AC kanserindeki sitotoksik aktivitesi sürecindeki yolak üzerindedir (116).

Lipid düşürücü ilaçlar olarak günümüzde yaygın olarak kullanılan fenofibratlar ile glioblastoma hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışmada hipotez fenofibratların metabolik süreci glikolizden yağ asidi oksidasyonuna kaydırması ve glikolize bağımlı glioblastoma hücrelerinin zayıf metabolik noktalarından yaklaşmak üzerine kurulmuştur. 25 uM fenofibrat uygulanan glioblastoma hücrelerinde proliferasyon inhibisyonu gözlenirken 50 uM fenofibrat uygulanan grupta ciddi bir apoptoz gözlenmiştir. Apoptotik etkinin de FOXO3a'nın nükleer birikimi ve tetiklenen Bim aktivasyonu üzerinden gerçekleştiği saptanmıştır. FOXO3a'nın siRNA ile inhibisyonunda fenofibrat kaynaklı apoptoz etkisinin zayıflamasına istinaden FOXO3a'nın glioblastomalara karşı fenofibrat etki ettiği yolda rolü

olduğu desteklenerek ortaya konmuştur (94). Glioblastoma tedavisinde yaygın kullanılan kemoterapötik Temozolomid (TMZ) direnci hücrelerde FOXO3a azlığı ile ilişkilendirilmiştir. FOXO3a'nın ekspresyonundaki azalma istilacı hücre davranışını ve metastaz kabiliyetini artırdığı gösterilmiştir (117). Biz de U87-MG ve T98-G insan glioblastoma hücre hatlarında MOLE'nin FOXO3a immunoreaktivitesini artırdığını saptadık. Biz de U87-MG e T98-G insan glioblastoma hücre hatlarında MOLE'nin FOXO3a immunoreaktivitesini artırdığını saptadık.

Moringa oleifera birçok kanser türü için etkinliği araştırılmış, ulaşımı ve yetiştirilmesi loay bir bitki olarak önemlidir. Pankreas adenokarsinomu hücre hatları Panc-1 ve COLO 357 üzerinde yapılan bir çalışmada *Moringa oleifera* özütünün hücre döngüsünü G1'de durdurduğu, hücre proliferasyonunu anlamlı düzeyde azalttığı, yaygın kullanılan kemoterapötik ajanlardan sisplatinin etkinliğini ve sitotoksik aktivitesini artırdığı saptanmıştır. Bu özelliğiyle mevcut kemoterapötik tedaviye destek niteliğinde bitkisel tedavi ajanı olarak kullanılabileceği önerilmiştir (107). İnsan servikal kanser hücre hatları olan HeLa üzerinde 2014 yılında Vasanth ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Moringa oleifera* kök kabuğu ekstresi ile hazırlanan gümüş nitrat nanopartiküllerinin HeLa üzerindeki hücre proliferasyonunu azaltıcı, reaktif oksijen radikali oluşumunu azaltıcı ve apoptoz indükleyici etkileri ortaya konmuştur (118).

2021 yılında Sahrudin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada pankreas kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapötik gemsitabinin *Moringa oleifera*'nın bazı biyoaktif bileşenleri ile öngörüldüğünü göstermişlerdir. Tümörögenizde AKT1, TP53, VEGFA gibi hedef proteinlerin artışı ve kaspaz 3, Bcl-2 ailesi üyeleri aracılığıyla apoptotik yollarla ilişki keşfedilmiştir. Sahrudin ve arkadaşları pankreas kanseri tedavisinde Gemsitabin ile ortak etki mekanizmalarına sahip olması nedeniyle *Moringa oleifera* ile kombine tedavi olarak önermişlerdir (119). Biz de çalışmamızda MOLE uygulanan U87-MG ve T98-G insan glioblastoma hücre hatlarında deney gruplarında hücre hatlarının koloni oluşturma potansiyellerinin azalttığını ve apoptozu artırdığını immunositokimyasal analiz ile gösterdik.

Bitkisel ajanlar hem kolay ulařılabilirlik hem de daha az yan etki potansiyelleri ile mevcut kemoterapi protokollerine destek olarak dűřünűlműő alternatiflerdir. Diab ve arkadaşları 2015 yılında 9 farklı kanser hücre hattında aralarında *Moringa oleifera* ekstresinin de bulunduđu bitkilerin etkilerinin incelendiđi bir çalıřmalarında bitki ekstrelerinin hücre dűngűsűnű G0/G1 geçiřini bloke ederek ve agaroz jel elektroforezde nekroz benzeri yayılım paterni oluřturdukları gözlemlenmiřlerdir ayrıca bazı diđer bitki ekstrelerinden özellikle hücre canlılıđını konsantrasyon bađımlı olarak ciddi etkileyen potansiyellerinden bahsedilmiřtir (120).

Her ne kadar bitkisel tedavi ajanlarının destek tedavi olarak kanserde kullanımını artsa da ilaç ile zehir arasındaki çizgi oldukça incedir. Klinik kullanıma girebilmesi için prospektif geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca *Moringa oleifera*'nın kullanımının sitotoksik tedaviler açısından bitkisel tedavi pazarındaki yeri artmaktadır. 2020 Mart ayında yayınlanan bir çalışmada *Moringa oleifera* içeren besin takviyelerinin kullanımını artan besin takviyeleri arasında űne geçtiği ifade edilmiştir. Hatta beklenen kűresel pazardaki yerinin 2026 yılında 8400 milyon dolara ulaşabileceği űngörűlműőtür (121).

6. SONUÇ

Glioblastoma artan sıklığı ve yüksek mortalitesi ile yeni ve destek tedavi arayışlarının ilgi odağı olmuştur. Çalışmamızda glioblastoma patogeneğinde rol alan AKT/FOX3a/Bim yolağı üzerinde *Moringa Oleifera*'nın etkisini incelendi. MOLE uygulanan deney gruplarında AKT azalışı, FOXO3a ve Bim artışını immunositokimyasal analizler ile gösterildi. İmmunositokimyasal boyamanın Image j yazılımı ile optik dansite karşılaştırmasında MOLE uygulanan deney gruplarında AKT azalışı, FOXO3a ve Bim artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Ayrıca deney gruplarında koloni oluşum yüzdelerindeki azalma da istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Sonuç olarak *Moringa oleifera* birçok diğer kanser türü için olduğu gibi glioblastoma için de AKT/FOXO3a/Bim yolağı üzerinden apoptoz mekanizmalarını tetiklediği gösterildi.

Bu çalışmamız U87-MG ve T98-G hücre hatlarında MOLE'nin apoptoz indükleyici etkisinin gösterilmesi ile glioblastoma tedavisine ışık tutacağı kanatındeyiz. Çalışmamıza ek olarak AKT, FOXO3a ve Bim ekspresyonlarının Western Blot, qRT-PCR gibi analizlerle MOLE'nin etkinliği protein ve m RNA düzeylerinde de gösterilerek desteklenebilir.

Her ne kadar çalışmamızda MOLE'nin glioblastomda apoptozu indüklediğini göstersek de deneylerimiz in vitro ortamda gerçekleştirilmiştir. MOLE'nin bu etkinliğinin in vivo şartlarda hayvan deneyleri ve sonrasında prospektif klinik çalışmalarla desteklenmesi faydalı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. KESKINKILIÇ, Bekir, et al. Türkiye kanser istatistikleri. TC Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2017.
2. OSTROM, Quinn T., et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro-oncology*, 2018, 20.suppl_4: iv1-iv86.
3. PARK, Jeong Hyun, et al. Breast cancer epidemiology of the working-Age female population reveals significant implications for the south korean economy. *Journal of breast cancer*, 2018, 21.1: 91-95.
4. GUAN, Xiangming. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta pharmaceutica sinica B*, 2015, 5.5: 402-418.
5. OSTROM, Quinn T., et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-oncology*, 2015, 17.suppl_4: iv1-iv62.
6. IRONSIDE, W. J., et al. Diagnostic pathology of nervous system tumours. 2004.
7. IACOB, Gabriel; DINCA, Eduard B. Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *Journal of medicine and life*, 2009, 2.4: 386.
8. WEN, Patrick Y.; PACKER, Roger J. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: clinical implications. *Neuro-oncology*, 2021, 23.8: 1215-1217.
9. DESOUZA, R. M., et al. Has the survival of patients with glioblastoma changed over the years?. *British journal of cancer*, 2016, 114.2: 146-150.
10. OZDUMAN, Koray, et al. Surgical Outcome of Adult Hemispheric Glioblastoma is Determined by the Molecular-Subset: An Analysis of 142 Patients. In: *JOURNAL OF NEUROSURGERY*. 5550 MEADOWBROOK DRIVE, ROLLING MEADOWS, IL 60008 USA: AMER ASSOC NEUROLOGICAL SURGEONS, 2017. p. A1419-A1419.

11. QIAN, Zhongrun, et al. Overexpression of FoxO3a is associated with glioblastoma progression and predicts poor patient prognosis. *International journal of cancer*, 2017, 140.12: 2792-2804.
12. SAMBA, Ebrahim. WHO issues guidelines for herbal medicines. *Bulletin of the World Health Organization*, 2004, 82.3.
13. MALLENAKUPPE, Ramachandraiah, et al. History, Taxonomy and Propagation of *Moringa oleifera*-A Review. *crops*, 2015, 3.3.28: 3.15.
14. MURAKAMI, Akira, et al. Niaziminin, a thiocarbamate from the leaves of *Moringa oleifera*, holds a strict structural requirement for inhibition of tumor-promoter-induced Epstein-Barr virus activation. *Planta Medica*, 1998, 64.04: 319-323.
15. LIPIPUN, Vimolmas, et al. Efficacy of Thai medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 1 infection in vitro and in vivo. *Antiviral research*, 2003, 60.3: 175-180.
16. WAIYAPUT, Wanwisa, et al. Inhibitory effects of crude extracts from some edible Thai plants against replication of hepatitis B virus and human liver cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 2012, 12.1: 1-7.
17. KUMAR, Vikash, et al. Antibacterial & antioxidant activity of different extract of *Moringa oleifera* Leaves—an in vitro study. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2012, 12.1: 89-94.
18. BHARALI, Rupjyoti; TABASSUM, Jawahira; AZAD, Mohammed Rekibul Haque. Chemomodulatory effect of *Moringa oleifera*, Lam, on hepatic carcinogen metabolising enzymes, antioxidant parameters and skin papillomagenesis in mice. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2003, 4.2: 131-140.
19. IQBAL, Shahid; BHANGER, M. I. Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. *Journal of food Composition and Analysis*, 2006, 19.6-7: 544-551.
20. CHUMARK, Pilaipark, et al. The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Journal of ethnopharmacology*, 2008, 116.3: 439-446.

21. KUMAR GUPTA, Suresh, et al. Retinoprotective effects of *Moringa oleifera* via antioxidant, anti-inflammatory, and anti-angiogenic mechanisms in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 2013, 29.4: 419-426.
22. MIYOSHI, Noriyuki, et al. Benzyl isothiocyanate inhibits excessive superoxide generation in inflammatory leukocytes: implication for prevention against inflammation-related carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2004, 25.4: 567-575.
23. FAIZI, Shaheen, et al. Isolation and structure elucidation of new nitrile and mustard oil glycosides from *Moringa oleifera* and their effect on blood pressure. *Journal of Natural Products*, 1994, 57.9: 1256-1261.
24. KHALAFALLA, Mutasim M., et al. Active principle from *Moringa oleifera* Lam leaves effective against two leukemias and a hepatocarcinoma. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9.49: 8467-8471.
25. BRUNELLI, Dario, et al. The isothiocyanate produced from glucomoringin inhibits NF- κ B and reduces myeloma growth in nude mice in vivo. *Biochemical pharmacology*, 2010, 79.8: 1141-1148.
26. BUDDA, Sirintip, et al. Suppressive effects of *Moringa oleifera* Lam pod against mouse colon carcinogenesis induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011, 12.12: 3221-3228.
27. SHARMA, Gunjan, et al. 18 β -glycyrrhetic acid induces apoptosis through modulation of Akt/FOXO3a/Bim pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Journal of cellular physiology*, 2012, 227.5: 1923-1931.
28. ROSS, Michael H.; PAWLINA, Wojciech. *Histology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
29. MESCHER, Anthony L. *Junqueira's basic histology: text and atlas*. 13th ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2013.
30. SADLER, Thomas W. *Langman's medical embryology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2018.

31. MOORE, Keith L.; PERSAUD, Trivedi Vidhya Nandan; TORCHIA, Mark G. The developing human-e-book: clinically oriented embryology. Elsevier Health Sciences, 2018..
32. GARTNER, Leslie P. BRS cell biology and histology. Lippincott Williams & Wilkins, 2018.
33. EROSCHENKO, Victor P.; DI FIORE, Mariano SH. DiFiore's atlas of histology with functional correlations. Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
34. SUNG, Hyuna, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians, 2021, 71.3: 209-249.
35. BILIR, N. Cancer frequency in Turkey. Kanser, Scientific Organ of the Turkish Assoc. for Cancer Research and Control, 1981, 11: 93-97.
36. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, et al. Cancer occurrence in developing countries. In: Cancer occurrence in developing countries. 1986. p. 339-339.
37. SARICA, Feyzi Birol, et al. Yeni Tanı Almış Glioblastoma Hastalarında Temozolomid ile Yapılan Konkomitan Terapi ve Nüks Glioblastoma Olgularında Uygulanan Bevacizumab ve İrinotecan Antianjiyojenik Kombinasyon Terapisi Etkinliği: 10 Yıllık Tedavi Sonuçları. Türk Nöroşirürji Dergisi, 2015, 1: 19-30.
38. SCHANKIN, C. J., et al. Characteristics of brain tumour-associated headache. Cephalalgia, 2007, 27.8: 904-911.
39. FORSYTH, Peter A.; POSNER, Jerome B. Headaches in patients with brain tumors: a study of 111 patients. Neurology, 1993, 43.9: 1678-1678.
40. RULSEH, Aaron Michael, et al. Long-term survival of patients suffering from glioblastoma multiforme treated with tumor-treating fields. World journal of surgical oncology, 2012, 10.1: 1-6.
41. JACOBS, Andreas H., et al. Imaging in neurooncology. NeuroRx, 2005, 2.2: 333-347.

42. STUPP, R., et al. High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*, 2010, 21: v190-v193.
43. LEE, Sang Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & diseases*, 2016, 3.3: 198-210.
44. FRUEHAUF, John P., et al. In vitro drug response and molecular markers associated with drug resistance in malignant gliomas. *Clinical Cancer Research*, 2006, 12.15: 4523-4532.
45. FRIEDMAN, Henry S., et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *Journal of clinical oncology*, 2009, 27.28: 4733-4740.
46. LEE, Sze Xian, et al. Mitosis interference of cancer cells during anaphase by electric field from NovoTTF-100A: An update. 2012.
47. LOUIS, David N., et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta neuropathologica*, 2016, 131.6: 803-820.
48. ROUSSEAU, Audrey; MOKHTARI, Karima; DUYCKAERTS, Charles. The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system—what has changed?. *Current opinion in neurology*, 2008, 21.6: 720-727..
49. LOUIS, David N., et al. International Society of Neuropathology-Haarlem Consensus Guidelines for Nervous System Tumor Classification and Grading. *Brain pathology*, 2014, 24.5: 429-435.
50. WESSELING, Pieter; CAPPER, D. W. H. O. WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathology and applied neurobiology*, 2018, 44.2: 139-150.
51. LOUIS, David N., et al. cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. 2020.
52. LOUIS, David N., et al. cIMPACT-NOW update 1: not otherwise specified (NOS) and not elsewhere classified (NEC). *Acta neuropathologica*, 2018, 135.3: 481-484.

53. BRAT, Daniel J., et al. cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for “Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV”. *Acta neuropathologica*, 2018, 136.5: 805-810.
54. ELLISON, David W., et al. cIMPACT-NOW update 4: diffuse gliomas characterized by MYB, MYBL1, or FGFR1 alterations or BRAF V600E mutation. *Acta neuropathologica*, 2019, 137.4: 683-687.
55. BRAT, Daniel J., et al. cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. *Acta neuropathologica*, 2020, 139.3: 603-608.
56. ELLISON, David W., et al. cIMPACT-NOW update 7: Advancing the molecular classification of ependymal tumors. *Brain Pathology*, 2020, 30.5: 863-866.
57. LOUIS, David N., et al. cIMPACT-NOW update 2: diagnostic clarifications for diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant and diffuse astrocytoma/anaplastic astrocytoma, IDH-mutant. *Acta neuropathologica*, 2018, 135.4: 639-642.
58. MELLAI, Marta, et al. Diagnostic revision of 206 adult gliomas (including 40 oligoastrocytomas) based on ATRX, IDH1/2 and 1p/19q status. *Journal of neuro-oncology*, 2017, 131.2: 213-222.
59. CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive, integrative genomic analysis of diffuse lower-grade gliomas. *New England Journal of Medicine*, 2015, 372.26: 2481-2498.
60. KLEIHUES, Paul, et al. WHO classification of tumours. Pathology & genetics. Tumors of the nervous system. Lyon, France: IARCpress, 2000.
61. KRAKSTAD, Camilla; CHEKENYA, Martha. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Molecular cancer*, 2010, 9.1: 1-14..
62. OSTROM, Quinn T., et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2014–2018. *Neuro-oncology*, 2021, 23.Supplement_3: iii1-iii105.
63. LAM, Eric W.-F., et al. Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony. *Nature Reviews Cancer*, 2013, 13.7: 482-495.

64. HÄCKER, U., et al. Developmentally regulated Drosophila gene family encoding the fork head domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89.18: 8754-8758.
65. JIRAMONGKOL, Yannasittha; LAM, Eric W.-F. FOXO transcription factor family in cancer and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2020, 39.3: 681-709.
66. CARTER, Matthew E.; BRUNET, Anne. FOXO transcription factors. *Current Biology*, 2007, 17.4: R113-R114.
67. BHAGWAT, Anand S.; VAKOC, Christopher R. Targeting transcription factors in cancer. *Trends in cancer*, 2015, 1.1: 53-65.
68. PUIG, Oscar; MATTILA, Jaakko. Understanding Forkhead box class O function: lessons from *Drosophila melanogaster*. *Antioxidants & redox signaling*, 2011, 14.4: 635-647.
69. IWAFUCHI-DOI, Makiko; ZARET, Kenneth S. Cell fate control by pioneer transcription factors. *Development*, 2016, 143.11: 1833-1837.
70. DONG, Tianxiu, et al. FOXO1 inhibits the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by reversing ZEB2-induced epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget*, 2017, 8.1: 1703.
71. LIU, Ying, et al. Critical role of FOXO3a in carcinogenesis. *Molecular cancer*, 2018, 17.1: 1-12.
72. WEN, Patrick Y., et al. Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. *Neuro-oncology*, 2020, 22.8: 1073-1113.
73. DANYELİ, Ayça. Santral Sinir Sistemi Tümörlerinin Sınıflaması Geçmişten Güncele. *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 2019, 29.3: 217-225.
74. DANG, Lenny, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, 2009, 462.7274: 739-744.

75. KOIVUNEN, Peppi, et al. Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature*, 2012, 483.7390: 484-488.
76. CHARITOU, Paraskevi, et al. FOXO s support the metabolic requirements of normal and tumor cells by promoting IDH 1 expression. *EMBO reports*, 2015, 16.4: 456-466.
77. KILLELA, Patrick J., et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110.15: 6021-6026.
78. ABEDALTHAGAFI, Malak, et al. The alternative lengthening of telomere phenotype is significantly associated with loss of ATRX expression in high-grade pediatric and adult astrocytomas: a multi-institutional study of 214 astrocytomas. *Modern Pathology*, 2013, 26.11: 1425-1432.
79. LOPEZ-GINES, Concha, et al. New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Modern Pathology*, 2010, 23.6: 856-865..
80. WIJNENGA, Maarten MJ, et al. Molecular and clinical heterogeneity of adult diffuse low-grade IDH wild-type gliomas: assessment of TERT promoter mutation and chromosome 7 and 10 copy number status allows superior prognostic stratification. *Acta neuropathologica*, 2017, 134.6: 957-959..
81. SCHMITT-NEY, Michel. The FOXO's advantages of being a family: considerations on function and evolution. *Cells*, 2020, 9.3: 787.
82. JANKU, Filip; YAP, Timothy A.; MERIC-BERNSTAM, Funda. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway?. *Nature reviews Clinical oncology*, 2018, 15.5: 273-291.
83. BRUNET, Anne, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *cell*, 1999, 96.6: 857-868.
84. HARADA, Hisashi; GRANT, Steven. Targeting the regulatory machinery of BIM for cancer therapy. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 2012, 22.2.

85. BROWN, Abigail K.; WEBB, Ashley E. Regulation of FOXO factors in mammalian cells. *Current topics in developmental biology*, 2018, 127: 165-192.
86. LINSEMAN, Daniel A., et al. Insulin-like growth factor-I blocks Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bim) induction and intrinsic death signaling in cerebellar granule neurons. *Journal of Neuroscience*, 2002, 22.21: 9287-9297.
87. CIECHOMSKA, Iwona Anna, et al. EGFR/FOXO3a/BIM signaling pathway determines chemosensitivity of BMP4-differentiated glioma stem cells to temozolomide. *Experimental & molecular medicine*, 2020, 52.8: 1326-1340.
88. AMBROS, Victor. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004, 431.7006: 350-355.
89. LU, Ming, et al. MicroRNA-370 suppresses the progression and proliferation of human astrocytoma and glioblastoma by negatively regulating β -catenin and causing activation of FOXO3a. *Experimental and therapeutic medicine*, 2018, 15.1: 1093-1098.
90. LI, Jun, et al. Clinical significance of sphingosine kinase-1 expression in human astrocytomas progression and overall patient survival. *Clinical Cancer Research*, 2008, 14.21: 6996-7003.
91. VAN BROCKLYN, James R., et al. Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2005, 64.8: 695-705.
92. GUAN, Hongyu, et al. Sphingosine kinase 1 regulates the Akt/FOXO3a/Bim pathway and contributes to apoptosis resistance in glioma cells. *PloS one*, 2011, 6.5: e19946.
93. SUN, Fei, et al. Caffeine-induced nuclear translocation of FoxO1 triggers Bim-mediated apoptosis in human glioblastoma cells. *Tumor Biology*, 2016, 37.3: 3417-3423.
94. WILK, Anna, et al. Fenofibrate-induced nuclear translocation of FoxO3A triggers Bim-mediated apoptosis in glioblastoma cells in vitro. *Cell cycle*, 2012, 11.14: 2660-2671.

95. QUAN, Kai, et al. Icariside II induces cell cycle arrest and apoptosis in human glioblastoma cells through suppressing Akt activation and potentiating FOXO3a activity. *American journal of translational research*, 2017, 9.5: 2508.
96. TOPÇU, Gülaçtı. *Tıbbi Bitkilerden İlaça Giden Yol*. 2013.
97. Sezgin CJBT. *Kanserde bitkilerle tedavide örnek uygulamalar*. 2010:73.
98. NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 2012, 75.3: 311-335.
99. NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 2020, 83.3: 770-803.
100. GÜRÜN, Mine Sibel. **BİTKİSEL ÜRÜNLERİN KULLANIMINDA ARKA PLAN.**
101. TUNÇEL, MUSTAFA ORHAN. *Haplophyllum ptilostylum bitkisinin anti kanser özelliğinin incelenmesi/Investigation of anti cancer properties of Haplophyllum ptilostylum plant*. 2019. PhD Thesis.
102. CHANG, Cunjie, et al. Pao pereira extract suppresses castration-resistant prostate cancer cell growth, survival, and invasion through inhibition of NFκB signaling. *Integrative Cancer Therapies*, 2014, 13.3: 249-258.
103. UDIKALA, Mownica, et al. Phytonutrient and pharmacological significance of *Moringa oleifera*. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research*, 2017, 3.5: 1387-1391.
104. AWODELE, Olufunsho, et al. Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* Lam.(Moringaceae). *Journal of ethnopharmacology*, 2012, 139.2: 330-336.
105. NAPOLEÃO, Thiago H., et al. *Moringa oleifera*: a powerful source of environmentally, medicinally and biotechnologically relevant compounds. *Advances in Applied Science and Technology*, 2019, 5: 58-77.

106. MOYO, Busani, et al. Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10.60: 12925-12933.
107. BERKOVICH, Liron, et al. Moringa Oleifera aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor-kappaB and increases cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 2013, 13.1: 1-7..
108. ZHU, Liangming, et al. Sphingosine kinase 1 enhances the invasion and migration of non-small cell lung cancer cells via the AKT pathway. *Oncology reports*, 2015, 33.3: 1257-1263.
109. LIU, Zhenxing, et al. Piperlongumine-induced nuclear translocation of the FOXO3A transcription factor triggers BIM-mediated apoptosis in cancer cells. *Biochemical pharmacology*, 2019, 163: 101-110.
110. QIAN, Cheng; LIU, Qiang. FOXO3a inhibits nephroblastoma cell proliferation, migration and invasion, and induces apoptosis through downregulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, 2021, 24.5: 1-10.
111. LEE, Jae Chul, et al. Auraptene induces apoptosis via myeloid cell leukemia 1-mediated activation of caspases in PC3 and DU145 prostate cancer cells. *Phytotherapy Research*, 2017, 31.6: 891-898.
112. OCK, Chae Won; KIM, Gi Dae. Harmine Hydrochloride Mediates the Induction of G2/M Cell Cycle Arrest in Breast Cancer Cells by Regulating the MAPKs and AKT/FOXO3a Signaling Pathways. *Molecules*, 2021, 26.21: 6714.
113. HU, Mickey C.-T., et al. I κ B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell*, 2004, 117.2: 225-237.
114. ALQAHTANI, Wedad S.; ALBASHER, Gadah. Moringa oleifera Lam. extract rescues lead-induced oxidative stress, inflammation, and apoptosis in the rat cerebral cortex. *Journal of Food Biochemistry*, 2021, 45.1: e13579.
115. SONG, Junke, et al. Inhibition of FOXO3a/BIM signaling pathway contributes to the protective effect of salvianolic acid A against cerebral ischemia/reperfusion injury. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2019, 9.3: 505-515.

116. LIU, Hao, et al. FOXO3a mediates the cytotoxic effects of cisplatin in lung cancer cells. *Anti-cancer drugs*, 2014, 25.8: 898-907.
117. XU, Ke, et al. FoxO3a induces temozolomide resistance in glioblastoma cells via the regulation of β -catenin nuclear accumulation. *Oncology reports*, 2017, 37.4: 2391-2397..
118. VASANTH, Karunamoorthy, et al. Anticancer activity of Moringa oleifera mediated silver nanoparticles on human cervical carcinoma cells by apoptosis induction. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 2014, 117: 354-359.
119. SAHRUDDIN, Nursaffa Alisya, et al. Integrative Network Pharmacology of Moringa oleifera Combined with Gemcitabine against Pancreatic Cancer. *Processes*, 2021, 9.10: 1742.
120. DIAB, Kawthar AE, et al. In vitro anticancer activities of Anogeissus latifolia, Terminalia bellerica, Acacia catechu and Moringa oleifera Indian plants. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2015, 16.15: 6423-6428.
121. ZUNICA, Elizabeth RM, et al. Moringa Oleifera Seed Extract Concomitantly Supplemented with Chemotherapy Worsens Tumor Progression in Mice with Triple Negative Breast Cancer and Obesity. *Nutrients*, 2021, 13.9: 2923.