

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SELENYUMUN İNSAN GLİOBLASTOMA  
MULTİFORME HÜCRE HATLARINDA *İN*  
*VİTRO* ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DUYGU HARMANCI

MOLEKÜLER TIP  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2013

**TEZ KODU:** DEU.HSI.Msc-2009970125

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SELENYUMUN İNSAN GLİOBLASTOMA  
MULTİFORME HÜCRE HATLARINDA  
*İN VİTRO* ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DUYGU HARMANCI

MOLEKÜLER TIP

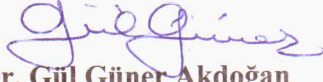
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Gül Güner AKDOĞAN

Bu araştırma BAP tarafından 2011.KB:SAG.024 proje numarasıyla desteklenmiştir.


**TEZ KODU:** DEU.HSI.Msc-2009970125

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı öğrencisi Duygu Harmancı "SELENYUMUN İNSAN GLİOBLASTOMA MULTİFORME HÜCRE HATLARINDA İN VİTRO ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI" konulu Yüksek Lisans tezini 10.01.2013 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



**Prof. Dr. Gül Güner Akdoğan**

**BAŞKAN**



**Doç.Dr. Hilal Koçdor**

**ÜYE**



**Yard.Doç.Dr. Rüksan Çehreli**

**ÜYE**

**Yard. Doç.Dr. Zahide Çavdar**

**YEDEK ÜYE**

**Yard. Doç.Dr. Nilgün Yener**

**YEDEK ÜYE**

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER.....	i
TABLolar DİZİNİ.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR.....	v
TEŞEKKÜR.....	x
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>5</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>7</b>
2.1.Selenyum .....	7
2.1.1. Keşfi ve Tarihçesi. ....	7
2.1.2. Biyokimyası.....	7
2.1.3. Metabolizması.....	9
2.1.4. Selenyum ve Hücre Sinyal Mekanizmaları.....	11
2.1.5. Selenyum ve Kanser.....	13
2.1.6. Selenyum Eksikliği.....	18
2.1.7. Selenyum Toksisitesi.....	19
2.1.8. Selenyum Ölçüm Yöntemleri.....	19
2.2. Glioblastoma Multiforme.....	20
2.2.1. Epidemiyolojik Özellikleri.....	20
2.2.2. Patolojik Özellikleri.....	20
2.2.3. Proliferasyon ve Glioblastoma Multiforme.....	23
2.2.4. Klinik Göstergeler ve Tanı.....	23
2.2.5. Konvansiyonel Tedavi.....	23
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>25</b>
3.1. Araştırmanın Tipi. ....	25
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	25
3.3. Çalışma Materyali.....	25
3.4. Çalışmanın Değişkenleri.....	25
3.5. Veri toplama Araçları.....	25

3.5.1. Hücre Kültürü.....	25
3.5.2. <i>In vitro</i> deneyler.....	28
3.5.3. Selenyum Düzeyinin GFAAS ile Değerlendirilmesi...	30
3.5.4. Hücre Canlılık Testi (WST-1 Testi) .....	31
3.5.5. Hücre Sitotoksosite Testi (LDH Testi) .....	32
3.5.6. Western Blot Analizi.....	33
3.5.6.1. Protein Ölçümü.....	34
3.5.6.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) Jelinin Hazırlanması. ....	36
3.5.6.3. Örnek Hazırlanması. ....	37
3.5.6.4. Jelin Yüklenmesi.....	37
3.5.6.5. Elektroforetik Yürütme. ....	38
3.5.6.6. Proteinlerin Membrana Transferi.....	38
3.5.6.7. Bloklama.....	38
3.5.6.8. Primer Antikor İle İnkübasyon.....	39
3.5.6.9. Sekonder Antikor İle İnkübasyon.....	39
3.5.6.10. Görüntüleme.....	39
3.6. Araştırma Takvimi.....	41
3.7. Verilerin Değerlendirilmesi.....	41
3.8. Araştırmanın sınırlılıkları.....	41
3.9. Etik Kurul Onayı.....	41
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>42</b>
4.1. Seleno-L-metiyonin uygulaması ile hücre içine alınan selenyum düzeylerinin belirlenmesi .....	42
4.2. Seleno-L-metiyonin uygulaması ile süpernatantlardaki selenyum düzeylerinin belirlenmesi .....	45
4.3. Seleno-L-metiyonin uygulanması ile proliferasyon-doza eğrisinin WST-1 yöntemi ile değerlendirilmesi. ....	48
4.4. Seleno-L-metiyonin uygulanması ile LDH salınımının LDH yöntemi ile değerlendirilmesi .....	56
4.5. SDS-PAGE ve Western Blot ile Ki-67 Protein Düzeylerinin Belirlenmesi.....	63

4.5.1. Kontrol ve Deney Gruplarındaki Protein Düzeyleri.....	63
4.5.2. Kontrol ve Deney Gruplarında Ki-67 Protein Ekspresyonunun Western Blot ile Gösterilmesi.....	65
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>67</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>73</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>76</b>
<b>8. EKLER.....</b>	<b>88</b>
EK-1 Etik Kurul Onayı	

## TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1 : Selenyumun Oksidasyon Durumları ve Selenyum Bileşiklerine Örnekler.....	7
Tablo 2 : Selenoproteinler.....	9
Tablo 3 : Selenyum'un Kanserle İlişkisinin Araştırıldığı Çalışmalar.....	15
Tablo 4 : Selenyum Araştırmalarında Kullanılan Hücre Hatları.....	17
Tablo 5 : GFAAS Analitik Koşulları.....	30
Tablo 6 : GFAAS Sıcaklık Programı.....	31
Tablo 7 : Hücre lizis tampon içeriği.....	34
Tablo 8 : BSA standartlarının Hazırlanması .....	35
Tablo 9 : SDS-PAGE yönteminde ayırıcı jelin (%6) hazırlanması.....	37
Tablo 10 : SDS-PAGE yönteminde pakitleyici jelin (%4) hazırlanması.....	37
Tablo 11 : Araştırmada kullanılan mevcut cihaz listesi .....	40
Tablo 12 : SeMet ile inkübasyon sonucu GMS-10 hücreleri tarafından hücre içine alınan selenyum düzeyleri.....	42
Tablo 13 : SeMet ile inkübasyon sonucu DBTRG-05MG hücreleri tarafından hücre içine alınan selenyum düzeyleri .....	42
Tablo 14 : SeMet ile inkübasyon sonucu GMS-10 hücreleri tarafından hücre içine alınan selenyum düzeylerinin "p" değerleri .....	43
Tablo 15 : SeMet ile inkübasyon sonucu DBTRG-05MG hücreleri tarafından hücre içine alınan selenyum düzeylerinin "p" değerleri.....	43
Tablo 16 : SeMet ile inkübasyon sonucu GMS-10 hücrelerine ait süpernatantlardaki selenyum düzeylerinin konsantrasyon bulguları. ....	45
Tablo 17 : SeMet ile inkübasyon sonucu DBTRG-05MG hücrelerine ait süpernatantlardaki selenyum düzeylerinin konsantrasyon bulguları .....	45
Tablo 18 : SeMet ile inkübasyon sonucu GMS-10 hücrelerinin süpernatantlarındaki selenyum düzeylerine ait "p" değerleri.....	46
Tablo 19 : SeMet ile inkübe edilen DBTRG-05MG hücrelerinin süpernatantlarındaki selenyum düzeylerine ait "p" değerleri.....	46
Tablo 20 : SeMet'in DBTRG-05MG hücrelerine etkisinin % proliferasyon bulguları.....	48

Tablo 21 :	SeMet'in GMS-10 hücrelerine etkisinin % proliferasyon bulguları .....	48
Tablo 22 :	SeMet'in GMS-10 hücrelerine etkisinin kontrole göre "p" değerleri.....	49
Tablo 23 :	SeMet'in DBTRG-05MG hücrelerine etkisinin kontrole göre "p" değerleri .....	49
Tablo 24 :	GMS-10 ve DBTRG-05MG Hücrelerine ait IC50 değerleri.....	55
Tablo 25 :	SeMet uygulanması sonrasında DBTRG-05MG hücrelerinde % sitotoksosite bulguları. ....	56
Tablo 26 :	SeMet uygulanması sonrasında GMS-10 hücrelerinde % sitotoksosite bulguları	56
Tablo 27 :	GMS-10 hücrelerine değişik dozlarda SeMet uygulaması sonrasında elde edilen sitotoksosite bulgularının kontrol ile kıyaslanması ile bulunan "p" değerleri .....	57
Tablo 28 :	DBTRG-05MG hücrelerine değişik dozlarda SeMet uygulaması sonrasında elde edilen sitotoksosite bulgularının kontrol ile kıyaslanması ile bulunan "p" değerleri. ....	57
Tablo 29 :	SeMet'in GMS-10 ve DBTRG-05MG hücrelerine proliferatif etkisi ve hücre içine giren Se düzeyleri arasındaki korelasyon bulguları .....	62
Tablo 30 :	SeMet'in GMS-10 ve DBTRG-05MG hücrelerine sitotoksik etkisi ve hücre içine giren Se düzeyleri arasındaki korelasyon bulguları .....	63
Tablo 31 :	SeMet'in GMS-10 ve DBTRG-05MG hücrelerine proliferatif ve sitotoksik etkisinin korelasyon bulguları .....	63
Tablo 32 :	GMS-10 hücre hattı için kontrol grubu ve deney gruplarında hücre lizatı ortalama protein düzeyleri ( $\mu\text{g/ml}$ ) .....	64
Tablo 33 :	DBTRG-05MG hücre hattı için kontrol grubu ve deney gruplarında hücre lizatı ortalama protein düzeyleri ( $\mu\text{g/ml}$ ) .....	64

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1 : Memelilerde Selenosistein Biyosentezi.....	8
Şekil 2 : Selenyum Absorpsiyonu, Metabolizması ve Yıkımı.....	10
Şekil 3 : Gliomagenesis Süreci.....	22
Şekil 4 : Deney Akış Şeması.....	29
Şekil 5 : GMS-10 hücrelerinde zamanla hücre içine alınan Se düzeyi.....	44
Şekil 6 : DBTRG-05MG hücrelerinde zamanla hücre içine alınan Se düzeyi .....	44
Şekil 7 : GMS-10 hücreleri süpernatantlarındaki Se düzeyi .....	47
Şekil 8 : DBTRG-05MG hücreleri süpernatantlarındaki Se düzeyi .....	47
Şekil 9 : SeMet'in DBTRG-05MG Hücre Hattına 24 saat inkübasyon sonucu WST-1 testi bulguları.....	50
Şekil 10 : SeMet'in GMS-10 Hücre Hattına 24 saat inkübasyon sonucu WST-1 testi bulguları .....	50
Şekil 11 : SeMet'in DBTRG-05MG Hücre Hattına 48 saat inkübasyon sonucu WST-1 testi bulguları.....	51
Şekil 12 : SeMet'in GMS-10 Hücre Hattına 48 saat inkübasyon sonucu WST-1 testi bulguları.....	52
Şekil 13 : SeMet'in DBTRG-05MG Hücre Hattına 72 saat inkübasyon sonucu WST-1 testi bulguları .....	52
Şekil 14 : SeMet'in GMS-10 Hücre Hattına 72 saat inkübasyon sonucu WST-1 testi bulguları.....	53
Şekil 15 : SeMet'in GMS-10 Hücre Hattına 24-48-72 saat inkübasyon sonucu WST- 1 testi bulgularının dağılım grafiği.....	54
Şekil 16 : SeMet'in DBTRG-05MG Hücre Hattına 24-48-72 saat inkübasyon sonucu WST-1 testi bulgularının dağılım grafiği.....	54
Şekil 17 : WST-1 testi temsili plak görüntüsü.....	55
Şekil 18 : GMS-10 hücrelerine değişik dozlarda 24 saat uygulanan SeMet sonrasında elde edilen sitotoksiste bulguları.....	58
Şekil 19 : DBTRG-05MG hücrelerine değişik dozlarda 24 saat uygulanan SeMet sonrasında elde edilen sitotoksiste bulguları.....	58
Şekil 20 : GMS-10 hücrelerine değişik dozlarda 48 saat uygulanan SeMet	

	sonrasında elde edilen sitotoksisite bulguları .....	59
Şekil 21 :	DBTRG-05MG hücrelerine değişik dozlarda 48 saat uygulanan SeMet sonrasında elde edilen sitotoksisite bulguları .....	60
Şekil 22 :	GMS-10 hücrelerine değişik dozlarda 72 saat uygulanan SeMet sonrasında elde edilen sitotoksisite bulguları .....	61
Şekil 23 :	DBTRG-05MG hücrelerine değişik dozlarda 72 saat uygulanan SeMet sonrasında elde edilen sitotoksisite bulguları.....	61
Şekil 24 :	LDH Testi denemelerine ait temsili plak görüntüsü.....	62
Şekil 25 :	BSA standart kalibrasyon eğrisi.....	64
Şekil 26 :	GMS-10 hücrelerinde 24 ve 48 saat kontrol grubu ve deney gruplarında Ki-67 ekspresyonunun temsili Western blot bulguları.....	65
Şekil 27 :	GMS-10 hücrelerinde 24 saat kontrol grubu ve deney gruplarında kalneksin ekspresyonunun temsili Western blot bulguları .....	65
Şekil 28 :	DBTRG-05MG hücrelerinde 24 saat kontrol grubu ve deney gruplarında Ki-67 ekspresyonunun temsili Western blot bulguları .....	65
Şekil 29 :	DBTRG-05MG hücrelerinde 24 saat kontrol grubu ve deney gruplarında kalneksin ekspresyonunun temsili Western blot bulguları. ....	65
Şekil 30 :	GMS-10 hücrelerinde 24 saat kontrol grubu ve deney gruplarında Ki-67 Western Blot spotlarının dansitometrik analizi.....	66

## KISALTMALAR

- AAS: Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi  
apoER2 : Apolipoprotein E Reseptörü  
ABD : Amerika Birleşik Devletleri  
AFS : Atomik Floresans Spektrometri  
APS : Amonyum Persülfat  
BCA : Biçinkonik asit  
BSA : Bovin serum albümin  
CDK : Siklin Bağımlı Kinaz  
CVB : Cocksachie virüsü  
DNA : Deoksiribonükleik asit  
DIO : Deiyonidaz  
EGFR : Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü  
ETAAS : Elektrotermal Atomik Absorpsiyon Spektrometri  
GBM: Glioblastoma Multiforme  
GFAAS : Grafit Fırın Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi  
GPx : Glutasyon- S- transferaz  
H<sub>2</sub>Se : Hidrojen selenid  
ICPOES : Endüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektrometri  
ICPMS : Endüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometri  
Lrp2 : Megalin  
LDH : Laktat Dehidrogenaz Testi  
MAK : Mitojen aktive kinazlar  
MMP : Matriks Metalloproteinaz  
MSC : Metil-seleno sistein  
Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> : Sodyum Selenit  
Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> : Sodyum Selenat  
NAA : Nötron Aktivasyon Analizi  
NSE : Nöron Spesifik Enolaz  
NP-40 : Nonidet P-40  
PVDF : poliviniliden diflorür

PBS : Fosfat Tamponu  
ROT : Reaktif Oksijen Türleri  
Se: Selenyum  
SeMet : Selenometiyonin  
Sec : Selenosistein  
Sel P: Selenoprotein P  
Sel Y : Selenoprotein Y  
Sel N : Selenoprotein N  
Sel R : Selenoprotein R  
Sel W : Selenoprotein W  
Sel 15 : 15 kDa Selenoprotein  
SelK : Selenoprotein K  
SPS2 : Seleno-fosfat sentetaz  
SelM : Selenoprotein M  
SelS : Selenoprotein S  
SelH : Selenoprotein H  
SelI : Selenoprotein I  
SelO : Selenoprotein O  
SelT : Selenoprotein T  
SelV : Selenoprotein V  
SDS-PAGE : Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi  
TrxR : Tiyoredoksin Redüktaz  
T-2 tirikotosen mikotoksin  
TEMED : tetrametiletildiamin  
WST : 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum  
WHO : Dünya Sağlık Örgütü  
XRF : X-Işını Floresans Spektroskopisi

## TEŞEKKÜR

Küçük bir çocukken evde yapmaya çalıştığım karışımlara daha fazla tahammül edemeyen canım annem Aynur Harmancı'yı ikna edip benimle birlikte deneysel oyunlarımada yandaş olan sevgili babam Süleyman Harmancı her zaman, her durumda beni kalbinizde taşıdığınız, hep destek tam destek yol arkadaşlarım olduğunuz için çok ama çok şanslıyım, iyi ki varsınız.

Laboratuvar havasını bir türlü sevdiremediğim neşe kaynağım, kardeşim Burcu Harmancı'ya,

Tanıştığımız ilk günden bu yana sadece eğitimime değil kişisel gelişimime de katkı sağlayarak ışığını yolumdan eksik etmeyen danışmanım Prof. Dr. Gül Güner Akdoğan'a,

Yüksek lisans eğitiminin başında bu araştırmanın oluşturulmasında değerli katkılarını eksik etmeyen, yol gösteren, her zaman dinleyen ikinci danışmanın Doç. Dr. Zübeyde Erbayraktar'a,

Bana laboratuvarlarını açarak bilimsel gelişimime yadsınamaz katkılar sağlayan Nurten Saydam ve Okay Saydam'a, iş arkadaşları ve hücre hattı dâhisi Thomas Ströbel'e, öğrencileri Sibylle Madlener ve Erdoğan Pekcan Erkan'a,

ARLAB'da bana sadece tez çalışmamda değil her başım sıkıştığında yardım eden, sevgili ağabeyim Dr. Kimyager Memduh Bülbül'e,

Geç saatlere kadar beni laboratuvarda yalnız bırakmayan, tüm kriz anlarını eğlenceye dönüştüren arkadaşım Uğur Tüfekci'ye, bana evini, kalbini, sonsuz anlayışını sunan değerli arkadaşım Aslı Çelik'e, masamı ve güzel kadın seslerini paylaştığım, bilgisayarla ilgili sorunlarımın çözümcüsü Begüm Alural'a,

Bu süreçte beni hiç yalnız bırakmayan, hafta sonları bile benimle çalışan, yüzümü güldüren ekip arkadaşlarım Ayşe Koçak ve Yeliz Yılmaz Sert'e,

Beni hala izlediğini bildiğim, posta güvercinim rahmetli dedem İsmail İlaslan'a,

En sancılı dönemlerimde bir anda çıkıp gelen ve huzur ve mutluluk kaynağım olan güzel insana,

Bu araştırmaya destek sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimine teşekkürü şart ve borç bilirim.

Duygu Harmancı

# SELENYUMUN İNSAN GLİOBLASTOMA MULTİFORME HÜCRE HATLARINDA İN VİTRO ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Duygu Harmancı, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler  
Tıp Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı, İzmir

## ÖZET

Beyin tümörleri 100.000 kişiden üç ila beş kişide görülmekte ve kansere bağlı ölümlerin %2,7'si beyin tümörlerinden kaynaklanmaktadır. Primer beyin tümörleri, malign hastalıkların yaklaşık %2'sini oluşturur. Glioblastoma multiforme (GBM), santral sinir sisteminin glial hücrelerinden köken alan ve en sık (% 50-60) rastlanan primer beyin tümörüdür. Daha çok erişkin yaşta (45-70) ortaya çıkmakta ve yüksek invaziv fenotipe sahip olup çok hızlı progresyon göstermektedir. Bu çalışmadaki amaç selenyumun glioblastoma hücreleri üzerindeki olası *in vitro* etkilerinin değerlendirilmesidir.

Bu çalışmada, GMS-10 ve DBTRG-05MG insan glioblastoma multiforme hücre hatlarında selenometiyonin (SeMet) uygulanan ve uygulanmayan gruplarda selenyumun hücre içine alınım düzeyleri, hücre proliferasyonu, sitotoksosite, ve hücre proliferasyon göstergesi olarak Ki-67 protein ekspresyon değişimi incelendi. Selenyumun organik formu olan selenometiyoninin hücre proliferasyonu üzerine etkisi WST-1 testi ile, sitotoksite laktat dehidrogenaz testi (LDH) ile değerlendirildi. Ki-67 protein düzeyi western blot yöntemi ile saptandı ve hücre süpernatantlarındaki ve lizatlarındaki selenyum düzeyi ölçümü grafit fırın atomik absorpsiyon spektrofotometresi kullanılarak yapıldı.

GMS-10 ve DBTRG-05MG hücreleri üzerine SeMet'in etkisi bu çalışma ile ilk defa incelenmiştir. Araştırmamızın bulgularına göre her iki hücre hattı için, doza ve zamana bağlı olarak LDH testi ile hücre ölüm artışı belirlendi. WST-1 testi sonuçlarına bakıldığında zamana bağlı olarak çalışmamız için düşük olarak kabul ettiğimiz 50 ve 100 µM dozlarda hücre proliferasyonunda 24 saat inkübasyon sonucu artış gözlemlendi. Atomik absorpsiyon spektrofotometresi (AAS) bulguları incelendiğinde canlılık ve sitotoksosite testleri ile uyumlu olarak hücrelerin selenometiyonin düzeyleri belirlenmiş oldu.

Sonuç olarak bu çalışmada, gerek DBTRG-05MG hücrelerinde, gerekse GMS-10 hücrelerinde SeMet'in, *in vitro* ortam koşullarında, doza ve inkübasyon süresine bağımlı olarak proliferasyonu azalttığı ve sitotoksisite gösterdiği, bu olayların da hücre içine alınan SeMet ile büyük lde korele olduğu bulunmuştur.

Bu araştırmada ortaya çıkan bulgular ve daha önceki bilgilerin ışığında bulgularımızın apoptoz denemeleri, ELIZA gibi yöntemler ile desteklenmesi gerekmektedir. Selenyumun organik formu kullanılarak yapılan bu çalışmamızın glioblastoma multiforme çalışan diğer araştırmacılara yn göstereceğini umut ediyoruz.

**Anahtar sözcükler:** Selenyum; Selenometiyonin; Glioblastoma multiforme; Proliferasyon; Sitotoksisite; Ki-67

## ***IN VITRO* EFFECTS OF SELENIUM ON HUMAN GLIOBLASTOMA MULTIFORME CELL LINES**

Duygu Harmancı, Dokuz Eylül University, Graduate School of Health Sciences,  
Department of Molecular Medicine, 35340, İnciraltı, İzmir

### **ABSTRACT**

The incidence of brain tumors ranges from 3 to 5 per 100.000 in humans. 2.7% of cancer-related deaths are caused by brain tumors. Primary brain tumors constitute about 2% of malignant diseases. Glioblastoma multiforme (GBM) is caused by the central nervous system-derived glial cells and is the most common (50-60%) form of primary brain tumor. In elderly (45-70), GBM has higher possibility to emerge and has a high invasive phenotype showing a very rapid progression. The aim of this study was to investigate *in vitro* effects of selenium on human glioblastoma multiforme cells.

In the present study, GMS-10 and DBTRG-05MG human glioblastoma multiforme cell lines were used as a model to examine, in the selenomethionine treated and non-treated groups; selenium entering in the cell, proliferation, cytotoxicity, and Ki-67 protein expression. The organic source of selenium, selenomethionine stimulated effects on cell proliferation and cytotoxicity, as these were assessed with WST-1 and lactate dehydrogenase (LDH) tests, respectively. Ki-67 protein expression was determined by western blot and selenium measurements were performed in supernatants and lysates by using GFAAS.

This is the first study to examine SeMet effects on cell growth and death in GMS-10 and DBTRG-05MG cells. According to the results of our research, cells respond to seleno-L-methionine in a dose-dependent and time-dependent manner for both cell lines. As a result of WST-1 test cell proliferation increased at 50 and 100  $\mu$ M doses, which were considered as low doses by us. With the analyzis of the AAS results, SeMet levels of the cells were determined to be in accordance with viability and cytotoxicity tests.

In this study, SeMet, in the *in vitro* environmental conditions, has decreased

proliferation and has shown cytotoxicity in a dose and incubation period dependent manner in both DBTRG-05MG and GMS-10 cells and these parameters are correlated in a large extent with the levels of SeMet entering the cells.

In the view of the data obtained from this investigation and the previous data, our results must be supported by new experiments such as apoptosis assays and ELISA methods. This study will yield further studies focusing on the possibility of using SeMet against some types of GBM.

**Key Words:** Selenium; Selenomethionine; Glioblastoma multiforme; Proliferation; Cytotoxicity; Ki-67

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Selenyum (Se) keşfinden bu yana yaşam bilimleri alanında çalışan araştırmacılar için çözülmesi gereken bir bulmaca olmuştur. Önceleri toksik olduğu düşünülürken yapılan çalışmalarla esansiyel bir eser element olduğu ortaya konmuştur (1). Selenyum bileşikleri çalışmalarda besin kaynağı olarak sıkça kullanılmaktadır. Selenyum insan vücudunda antioksidan savunma sistemi, kardiyovasküler sistem, üreme sistemi, immün sistem gibi çeşitli sistemler içinde yer alır (2). Sodyum selenit ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) ve sodyum selenat ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) selenyumun en iyi bilinen ana diyet formlarıdır ve önceki çalışmalar, sodyum selenitin bazı kanser hücreleri için apoptozu indüklemeye ve hücre proliferasyonunu inhibe etme özelliğine sahip olduğunu göstermiştir (3,4).

Selenyumun insanlardaki bir diğer önemli diyet formu Selenometiyonin (SeMet)'dir. SeMet, *in vivo* olarak bulunmasının yanında biyoyararlanım, düşük toksisite gibi nedenlerle son yıllarda selenyum çalışmalarında daha çok kullanılmaktadır (5). Selenyum bileşiği değiştikçe hücreler üzerindeki etkinlik ve toksisite de değişmektedir. Ayrıca, selenyumun kanser hücreleri üzerindeki etkileri sadece selenyum bileşiğine değil kanserin yerleşim bölgesine, tipine, evresine, dokunun metabolizmasına ve genotipine bağlıdır (6,7).

Glioblastoma multiforme (GBM) beyin tümörlerinin en agresif olanıdır (8). GBM *de novo* olarak gelişim gösterebildiği gibi sıklıkla daha düşük evre astrositomlardan gelişim gösterir (9). Geç yaşlarda (45-70), GBM oluşumu daha sık gözlenir. Oldukça invaziv fenotipe sahiptir ve hızlı bir gelişim gösterir (10). Ortalama yaşam süresi tanı konulduktan sonra 6-12 aydır (8). GBM gelişimi esnasında genetik, histopatolojik ve klinik olarak değişiklikler gözlenmektedir (11,12).

Erişilebilir literatür incelendiğinde selenyumun *in vitro* koruyucu ve tedavi edici etkilerinin mekanizmalarına yönelik çalışmalar prostat (13-15), meme (16), kolon (17), akciğer (18) kanseri, melanoma (19) ve çeşitli beyin tümörü (20-23) hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar selenyumun inorganik formu olan sodyum selenit ve sodyum selenat formları kullanılarak yapılmıştır. SeMet kullanılarak yapılan çalışmalarda beyin tümörü hücreleri kullanılmamıştır.

Bu çalışmadaki amaç selenyumun glioblastoma hücreleri üzerindeki olası *in vitro* etkilerinin değerlendirilmesidir. Primer hipotezimiz, kullandığımız selenyum formu SeMet

glioblastoma multiforme hücre hatları olan GMS-10'un ve DBTRG-05MG'nin proliferasyonlarını baskılar. Bu amaçla, selenyum bileşiklerinin GBM hücre hatlarında hücre proliferasyonu ve sitotoksisite üzerine etkileri hücreler dört farklı selenyum dozu ile 24, 48, 72 saat inkübe edilerek belirlendi. Hücre proliferasyonundaki değişiklikler WST-1 testi ile, sitotoksisite LDH testi ile belirlendi. Araştırmamızın temelinde hücre proliferasyonunun baskılanması amaçlandığından bir proliferasyon belirteci olan Ki-67 (24-29) protein ekspresyon değişiminin western blot yöntemi kullanılarak belirlenmesi amaçlandı. Selenyumun hücre içine alınımını belirlemek amacı ile hücre lizatlarındaki ve süpernatantlarındaki selenyum düzeyleri GFAAS kullanılarak ölçüldü.

Koruyucu etkilerinin yanında proliferasyonu baskıladığı, apoptozu indüklediği çeşitli hücre hatlarında gösterilen selenyum ve selenyum bileşiklerinin glioblastoma multiforme hücreleri üzerinde de etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu araştırmadan elde edileceği düşünülen bulguların GBM'de hedeflenmiş moleküler tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ışık tutacağı öngörülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Selenyum

Selenyum periyodik tabloda 4. Periyot ve 6. Grupta yer alan, kükürtle benzer özellikler gösteren bir elementtir. Selenyum insanlar ve hayvanlar için esansiyel bir eser elementtir. Dört farklı oksidasyon durumu vardır (1). Bu oksidasyon durumları Tablo 1 de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Selenyumun Oksidasyon Durumları ve Selenyum Bileşiklerine Örnekler

Oksidasyon Durumu + 6	Selenyum trioksit	Selenat	Selenik asit
Oksidasyon Durumu + 4	Selenyum dioksit	Selenöz asit	Selenit
Oksidasyon Durumu 0	Elemental Selenyum	Selenodiglutasyon	Selenyum sülfidler
Oksidasyon Durumu - 2	Hidrojen selenid	Dimetilselenid	Sodyum selenid

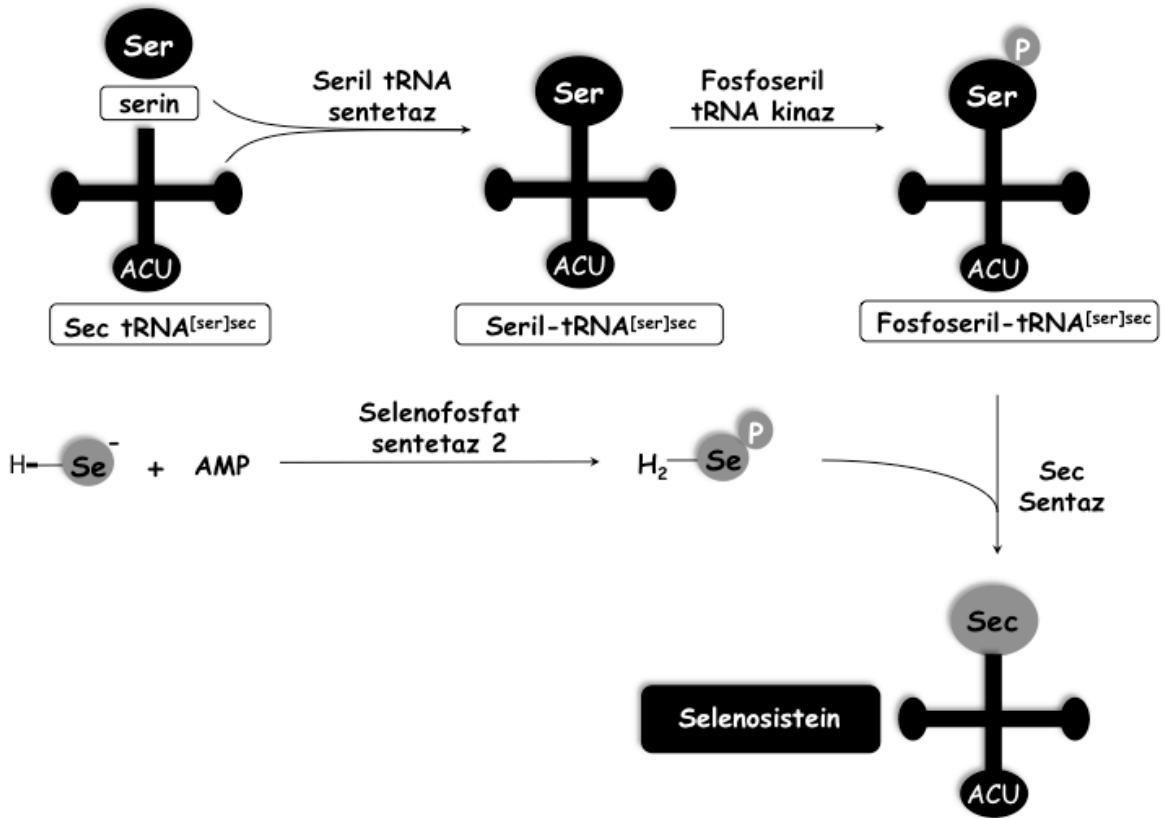
#### 2.1.1. Keşfi ve Tarihçesi

Selenyum (Se) 1817 yılında Jöns Jacob Berzelius tarafından keşfedildi ve Yunanca bir sözcük olan ve “ay” anlamına gelen ‘*selene*’ ismi ile adlandırıldı (6). Aslında Berzelius sülfirik asit üretimi üzerinde çalışırken kırmızımsı renkte kurşun duvarlar üzerinde oluşan bu elementi fark etti ve yeni bir element olarak tanımladı (1). Keşfinden itibaren selenyum çözülmeye ihtiyaç duyulan bir problem oldu. 1842 yılından beri selenyumun biyolojik rolü, toksik ve karsinojenik etkileri, selenyum eksikliği gibi konular çalışılmaktadır (30). Biyolojik açıdan selenyum önce bir zehirken daha sonraları belirli bir bakteri türü için büyüme faktörü olduğu gösterildi. 1957 yılında Schwarz ve ark. (31) selenyumun hayvanlar için esansiyel olduğunu gösterdi. İnsanlar selenyumun karsinojenik olduğunu düşünürken bugün bir anti-karsinojenik olarak selenyum pek çok çalışmanın konusu olmayı sürdürmektedir.

#### 2.1.2. Biyokimyası

Dünya Sağlık Örgütü tarafından önerilen günlük alım miktarı kadın ve erkeklerde sırasıyla 55- 70 µg/gün’dür (32).

Selenyum, bitkilerde düşük molekül ağırlıklı bileşiklerine ya da metillenerek selenometiyonin (SeMet) ve selenosistein (Sec) aminoasitlerine dönüşür. SeMet bitkilerde ana selenyum bileşiğidir. İnsan vücudunda sentezlenmez bu nedenle diyetle alınması zorunludur. Se sentezi için öncül molekül SeMet'tir. Vücudun kullanabildiği ve daha iyi absorbe edebildiği L-Selenometiyonin izomeridir. D-Selenometiyonin ise inorganik Selenyum formlarına dönüştürülerek inorganik selenyum havuzuna katılır ve diyetle selenyum alımı durduğunda bu havuzdan organizmaya selenyum sağlanır (32,33). Sec sisteinin Se içeren bir analogudur ve selenyumun biyolojik olarak aktif formudur. Sistein amino asidindeki kükürt (S) yerine Se geçmiştir. Sec ribozom aracılı protein sentezi ile proteinlere katılmak için kendine ait bir kodon taşır. Bir stop kodonu olduğu düşünülen ancak komşu DNA dizilerine bağlı olarak iki fonksiyonu bulunan UGA kodonu tarafından kodlanmaktadır.



Şekil 1. Memelilerde Selenosistein Biyosentezi (34)

Başlangıçta selenosisteil-tRNA'sı seril tRNA sentetaz tarafından katalizlenen bir tepkimeyle seril-tRNA'sına dönüştürülür. Seril-tRNA kompleksi fosforillenir ve selenofosfat sentetaz 2 tarafından katalizlenen tepkime ile fosforillenen hidrojen selenid bu kompleks ile birleşirken selenosistein sentezlenmiş olur (34).

Selenyum aynı zamanda metiyoninden kükürdü çıkartarak yerine geçer ve selenometiyonin oluşur. Hem selenometiyonin hem de selenosistein selenyumun biyolojik olarak protein ve enzimlere bağlanıp yapılarına katılarak fonksiyon göstermesini sağlar.

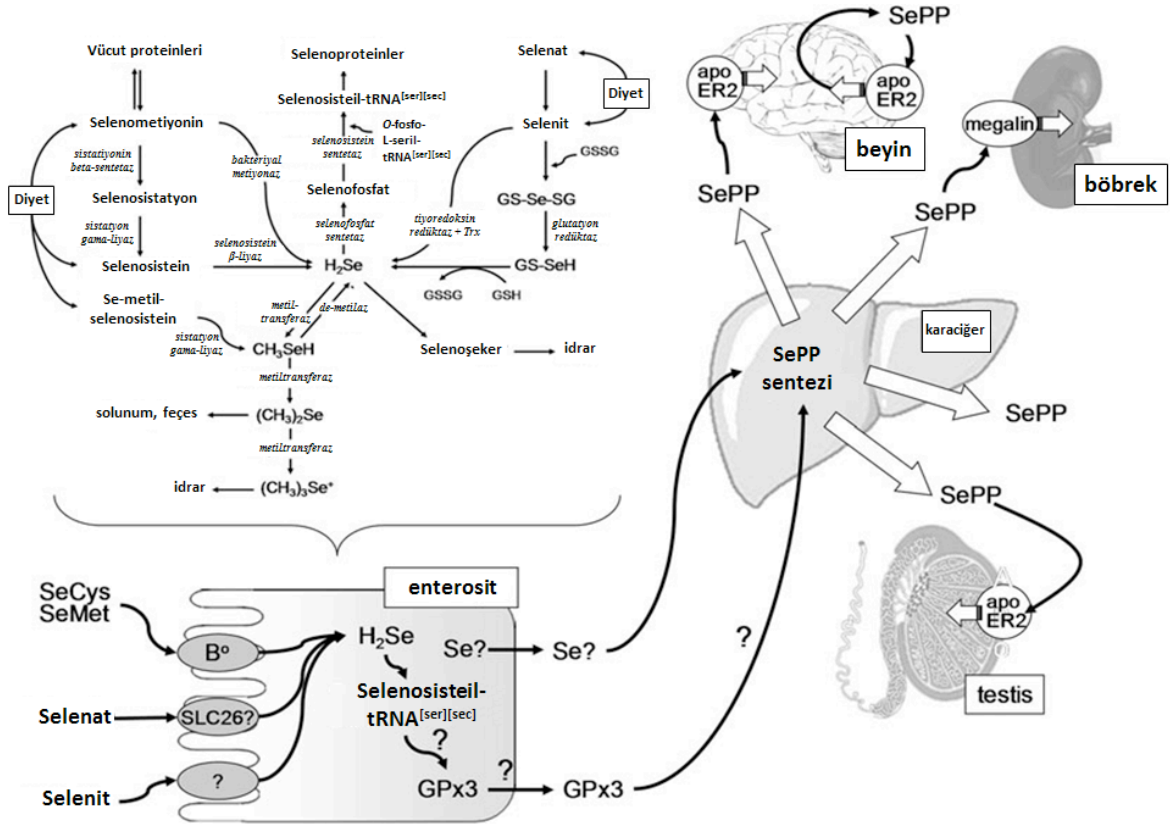
Selenyum insan vücudunda proteinlere katılarak ve bazı enzimlerin yapısında kofaktör olarak bulunarak işlev gösterir. Bugüne kadar tanımlanmış yaklaşık 25-33 selenoprotein bulunmaktadır (33-37). Bunların işlevlerine göre sınıflandırılması Tablo 2 de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Selenoproteinler (33-37)

<b>Biyolojik Fonksiyon</b>	<b>Selenoprotein</b>
Antioksidan Enzimler	GPx1 (karaciğer), GPx2 (plazma), GPx3 (plazma), GPx4 (gastrointestinal), GPx6, SelK, SelW, SelR
Redoks Sinyalleri	TrxR1, TrxR2, TrxR3
Tiroid Hormon Metabolizması	DIO1, DIO2, DIO3
Sec Biyosentezi	SPS 2
Se Transportu ve Depolanması	SelP
Protein Katlanmaları	Sel15, SelN, SelM, SelS
Fonksiyonu Bilinmeyenler	SelH, SelI, SelO, SelT, SelV

### **2.1.3. Metabolizması**

Selenyumun absorpsiyonunda kesin olmamakla beraber bazı transport proteinlerinin görev aldığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar seleno aminoasitlerin selenometiyonin, metil selenosistein ve selenosisteinin B<sup>0</sup> ve b<sup>0+</sup>rBAT sistemlerinin transport proteinleri tarafından taşındığını göstermiştir. Barsak selenat transportu için en uygun aday protein ise SLC26'dır. SLC26 inhibe edilerek yapılan çalışmalar bunu doğrulamaktadır (38).



Şekil 2. Selenyum Absorpsiyonu, Metabolizması ve Yıkımı (38)

Hem inorganik hem de organik selenyum bileşiklerinin metabolik olarak dönüştüğü ortak nokta hidrojen selenid ( $H_2Se$ ) tir. Diyetle alınan selenometiyonin selenosisteine dönüştürülür. Bu dönüşümü katalizleyen iki enzim vardır ; sistasyonin  $\beta$ -sentaz ve sistasyonin  $\gamma$ -liyazdır. Selenosistein  $\beta$ -liyaz tarafından selenosistein hidrojen selenide dönüştürülür. Selenometiyonin bakteriyel olarak da selenide dönüştürülebilir. Diyetle alınan Se-metilselenosistein sistasyonin  $\gamma$ -liyaz aktivitesiyle, metilselenole dönüştürülür ve bu bileşik demetilasyonla selenide dönüşür. Selenit ise doğrudan tiyoredoksin redüktaz aktivitesiyle selenide indirgenir ya da bir diğer yol olan glutasyon redüktaz aktivitesiyle bir dizi reaksiyon sonucu selenide indirgenebilir. Selenat da tiyoredoksin redüktaz (TrxR) ve glutasyon peroksidaz (GPx) aktiviteleri ile selenide dönüşür. Daha sonra selenid selenofosfat sentetaz aktivitesiyle fosfatlanır ve selenyum selenosisteil-tRNA<sup>[ser][sec]</sup> inkorpore olur. Selenid aynı zamanda selenyum atılımının da ara metabolitidir ve düşük seviyelerde selenoşekerlere katılıp idrarla atılabilir. Fazla selenyum alımı durumundaysa metil transferaz aktivitesi sonucu

metilselenol ve dimetil selenide dönüştürülür; solunum ve feçes yoluyla da atılımı sağlanabilir. Plazmadan diğer organlara (testis, beyin ve böbrek dokularına) selenoprotein P'nin transportunda apolipoprotein E reseptör proteini 2 (apoER2) rol alır. Bu proteine megalin (Lrp2) de eşlik eder. Diğer organlara taşınımı hakkında yeterli bilgi mevcut değildir (38,39).

#### **2.1.4. Selenyum ve Hücre Sinyal Mekanizmaları**

Selenoproteinler indirekt olarak hücre büyümesine etki ederler. Bu etkiyi tiyoredoksin redüktaz üzerinden yaparlar. Tiyoredoksin redüktaz tiyoredoksini indirger. İndirgenmiş tiyoredoksin nükleotid sentezinde (DNA sentezi) önemli role sahip ribonükleotid redüktazın aktivasyonuna öncülük eder. Tiyoredoksin sentezi tümör hücrelerinde artmıştır ve hücrenin büyüme faktörlerine verdiği yanıtı artırır. Farklı selenyum bileşiklerinin büyüme üzerine etkileri hücrenin normal ya da tümörleşmesine bağlı olarak değişmektedir (2).

Selenyum bileşikleri hücreyi apoptoza götürerek hücre ölümüne neden olabilirler. Oksidatif stres nedeniyle indüklenmiş hücre ölümüne karşı hücrenin yaşamasına yardımcı da olabilirler. Sağlıklı hücrelerde hasardan koruması, tümör hücrelerinde ise apoptoz yolu ile hücre ölümünü indüklemesi selenyumun antikarsinojenik özelliğiyle ilişkilendirilebilir. Apoptoz ökaryotlarda korunmuş bir mekanizmadır. Selenyumun apoptozla ilişkisi hücre tipine ve selenyum bileşiğine bağlı olarak farklı mekanizmalar üzerinden gelişir. Hücre proliferasyonunda önemli rolleri olan kinazların modülasyonuna sebep olarak bu yolları inhibe ederek hücreyi apoptoza yöneltebilirler. Apoptoz yolağında kaspazların büyük önemi vardır. Kaspazların aktivasyonunda çeşitli selenyum bileşiklerinin etkileri söz konusudur. Ebselen, MSA gibi selenyum bileşikleri tek başlarına ya da diğer antikanser ilaçlarla birlikte kaspaz modülasyonunda görev alırlar. Hücredeki reaktif oksijen türleri düzeyinin artması ile redoks dengesi bozulur ve selenoproteinler içeren sistemler devreye girer. Bu sistemler; GSH/GSSG sistemi, Grx sistem ve Trx/TR sistem. Glutatyon sistemi genellikle kaspaz 3 ve kaspaz 7 aktivasyonu ile ilişkilidir. Selenyum bileşikleri p53 üzerinden de apoptoz üzerinde etkilidir. Selenyum doğrudan etki gösterebildiği gibi daha çok yapısına katıldığı selenoproteinler üzerinden etki göstermektedir (130). Meme kanseri MCF7 hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada selenyum ve doksorubisinin apoptozu indüklemeye sinerjistik etkileri incelenmiş ve ikisinin birlikte kilit düzenleyici adımları

hedefleyerek Fas ligandına bağılı olmaksızın Fas sinyalizasyonunu aktifleştirdiği ve hücreyi apoptoza götürdüğü gösterilmiştir (131). Selenyumun koruyucu etkileri arasında oksidatif hasardan proteinleri koruması, gen ekspresyonunu spesifik olarak düzenlemesi, DNA'ya oksidatif hasarı, lipid peroksidasyonu ve hücre membran hasarını azaltması sayılabilir (40).

Selenyumun biyolojik etkileri selenoproteinlerin antioksidan özelliklerinin bir getirisi olan reaktif oksijen türlerini ve organik peroksitleri temizlemesinden kaynaklanır. Serbest radikaller hücre içi sinyal mekanizmasının önemli bir parçasıdır. Normal hücreden patolojik hücreye geçiş sürecinde serbest radikal miktarında artma olur. Bu esnada glutasyon peroksidazlar ve tiyoredoksin redüktaz serbest radikalleri parçalayarak hücre içi sinyal düzenlenmesine selenoproteinler aracılığıyla katılmış olur.

#### **Selenyumun düzenleyici etkileri (41);**

- Sitoplazma ve çekirdekdeki protein kinazların ROT aracılı uyarılmaları,
- Proteinlerin tiyol, sistein ve tirozin gruplarının ROT aracılı kovalent modifikasyonları,
- Hücrel redoks durumundaki değişikliklere ROT üretiminin transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna sebep olarak *de novo* gen ekspresyonuna öncülük etmesi,
- Hücre yüzey ve nükleer reseptör proteinlerinin düzenlenmesi yoluyla hücre büyümesi, yanıtı ve davranışında değişime neden olması,
- Hücre ölüm ve yaşam sinyallerinin düzenlenmesi

Selenyum, kinazlar ve hücre yüzey reseptörlerinin ekspresyon ve fonksiyonlarını etkiler. Bunu hücre büyümesi ve canlılığını kontrol ettiği mekanizmalar yoluyla yapar. Fibronektin, adheran hücrelerin canlılığı için önemli role sahip ekstraselüler matriks elemanıdır. Hücrelerin selenite maruz bırakılması hücre yüzeyindeki fibronektin reseptörlerinin sayısını azaltmaktadır. Tiyoredoksin redüktaz reseptörlerin doğru ve kararlı konformasyonda katlanmasında rol oynayan önemli bir sistemdir.

Selenyum, protein kinazların hücre içi sinyal mekanizmasında da potansiyel role sahiptir. Bu yollar mitojen aktive kinazlar (MAK), p38 ve JNK/SAPK yollarıdır.

Selenyum genomun gardiyanı olarak tanımlanan p53'ü de etkiler. Hücrel redoks durumu p53 aktivitesinde önemli role sahiptir. Hücrelerde tiyoredoksin redüktazların inaktivasyonu p53 aktivitesinin kaybına neden olur. Kanser hücrelerinin Se bileşikleri ile

inkübe edildiğinde p53 bağımlı veya bağımsız olarak DNA hasarını indükleyici yollarla ölüme gittiği gözlenmiştir (5).

DNA metilasyonu transkripsiyonel kontrol için önemli epigenetik bir mekanizmadır. Kanser hücrelerinde normal olmayan DNA metilasyonu görüldüğü uzun yıllar önce keşfedilmiştir (132). Selenyum eksikliği ile kolon kanseri riskinin arttığı ve bu durumun DNA metilasyonu ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (133).

### **2.1.5. Selenyum ve Kanser**

Selenyum bilim tarihinde keşfinden bu yana kanserle ilgili birçok çalışmaya konu olmuştur. Bu çalışmaların iki ana konusu bulunmaktadır : kanserden koruma ve terapi. Bu iki konunun ön plana çıkması selenyumun antioksidan özelliklerinin yanında doza bağlı olarak bir oksidan olarak da davranmasından kaynaklanmıştır. Selenyumun kanser üzerindeki potansiyel etkileri *in vitro* ve *in vivo* hayvan çalışmaları ile gösterilmiştir (42). Selenyumun kanser üzerindeki etkileri hücre döngüsü ve apoptoz, antioksidan etki, anjiogenez ve ekstraselüler matriks düzenlenmesi, histon deasetilaz inhibisyonu, karsinojen detoksifikasyonu, glutatyon transferazların indüksiyonu, DNA hasarı ve tamir mekanizmaları ile immün sistem modülasyonu gibi metabolik süreçlerle ilişkilidir (43). Selenyumun kanser ile ilişkisinde kansere spesifik, türe spesifik ya da doza bağlı olarak farklı etkiler ortaya çıkmaktadır.

Epidemiyolojik çalışmalar ABD’de plazmadaki düşük Se durumu ve alımı ile artmış kanser insidansını ilişkilendirmektedir (44). Selenyumun antikanser özellikleri ilk olarak hayvan çalışmaları ile kanıtlanmıştır. Hayvan besinlerine eklenen selenyumun kimyasallarla indüklenen tümör oluşumunu baskıladığı görülmüştür. 2004 yılında *Zhuo ve ark.larının* (45) yaptığı çalışmaya göre fazla selenyum alımının akciğer kanserinden korunmak için alternatif yol olduğu önerilmiştir. Benzer sonuçlar 2006 yılında *Brinkman ve ark.ları* (46) tarafından prostat kanseri için ortaya konmuştur. Prostat kanseri üzerinde devam eden çalışmalardan NPC (Nutritional Prevention of Cancer) çalışmasında hastalara 200 µg MeSeCys, SWOG (Southwest Kanser Grubu) tarafından koordine edilen ve NCI (National Cancer Institute)’ın finanse ettiği SELECT çalışmasında ise 200 µg SeMet hastalara verilmiştir. Bu çalışmalardan NPC kanser olgularının azaldığını söylerken SELECT tek başına selenyum alan ya da hem selenyum hem vitamin E alan erkeklerle almayan erkeklerde prostat kanseri gelişimi arasında anlamlı bir farka rastlanmadığını

göstermiştir (131). Bu durum dikkate alındığında selenyumla ilişkili olarak bileşiklerinin farklı sonuçlara neden olduğu söylenebilir. Bunun tam tersi olarak meme kanseri ve melanoma için farklı çalışma gruplarınca uzun süre inorganik selenyum alımının mortaliteyi artırdığı gösterilmiştir (42). Selenyum tek başına diyetle eklenebildiği gibi vitaminlerle desteklenerek de çalışmalarda kullanılmıştır (47). Alımını cinsiyetlere göre inceleyen çeşitli çalışmalar olmuştur (48,49). Bu çalışmalar insanlar üzerinde belli bir süreyle bu destek karışımlarını almaları temeline dayanılarak yapılmıştır. *Li ve ark.'larını* (50) yaptığı çalışmaya göre günde 50 µg selenat ve farklı 25 vitamin ve mineral içeren bir karışım alan kişilerde özafagus kanserine karşı herhangi bir koruma gözlenmemiştir. Selenyum bileşiklerinin kanser türlerine etkilerinin incelendiği çalışmalar Tablo 3'de gösterilmiştir.

Selenoproteinlerin kanser oluşumundaki rolleri araştırılmaktadır. Beyin tümörleri için özellikle önem taşıyan selenoproteinler Selp ve GPx1'dir. Her iki selenoprotein beyindeki rollerinin araştırıldığı bir hayvan çalışmasında bu proteinlerin nakavt edilmesi halinde nörotoksinlere duyarlılığın arttığı, nöbet gelişimin olduğu, GPx1'in koruyucu aktivitesinin azalması, Trx'in baskılanması ve hareket kısıtlılıkları meydana geldiği gözlenmiştir (135). GPx1 ve Selp'deki polimorfizmlerle, ekspresyon değişiklikleriyle ilişkili olarak prostat, meme gibi kanser türlerinin gelişimi söz konusudur. GPx1'de 38 SNP tanımlanmıştır (136). Hem GPx1 hem Selp için tanımlanmış polimorfizmlerin araştırılması, kanserdeki rollerinin belirlenmesi, hücrelerdeki spesifik genlerin ekspresyonlarının değişmesinin kanser araştırmaları ve nutrigenomik açısından önemi artmaktadır.

**Tablo 3.** Selenyumun Kanserle İlişkisinin Araştırıldığı Çalışmalar

<b>Kanser</b>	<b>Sonuç</b>	<b>Kaynak</b>
Küçük Hücreli Olmayan ve Küçük Hücreli Akciğer Kanseri ( <i>in vitro</i> )	TrxR1 protein düzeyi ve aktivitesinde doza bağlı olarak azalma, tam tersi olarak TrxR1 mRNA düzeyinde doza bağlı artma, SeMet 'in Ref1'in yer aldığı bir mekanizma ile p53 tümör baskılayıcı geni aktivasyonu,	Selenius 2008 (51); Seo 2002(52)
Glioblastoma Multiforme	Cerrahi müdahale sonrası yaşam süresinde uzama yok, A172 insan GBM hücre hattında C6 sıçan GBM hücre hattına göre daha etkili anti-proliferatif etki, Apoptoz yoluyla hücre ölümünü indükleme, Hücre büyümesini inhibe etme, mitokondriyal hasarı indükleme, Sodyum selenitin 2-3 µM konsantrasyonunda ışın duyarlılığı	Philipov 1990 (54); Zhu 1995 (22); Zhu 1996 (21); Sundaram 2000 (20); Schueller 2004 (54)
Karaciğer Kanseri	Diyetine selenyum eklenmiş grupta kontrol grubuna göre karaciğer kanseri insidansında azalma	Yu 1997 (55)
Deri Kanseri (NPC) ( <i>in vitro</i> )	Diyetine selenyum eklenmiş grubun melanoma dışı deri kanseri üzerinde hiç etki göstermezken, bu gruptaki kişilerin primer akciğer, kolon, prostat gibi kanserleri geliştirme riskinde azalma, Doza bağlı olarak büyüme baskılama, G0/G1 fazında hücre tutuklanması, CDK2 ve CDK4 gen ve protein düzeyinde zamana bağlı baskılanma,	Clark 1996 (56); Redman 1998 (57) ; Song 2009 (19)
Prostat Kanseri	İnsidansta azalma, Doza bağlı olarak büyüme baskılama, Prostat dokusunda fazla Se düzeyi,	Combs 2001 (58) ; Duffield-Lillico 2002 (59) ; Redman 1998 (57); Nyman 2004 (15)
Tiroid Kanseri	Tanı öncesi dönemde düşük serum Se	Glattre 2012 (48)

	düzeıı	
Lösemi ( <i>in vitro</i> )	Hücre döngüsü ile ilişkili genlerin ve total hücreseı fosforile proteinlerin ekspresyonlarının regülasyonunda rol alma	Zeng 2002 (60)
Meme Kanseri ( <i>in vitro</i> )	Doza bağlı olarak büyüme baskılama	Redman 1998 (57)
Anaplastik astrositoma	Selenit apoptoz yoluyla hücreleri ölüme götürüyor, MMP2, 9, 14, 15, 16 ve 24, bu enzimlerin inhibitörleri TIMP'ler ve EGFR gen ekspresyonunda azalma	Rooprai 2007 (23)
Kolon Kanseri ( <i>in vitro</i> ) (transgenik hayvan modeli)	Metil selenol kanser hücrelerinde büyümeı baskılama, apoptozu indükleme, ERK ½, p38 MAPK, SAPK, Src protein ekspresyonları kontrole göre değişim yok, Kemoterapötik ajanların toksik etkisinden koruma, AKT aktivasyonunu inhibe etme,	Zeng 2012 (61); Cao 2004 (17) Luo 2012 (62)
Skumöz hücreli kanser ( <i>in vitro</i> )	MSC apoptozu artırır, kaspaz-3, 8 ve 9'un aktiviteleri yüksektir	Suzuki 2010 (63)
Osteosarkoma	Sisplatin direncinde azalma, Hücreseı DNA onarım kapasitesinde inhibitör etki,	Abul-Hassan 2004 (40)

Günümüzde kanser araştırmaları hedefe yönelik tedaviye yönelmiştir. Selenyum çalışmaları sadece pre-klinik, klinik, *in vivo* ya da *in vitro* olmamalıdır. *In vitro* çalışmalardan elde edilen verilerin yönlendirmesi ile araştırmalar klinik boyuta taşınmalıdır. şu ana kadar selenyum çalışmalarında kullanılan hücre hatlarının listesi Tablo 4'de verilmiştir.

**Tablo 4.** Selenyum Araştırmalarında Kullanılan Hücre Hatları

<b>Doku</b>	<b>Hücre Hattı</b>	<b>Kaynak</b>
Kan	HL-60	Zeng 2002 (60)
Meme	MCF-7	Redman 1998 (57) Hawkes 2011 (16)
Prostat	DU-145 LNCaP PC3	Redman 1998 (57) Zhao 2009 (64) Zhong 2001 (13)
Deri	UACC-375	Redman 1998 (57)
Akciğer	A-427 SK-LU-1 H1299 H157 U1810 H611 U1906E U1906L U1285	Seo 2002 (52) Selenius 2008 (51) Rigobello 2009 (18)
Beyin	IPSB-18 A-172 U-87MG U373MG C6 T98G	Rooprai 2007 (23); Zhu 1995 (22) Zhu 1996 (21) Sundaram 2000 (20)
Bağırsak	HCT116 NCM460 SW480	Luo 2012 (62)
Over	C13	Rigobello 2009 (18)
Kemik	U2OS	Abul-Hassan 2004 (40)

### 2.1.5. Selenyum Eksikliği

Selenyum eksikliği yaşanan bölgeye bağlı olarak ortaya çıkabilir çünkü bölge toprağındaki selenyum içeriğı düşük ise o bölgede yetişen yiyeceklerdeki selenyum oranı da düşüktür. Buna en iyi örnek Çin'in Keshan bölgesi verilebilir. Bu bölgede yaşayan çocuklarda ve kadınlarda endemik bir kardiyomyopati olan 'Keshan Hastalığı' uzun yıllar selenyum eksikliği ile ilişkilendirilmiştir (65). Bu teori hala geçerliliğini koruyor olsa da hastalığa aynı zamanda Coxsachie virüsünün (CVB) sebep olabileceğı, bu hastalardan alınan kan ve doku örneklerinden bu virüsün izole edilmesiyle gösterilmiştir (66). Yapılan son çalışmalar selenoproteinlerdeki genetik polimorfizmlerin de bu hastalıkla ilişkisi olabileceğı düşüncesini geliştirmiştir. Hayvanlarda yapılan çalışmalarda GPx1 *knock-out* fareler CVB ile enfekte edildiğinde kardiyomyopati gelişimi gözlenirken doğal suşlarda virüse karşı direnç görülmüştür. Benzer bir çalışma *Lei ve ark.* tarafından 71 hasta ve 290 kontrol kan örneğinde selenyum düzeyi ve GPx-1 aktivitesi ve polimorfizmi incelenerek yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda da selenyum eksikliğinin kardiyomyopati nedeni olabileceğı savunulmuştur (67-68).

Kashin-Beck hastalığı endemik, dejeneratif ve kronik osteoartrittir. Özellikle selenyumca fakir topraklarda yaşayan insanlarda görülür. Etiyolojisi hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Mineral dengesizliği, taneli ürünlerdeki mikotoksinler veya içme sularındaki organik kontaminasyon kaynakları bu hastalığın nedenleri arasında sayılabilir. Sadece selenyum değil aynı zamanda iyodür eksikliğine de bağlı ortaya çıkan bir hastalıktır. Rus araştırmacılar tarafından ortaya atılan düşünce ise hastalığa mikotoksinlerin sebep olduğu yönündedir. Özellikle tirikotosen mikotoksin (T-2) önemli bir risk faktörü olarak görülmektedir. T-2 doğal olarak *Fusarium* mantarının yan ürünü olarak oluşan ve yüksek miktarda bulunduğu insan ve hayvanlar için toksik olan küftür. Hastalığın patogenezinine ilişkin selenyum eksikliğine bağlı olarak GPx'lerin aktivitesinde azalma meydana gelmesi ile kondrositlerdeki antioksidan mekanizmasının bozulması hipotezi de ortaya atılmıştır (66).

Selenyum eksikliği sadece yaşanan bölgenin toprağına bağlı olarak değil aynı zamanda ince ya da kalın bağırsakları kanser nedeniyle cerrahi olarak çıkarılmış ve fonksiyonel bir barsak sistemi olmayan hastalarda ve ya Crohn hastalığı gibi akut enflamatuvar barsak hastalığında uygulanan total parenteral beslenme sırasında da ortaya çıkabilir.

Selenyum eksikliğinde lösemi, romatoid artrit ve fibrokistik meme hastalığı insidansında artış görüldüğü bildirilmiştir. Yine düşük serum Se konsantrasyonlarının meme, akciğer, over, pankreas, serviks, uterus, kolon ve rektum kanserlerinin gelişiminde yüksek risk oluşturduğu bulunmuştur. Se eksikliğine Balkan nefropatisinin görüldüğü coğrafi bölgelerde de rastlanır, fakat Se eksikliğinin kronik ilerleyici böbrek hastalığının gelişimine bulunduğu dair doğrudan bir kanıt bulunmamaktadır. Düşük selenyum miktarı immün yetmezlik de meydana getirebilir (69,70).

#### **2.1.6. Selenyum Toksisitesi**

Selenyum toksisitesi, alınan selenyum konsantrasyonu yanında, selenyum bileşiğinin toksik potansiyeli ile ilişkilidir. Selenyum toksisitesi akut ve kronik olarak ele alınmalıdır (71).

Akut selenyum toksisitesinde mide bulantısı, baş dönmesi, diyare, karın ağrısı gibi fizyolojik durumların yanı sıra kas spazmları, halsizlik, çarpıntı, koma hali gibi nörolojik durumlar da meydana gelebilir. Hipotansiyon ve taşikardi durumları gözlenir. Ölüm durumu bu iki sebepten dolayı vücutta oluşan sıkıntı halinden ileri gelebilir (72).

Kronik selenyum toksisitesi selenozis olarak da bilinir. Tırnaklarda değişim ve saç dökülmesi gözlenir. Bulantı, kusma, diyare, deri lezyonları olabilir. Selenozis devam ederse beyin fonksiyonlarında azalma gözlenir; güçsüzlük, koma hali ve ölüm meydana gelebilir (73).

#### **2.1.7. Selenyum Ölçüm Yöntemleri**

Bir eser element olan Se'un biyolojik örneklerdeki düzeyini ölçmek için geliştirilmiş pek çok analiz yöntemi vardır (74-79). Bu yöntemler ;

- Atomik Absorpsiyon Spektrometri (AAS) (75),
- Elektrotermal Atomik Absorpsiyon Spektrometri (ETAAS) (74),
- Endüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektrometri (ICPOES) (74),
- Endüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometri (ICPMS) (74),
- Atomik Floresans Spektrometri (AFS) (76,77),
- Nötron Aktivasyon Analizi (NAA) (74),
- X-Işını Floresans Spektroskopisi (XRF) (74)'dir.

Hangi yöntemin en uygun olduğuna karar vermek için eldeki örneğin iyi tanınması gerekir. Ön çalışma yapmadan bu tür analizlerin yapılması verilerin güvenilirliğini azaltır.

## **2.2. Glioblastoma Multiforme**

Gliomalar santral sinir sisteminin en sık görülen primer beyin tümörleridir (80). Gliomlar glial hücreleri tarafından üretilen ve astrositik, oligodendrial, ependimal ya da karışık kökenli tümörler olarak tanımlanır. Histolojik görünümüne dayanarak, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) gliomları I'den IV'e kadar sınıflandırır. En malign astrositik glioma olan, glioblastoma multiforme (grade IV), tüm gliomların % 50'sinden fazlasını oluşturur ve en sık görülen malign primer beyin tümörüdür (81). Glioblastoma multiforme insidansı düşük olan bir tümör olmasına rağmen kötü prognoz nedeniyle medyan sağ kalım süresinin 12-15 ay olması hastaları olumsuz etkileyen en büyük sebeptir (82).

### **2.2.1. Epidemiyolojik özellikleri**

Glioblastoma multiforme her yaşta insanı etkileyebildiği gibi daha çok erişkin yaştaki insanları etkiler. Tanı alan olguların yaş ortalaması 64'tür, bunların % 80'inden fazlası 55 yaş ve üzerinde tanı alır, % 1'lik kısmı ise 20 yaş altıdır (83). Erkeklerde kadınlara oranla 1.6 daha fazla gözlenir (81).

Gliomaların çoğunluğunun altında yatan neden belirlenebilir. Çevresel risklerden özellikle yüksek dozda radyasyona maruz kalmak son yıllarda rapor edilmiş bir nedendir. Bunun yanında ciddi kafa travması, diyet risk faktörleri, mesleki risk faktörleri gibi nedenler de sayılabilir.

Glioma olgularında genetik yatkınlık % 5-10 oranında gözlenir. Karsinojen detoksifikasyonu, hücre döngüsü regülasyonu ve DNA onarım mekanizmalarındaki genlerdeki ortak polimorfizimler ve gliomalar arasındaki ilişkinin incelenmesine devam edilmektedir (84,85).

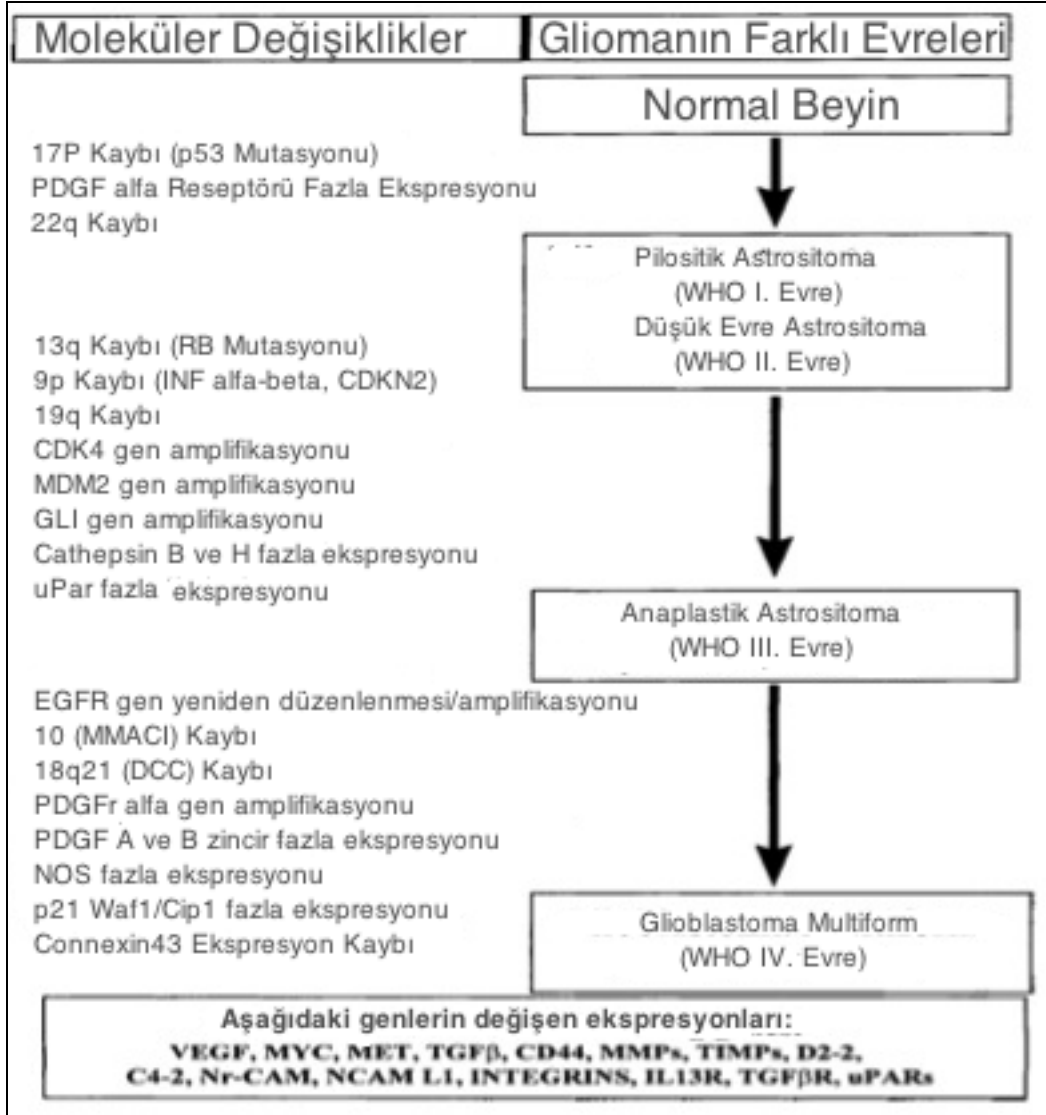
### **2.2.2. Patolojik Özellikleri**

Glioblastoma multiforme lezyonları tanı sırasında beyin lobunu işgal edebilecek kadar tipik bir büyüklüğe sahiptir. Lezyonlar genellikle serebral hemisferlerin subkortikal beyaz cevherinde bulunur ve çoğunlukla frontal lob sınırından temporal loba doğru uzanır.

Tümör infiltrasyonu genellikle komşu korteks içine ve korpus kallosum boyunca kontralateral hemisfer içine ilerler (86).

Glioblastoma multiforme tümör kitlesi hafif belirginlik ve yüksek derecede heterojenite ile karakterizedir. Fazlaca proliferen olan kanser hücreleri tümörün hiperselüler ve perifer bölgesinde bulunur. Histopatolojik olarak , lezyonlar tipik hücresel hiperplazi görünümü sergiler ; atipik çekirdek, artmış mitotik aktivite, hücresel pleomorfizm ve zayıf farklılaşma. Glioblastoma multiformenin tanımlayıcı özelliklerinden biri hem nekrotik hem de vasküler hiperplazik alanların bir arada bulunmasıdır. Bunun yanında beyin dokusuna invaze olması en önemli belirleyicisidir. Yüksek infiltratif özelliğe sahip olduğu halde metastaz eğilimi düşüktür (87).

Primer GBM'ler genellikle herhangi bir klinik belirti göstermeden ortaya çıkarlar. Sekonder gelişim gösteren GBM'ler oldukça nadirdir, tanı alan olguların % 5'i sekonder gelişim göstermiştir. Fenotipik olarak primer ve sekonder GBM'ler ayırt edilemez. Ancak bu ikisinin farklı genetik yollar aracılığı ile oluştuğu düşünülmektedir. Erişkinlerdeki primer GBM, EGFR'ün fazla ekspresyonu ya da mutasyonu ile ilişkilendirilebilir. Bunun yanında 10. kromozomun q kolunda heterozigosite kaybı, PTEN gen mutasyonu, p16 gen delesyonu da sayılabilir. Sekonder GBM'de de p53 mutasyonu, 10. kromozomun q kolunda heterozigosite kaybı, tümör baskılayıcı Rb düzenleyici yollarda anormallik görülebilir. Genel olarak, primer ve sekonder GBM'lerdeki bu genetik değişiklikler hücrelerin kontrolsüz büyümesine neden olan çeşitli mitojenik yolların fazla aktivasyonu ile sonuçlanır (88,89). Gliomagenesis süreci Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. Gliomagenesis Süreci (90-95)

GBM'in hücrel kökeni halen araştırılmaktadır. Geleneksel yaklaşım GBM'in olgun astrositer hücrelerden köken aldığı yönündeyken son araştırmalar nöral kök hücrelerin malign dönüşümü ile oluştuğunu ortaya atmaktadır (96,97). Kanser kök hücreleri yüksek proliferatif potansiyel, kendini yenileme ve multipotensi özellikleri yanında tümörojenik davranışlar sergilerler (98,99). Kanser kök hücreleri ile ilgili giderek artan bilgi birikimi olmasına rağmen başlangıç teorisinden GBM için asla vazgeçilmemiştir.

### **2.2.3. Proliferasyon ve Glioblastoma Multiforme**

Hücre proliferasyonu en basit tanımıyla hücre büyümesinin ve bölünmesinin bir sonucu olarak hücre sayısındaki artıştır. Tümör hücrelerinde anormal hücre proliferasyonu söz konusudur. Proliferasyon durumunu belirlemek için çeşitli belirteçler vardır. Bunların başında Ki-67, timidin kinaz, siklin E, siklin D, p21, p27 , PCNA, MIB 1 ve KiS1 sayılabilir (25).

Ki-67 1983 yılında tanımlanmış monoklonal bir antikordur. Prolifere olan hücrelerde nükleer proteinlerle etkileşse de görevi tam olarak belirlenememiştir (27). Ayrıntılı bir hücre döngüsü analizi G0 fazındaki hücrelerin Ki-67 eksprese etmediğini ancak mitozdaki tüm hücrelerin çekirdeklerinde eksprese olduğunu göstermiştir. Çoğalan tüm hücrelerde bulunduğundan Ki-67 belirli bir hücre topluluğunun büyüme fraksiyonunun değerlendirilmesi için oldukça önemlidir.

### **2.2.4. Klinik Göstergeler ve Tanı**

GBM belirtileri genellikle geç dönemde kafa içi basınç artışı ile kendini gösterir. Bunun yanında şiddetli baş ağrısı, bulantı ya da kusma gibi belirtiler de gözlenebilir. Nörolojik değişiklikler, geçici hafıza kaybı, kişilik değişiklikleri, konfüzyon ve hatta hastalarda epileptik nöbetler gözlemlenebilir (100-102). Tanının konulması için manyetik rezonans görüntüleme, tomografi gibi yöntemlerden yararlanır. Yine de oluşan ödem varsa net tanının konulması cerrahi müdahale sonrası histopatolojik bulguların değerlendirilmesi ile olur (102-104).

### **2.2.5. Konvansiyonel Tedavi**

Yeni tanı konmuş GBM'de cerrahi müdahale sonrası eş zamanlı ve adjuvan kemoterapi yanında radyoterapi uygulanır. Cerrahi müdahale ile dokunun tümü alınmış bile olsa tümörün yüksek infiltratif yapısı nedeniyle yeniden oluşum riski oldukça fazladır. GBM'de en çok kullanılan kemoterapötik alkilleyici bir ajan olan temozolomid'dir. Bunun yanında kombine tedavi yöntemleri de uygulanmaktadır. GBM tedavisinde en büyük sorunlardan biri ilaçlar nedeniyle oluşan yan etkilerin hastaya verdiği rahatsızlıktır. Bu yan etkiler ; beyindeki komşu yapılar üzerinde oluşan toksik etki, nöronal olmayan dokulardaki proliferasyon hücrelere toksik etki ve de istenmeyen uzun dönemli etkiler (bilişsel bozukluklar, epilepsi)'dir (105,106).

GBM'de hasta sağ kalım süresi % 5'den az olduğu ve nüks etme ihtimali yüksek olduğundan, bu hastalık özünde tedavi edilemez (107,108).

Tedavide son zamanlarda kullanılmaya başlanan 'Bevacizumab' VEGF'ne karşı geliştirilmiş bir monoklonal antikordur. VEGF inhibe edilerek GBM hücrelerinin damarlanması ve proliferasyonu baskılanmış olur (109). Son zamanlarda kanser alanında çalışan tüm araştırmacıların ilgi duyduğu, hedefe yönelik tedavi örneklerinden ilki olarak kabul edilebilir.

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Araştırmanın Tipi:**

Araştırma deneysel (*in vitro*) bir çalışmadır.

#### **3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:**

Bu araştırma Kasım 2011 ile Kasım 2012 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğrenme Kaynakları Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda (ARLAB) gerçekleştirilmiştir.

#### **3.3. Çalışma Materyali:**

Araştırmada GMS-10 (DSMZ No : ACC 405) ve DBTRG-05MG (DSMZ No : ACC 359) insan glioblastoma multiforme hücre hatları kullanılmıştır.

#### **3.4. Çalışmanın Değişkenleri:**

Çalışmanın bağımsız değişkeni: Seleno-L-metiyonin uygulaması

Çalışmanın bağımlı değişkeni: Hücresel canlılık oranları, sitotoksosite yüzdeleri, selenyum düzeyleri, Ki-67 protein düzeyi

#### **3.5. Veri toplama Araçları:**

##### **3.5.1. Hücre Kültürü**

Bu çalışmada kullanılan GMS-10 ve DBTRG-05MG insan glioblastoma hücre hatları ticari olarak satın alınmıştır (DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Almanya). GMS-10 hücre kültürü için %10 fetal dana serumu (Fetal Calf Serum; FCS) (Biological Industries, İsrail) ile desteklenen DMEM kültür ortamı [DMEM + Penisilin (10U/ml), Streptomisin (10 mg/ml) + FBS (%10) + Glutamin (%1)] (Biochrom AG, Almanya) kullanıldı. Azot tankından alınan pasaj sıfır hücreler 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür flasklarına (Greiner, Almanya ) ekildi. Ertesi gün flaska yapışmayan ve canlı olmayan hücreler uzaklaştırılarak taze ortam eklendi. Laboratuvar koşullarımızda hücrelerin haftada 2 kez % 0.05 konsantrasyonda Tripsin/EDTA (Biological Industries, İsrail) ile kültür kabından kaldırılarak pasajlanması yeterli oldu. Pasaj işlemi bir sonraki deney seti

için gerekli hücre sayısına bağlı olarak en az bire iki en çok bire dört olacak şekilde 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür flasklarına ekilerek yapıldı. Hücre kültürü işlemleri Laminar akımlı kabinet (Heraus, Almanya) içinde gerçekleştirildi ve hücreler %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde (Thermo Scientific, ABD) 37°C'de kültüre edildi.

DBTRG-05MG hücre kültürü için %10 fetal dana serumu (Fetal Calf Serum; FCS) (Biological Industries, Israil) ile desteklenen RPMI 1640 kültür ortamı [RPMI + Penisilin (10 U/ml), Streptomisin (10 mg/ml) + FBS (%10) + Glutamin (%1)] (Hyclone, Thermo Scientific, ABD) kullanıldı. Azot tankından alınan pasaj sıfır hücreler 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür flasklarına (Greiner, Almanya ) ekildi. Ertesi gün flaska yapışmayan ve canlı olmayan hücreler uzaklaştırılarak taze ortam eklendi. Laboratuvar koşullarımızda hücrelerin haftada 2 kez % 0.05 konsantrasyonda Tripsin/EDTA (Biological Industries, Israil) ile kültür kabından kaldırılarak pasajlanması yeterli oldu. Pasaj işlemi bir sonraki deney seti için gerekli hücre sayısına bağlı olarak en az bire iki en çok bire dört olacak şekilde 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür flasklarına ekilerek yapıldı. Hücre kültürü işlemleri Laminar akımlı kabinet (Heraus, Almanya) içinde gerçekleştirildi ve hücreler %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde (Thermo Scientific, ABD) 37°C'de kültüre edildi.

GMS-10 hücre hattı 1995 yılında, 49 yaşında malign beyin tümörlü bir erkek hastadan elde edilmiş (ticari) fibroblast benzeri tek tabaka halinde büyüyen hücrelerdir. İnkübeleme zamanı 50-70 saat arasındadır (110).

DBTRG-05MG, 1985 yılında, 59 yaşında Kafkasyalı bir kadından radyasyon ve kemoterapi tedavisini takiben elde edilmiş primer glioblastom (ticari) hücreleridir. Hücrelerin NSE (nöron spesifik enolaz) ve EGFR (epidermal büyüme faktör reseptörü) ekspresyonu keşfedilmiştir. Fibroblast benzeri tek tabaka halinde büyüyen hücrelerdir. İnkübeleme zamanı yaklaşık 48 saattir (111). Bahsi geçen tüm aşamalar ayrıntılarıyla alt başlıklarda anlatılmıştır.

### **Hücrelerin Çözülmesi**

- Önceden hazırlanan ve 4 °C'de saklanmakta olan %10 serum içeren ortamlar GMS-10 için DMEM, DBTRG-05MG için RPMI 1640) 37 °C'e ısıtıldı.
- Her bir hücre hattı için birer adet 25 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür kabı hazırlandı.

- Dondurma tüpleri içindeki hücreler azot tankından veya -80°C'den çıkarılarak hızlıca 37°C'de çözüldü.
- Çözünmüş olan hücreler pipet ile 2-3 kez süspanse edilerek 15 ml'lik steril tüplere aktarıldı ve üzerine 5 ml büyüme ortamı eklenerek pipet ile 1-2 kez alt üst edildi.
- Tüpler 1500 rpm'de 5 dk santrifüjlendi.
- Üst faz atılıp, dipte kalan çökelti 2-3 ml büyüme ortamı ile süspanse edilerek ve uygun kültür kaplarına aktararak üzeri ortam ile uygun hacme tamamlandı.
- 1 gün sonra (16-20 saat) hücrelerin morfolojileri ve yüzeye tutunma oranları ters-faz ışık mikroskop (Olympus, Japonya) ile değerlendirildi.

### **Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi**

- Hücre süspanسیونunda bulunan hücrelerin %0,4'lük tripan mavisi ile canlılıkları kontrol edildi.
- 1:1 oranında hücre süspanسیونu örneği ile tripan mavisi bir ependorf içinde karıştırıldı.
- Lam üzerine hafifçe karıştırılarak ekildi.
- Yaklaşık 2-3 dakika bekletildikten sonra ters faz ışık mikroskopunda (Olympus, Japonya) canlı ve ölü hücrelerin tümü sayıldı.
- Tripan mavisi ile boyanmayan hücrelerin yüzdesi hesaplandı.
- Hücre süspanسیونunun mililitresindeki hücre sayısını (hücre sayısı/mL) belirlemek için hesaplama yapıldı.
- **Hesaplama:** Ortalama sayım değeri x seyreltme faktörü x  $10^4$

### **Hücrelerin Kültür Ortamında İdamesi**

- Ekimi yapılan hücreler 1 gün sonra ters faz ışık mikroskop ile kontrol edildi.
- GMS-10 hücrelerinin ortamı taze DMEM ile, DBTRG-05MG hücrelerinin ortamı taze RPMI 1640 ile değiştirildi.
- Her iki hücre hattı da iki gün sonunda % 90 doluluğa eriştiğinden pasajlanması gerekti.

### **Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması**

- Hücre kültür kaplarının içindeki ortam atıldı.

- Hücre kültür kapları steril PBS ile yıkandı.
- 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür kaplarına 2 mL önceden 37°C' ye ısıtılmış tripsin/EDTA ilave edildi.
- Hücre kültür kapları 5 dakika 37°C' de inkübatörde bekletildi. İnkübatörden alınan hücreler mikroskopta kontrol edildi ve kalkmayan hücreler flask tabanına hafifçe vurularak kaldırıldı.
- Hücrelerin kültür kabının yüzeyinden ayrıldığı mikroskop altında izlendikten sonra hücre kültür kaplarına en az tripsin/EDTA hacmi kadar büyüme ortamı ilave edildi ve 1-2 pipetaj yapıldıktan sonra ayrılan hücreler eşit miktarlarda diğer flasklara dağıtıldı. Üzerlerine yeterli miktarda taze ortam eklendi ve 37°C' lik inkübatöre kaldırıldı.

### **Hücrelerin Sayılması**

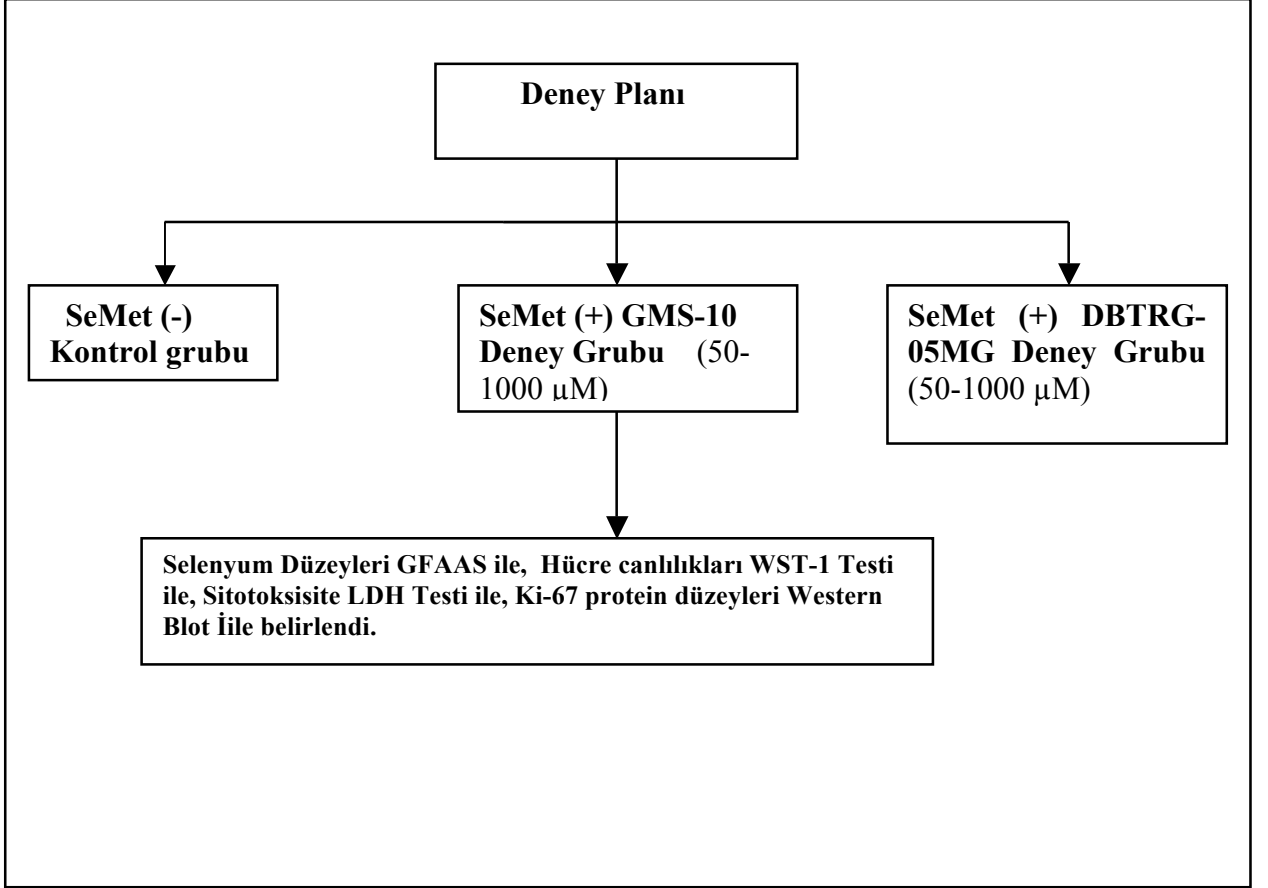
- Hücrelerin pasajlanması işleminde ilk basamaklar aynen yapıldıktan sonra homojen hale getirilen hücre süspansiyonundan 100 µL alındı.
- 1:1 seyreltilmiş hücre süspansiyonundan 10 µL alınarak *Neubauer Lamı* ve lamel arasına yayıldı.
- Ters-faz ışık mikroskopunda (Olympus, Japonya) 20 x büyütmede sayım yapıldı. *Neubauer* lamının mümkünse tüm kareleri veya hücre sayısı fazla ise 16 küçük kare içeren 4 farklı alanı sayılarak ortalaması alındı.
- Hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısını (hücre sayısı/mL) belirlemek için hesaplama yapıldı.

**Hesaplama:** Ortalama sayım değer x seyreltme faktörü x 10<sup>4</sup>

### **3.5.2. *İn vitro* Deneyler**

*İn vitro* deneyler için gerekli hücre sayısına ulaşıldıktan sonra deney setleri hazırlandı. Bu deneylerde GMS-10 hücre hattı pasaj sıfır (P0) ile pasaj sekiz (P8) aralığında kullanılırken DBTRG-05MG'de pasaj 11 (P11)'e kadar idameye devam edildi. Hücre ekiminin ertesi günü *in vitro* deneylere başlandı. Kültür ortamları taze Opti-MEM (Biological Industries, İsrail) idame ortamı ile değiştirildi. Bu ortama hücrelerin çoğalmasını önlemek amacıyla geçilmiştir. Bütün deneylerde her ayrı kültür koşulu için en

az üç eş örnek (triplicate) kullanılarak üç farklı zamanda deneyler üç kez tekrarlanarak çalışıldı.



Şekil 4. Deney Akış Şeması

#### Hücelere Uygulanacak Seleno-L-metiyoninin Hazırlanması

*In vitro* deneylerde kullanılan Seleno-L-metiyonin (S3132, Sigma) her deney seti için taze olarak hazırlandı. Katı haldeki seleno-L-metiyoninden hava ile teması mümkün olduğunca kısa tutularak 9,8055 mg tartıldı ve 2 mL ultra saf su içinde steril koşullarda çözünmesi sağlandı. Elde edilen 25 mM'lık çözelti 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek hücelere verilmeye hazır hale getirildi. Bu çözeltiden hazırlanan ara stok (2 mM) ve çalışma çözeltileri (1000, 500, 100 ve 50 µM) için tüm dilüsyonlar GMS-10 hücre hattı için DMEM, DBTRG-05MG hücre hattı için RPMI-1640 hücre ortamı kullanılarak yapıldı.

### 3.5.3. Selenyum Düzeyinin GFAAS ile Değerlendirilmesi

Biyolojik örneklerde Se düzeylerinin belirlenmesi için geliştirilmiş yöntemlerden biri grafit fırın atomik absorpsiyon spektrofotometre (GFAAS) cihazı kullanılarak ölçüm yapılmasıdır. Örnek benzetme yöntemi uygulayarak analiz öncesinde örnekler (hücre lizatı ve süpernatantlar) paladyum nitrat ile (matriks düzenleyici bir çözelti) 1/100 oranında dilüe edildi. Ölçümler, Perkin Elmer AAS cihazında grafit tüp ile Zeeman effect sistemi ile zemin düzeltmesi yapılarak gerçekleştirildi. Kör olarak matriks düzenleyici kullanıldı (112-114). Tablo 5’de analitik koşullar gösterilmiştir. Bu analitik koşullar, ön denemelerle lizat ve süpernatantlar için ayrı ayrı belirlenmiş ve çalışma ortamında optimum koşullar kullanılmıştır.

**Tablo 5.** GFAAS Analitik Koşulları

<b>Dalga boyu</b>	196 nm
<b>Slit genişliği</b>	0.5 nm
<b>Lamba akımı</b>	20 mA
<b>Sinyal modu</b>	Pik yüksekliği
<b>Gaz</b>	Argon
<b>Örnek volümü</b>	20 µL

#### Standart ve Örnek Hazırlama Basamakları

- 1000 ppm Stok Selenyum çözeltisinden (Titrisol Merck) üç kez 1 / 10 dilüsyon yapılarak 1 ppm ara stok hazırlandı.
- Hazırlanan bu ara stok kullanılarak 5 farklı konsantrasyonda standartlar hazırlandı.
- 0,1 N HCl ile dilüe edilerek 25 µg/L, 50 µg/L, 100 µg/L, 200 µg/L, 400 µg/L, 600 µg/L ve 800 µg/L’lik ara standartlardan paladyum nitrat ve magnezyum nitrat içeren matriks düzenleyici çözelti kullanılarak yapılan dilüsyon ile 5 µg/L, 10 µg/L, 20 µg/L, 40 µg/L, 80 µg/L, 100µg/L ve 200 µg/L’lik çalışma standartları hazırlandı.
- Hücre lizatları analiz öncesi, matriks düzenleyici çözelti ile 1/100 oranında dilüe edildi.
- Kör olarak matriks düzenleyici çözelti kullanıldı.

- Matriks düzenleyici çözelti ; 190 mg paladyum nitrat, 60 mg magnezyum nitrat yaklaşık 70 ml 0.1 N HCl içinde çözülüp 200 µL triton X-100 eklendikten sonra hacim HCl ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

**Tablo 6.** GFAAS Sıcaklık Programı

Basamak	Ramp/ Step	Sıcaklık (°C )	Süre (saniye)	Gaz (ml/dk)
Kurutma	R	120	60	1
Külleme	R	250	10	1
	R	1200	10	1
	S	1200	15	1
	S	1200	3	0
Atomizasyon	S	2200	3	0
Temizleme	S	2400	2	1
Soğutma	S	40	10	0

#### 3.5.4. Hücre Canlılık Testi (WST-1 testi)

WST-1 [2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum tuzu redüksiyonu yöntemiyle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin WST-1 boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır (115). Bu yöntem mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu soluk kırmızı renkli WST-1 boyası koyu sarı formazan ürününe dönüşmektedir. Bu yöntem hücrelerin WST-1 boyasıyla inkübasyonu ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır.

**Kit İçeriği (05 015 944 001, Roche) :** WST-1 boya çözeltisi 800 testlik

#### Uygulama Basamakları:

- 96 kuyulu plaklara ekilen hücreler ertesi gün belirlenen konsantrasyonlarda (50-1000 µM) selenyum bulunan serumu azaltılmış besiyerlerine alındı. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrasında içinde 100 µL besiyeri bulunan her kuyuya 10

$\mu$ L WST-1 boyası eklendi ve WST-1'in ortama iyice karışması için 5-10 sn el ile sallanarak karıştırıldı.

- Plaklar üzeri alüminyum folyo ile sarılarak 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>, %95 hava içeren inkübatörde GMS-10 hücreleri için 2,5 saat, DBTRG-05MG hücreleri için 2 saat bekletildi.
- Ölçüm öncesi 1 dakika çalkalayıcıda bırakıldı.
- ELİSA plak okuyucusunda 440 nm ve 600 nm referans dalga boyunda absorbans okutulması yapıldı.
- **Hesaplama: % Canlılık**= (Örnek Abs – Kör Abs/ (Ortalama Kontrol Abs- Ort. KÖr Abs)) x 100

### 3.5.5. Hücre Sitotoksisite Testi (LDH testi)

Hücre zarı bütünlüğü bozulmuş veya ölü hücrelerin oranı ' *Cytotoxicity Detection Kit*' (11 644 793 001, Roche) kullanılarak kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sitoplazmik bir enzim olan Laktat DeHidrogenazın (LDH) hasarlı hücreden ortama salınması ve ortamdaki enzim aktivitesinin iki basamaklı ölçümüne dayanmaktadır. Birinci basamakta laktat LDH enzimi ile pirüvata dönüşürken NAD<sup>+</sup> NADH/H<sup>+</sup> a indirgenir. İkinci basamakta kullanılan katalist (diaphorase) NADH/H<sup>+</sup> ın H/H<sup>+</sup> lerini soluk sarı renkli tetrazolyum tuzuna transfer eder ve kırmızı renkli formazan ürünü oluşturur. Oluşan ürün kolorimetrik olarak ölçülür (116). Örnek olarak hücresiz süpernatant kullanıldı. Çalışma çözeltisi hazırlandı. Örnekler dilüe edilerek çalışma çözeltisiyle 1:1 oranda karıştırıldı. Oda sıcaklığında, karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildi. Sonrasında üzerine durdurma çözeltisi eklendi. Plak okuyucuda 492 nm'de absorbansları okutuldu.

#### Uygulama Basamakları:

- Örnek olarak hücresiz süpernatant kullanıldığından deney modellerinin oluşturulduğu kuyulu plaklar, hücreleri ortamdaki tamamen uzaklaştırmak amacıyla 1250 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.
- 10  $\mu$ L süpernatant farklı bir kuyulu plağa alındı.
- Çalışma çözeltisinin (*Working Solution*) hazırlanması: -Mavi Kapak- Şişe 1 (katalist) 1 mL saf su ile çözülüp hazırlandıktan sonra -Kırmızı Kapak- Şişe 2'

deki boya çözeltisi ile kullanılmadan hemen önce 1:45 oranında karıştırıldı ve taze olarak kullanıldı.

- 10 µL süpernatant içeren kuyuların üzerine 90 µL saf su eklenerek örnekler 1:10 oranında seyreltilerek çalışıldı.
- Toplam 100 µL örneğin üzerine 100 µL çalışma çözeltisi eklendi.
- Oda sıcaklığında, karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildi.
- 50 µL 1 N HCl durdurma çözeltisi (*Stop Solution*) eklendi.
- 30 dakika içinde kuyulu hücre kültür kabının, plak okuyucusunda 492 nm'de absorbansları okutuldu.
- Deney koşullarına ait absorbans değerinden, ortalama kör absorbans değeri çıkartılarak net absorbans değerleri elde edildi.
- Daha sonra net absorbanslar maksimal ortalama absorbansa bölünerek % sitotoksosite hesaplandı.
- Her bir deney koşulu için % sitotoksosite aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı :  
**Koşulun absorbansı (Ortalama) – Blank (kör) absorbansı (ortalama) = Koşulun net absorbansı**
- **(Koşulun net absorbansı / maksimal (en yüksek) ortalama absorbansı) X 100 = % sitotoksosite**

### 3.5.6. Western Blot Analizi

Western Blot analizi, poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılmış olan protein karışımının içinde düzeyi ölçülmek istenen proteine özgü antikorunun kullanılmasına dayanan protein düzeyi belirleme yöntemidir. Western blot analizi; poliakrilamid jel elektroforezi ile proteinlerin ayrılması, proteinlerin membrana transferi ve ilgili proteinlerin görünür ve düzeyi ölçülebilir hale getirilmesi şeklinde üç aşamadan oluşmaktadır (117,118).

Hücre kültür lizatındaki Ki-67 (395 kDa) protein ekspresyonunun değerlendirilmesi amacıyla Western blot yapıldı. Ki-67 hücre proliferasyonunu göstermek için kullanılan önemli bir belirteçtir (25).

Kültüre glioblastom hücreleri lizis tamponunun içinde homojenize edildi ve hücre lizatı hazırlandı. Lizis tamponunun içeriği Tablo 7’de verilmiştir.

**Tablo 7.** Hücre lizis tampon içeriği

<b>Stok</b>	<b>Final Konsantrasyon</b>	<b>Hacim</b>
NP-40	%1	10,0 µL
3 M NaCl	150 mM	50,0 µL
1 M Tris pH 7.4	50 mM	50,0 µL
20 mM EDTA	1 mM	50,0 µL
Proteaz inhibitörleri (7x)	1x	142,8 µL
ddH <sub>2</sub> O		697,2 µL

Hücre lizatının hazırlanması:

1. Hücrelere lizis tamponu eklendi ve 1000 g’de 5 dk 4°C’de santrifüj edildi.
2. Örnekler DNA’yı parçalamak ve vizkoziteyi azaltmak amacı ile 15 dk sonike edildi.
3. Örnekler 95°C’de 15 dk su banyosunda tutuldu ve 1000 g’de 5 dk 4 °C’de santrifüj edildi.

Santrifüj aşamasından sonra örneklerin protein konsantrasyonu BCA protein analiz yöntemi ile belirlendi.

### **3.5.6.1. Protein Ölçümü**

Hücre lizatlarındaki protein ölçümünde biçinkonik asit (BCA) yöntemi kullanıldı. Bu amaçla Thermo marka (Kat No: BCA, Protein assay Kit, 2325) protein analiz kiti kullanıldı. Yöntemde, bakır sülfat BCA çözeltisine eklendiğinde elma yeşili renk oluşturmakta; bu çözelti protein çözeltisine ilave edildiğinde, proteinin peptid bağları ile etkileşerek, alkali koşullar altında iki değerlikli Cu<sup>2+</sup> iyonları bir değerlikli Cu<sup>+</sup> iyonlarına indirgenerek mavi-mor renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır (119).

Protein standartı olarak bidistile su içinde 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 ve  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlarında sığır serum albumini (BSA) standartları hazırlandı. Standartların hazırlanışı Tablo 8’de gösterilmiştir.

**Tablo 8.** BSA standartlarının Hazırlanması

<b>Final Konsantrasyon</b>	<b>BSA miktarı*</b>	<b>dH2O</b>
0 $\mu\text{g/mL}$	0 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
100 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{L}$	90 $\mu\text{L}$
200 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{L}$	80 $\mu\text{L}$
400 $\mu\text{g/mL}$	40 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$
600 $\mu\text{g/mL}$	60 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$
800 $\mu\text{g/mL}$	80 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$
1000 $\mu\text{g/mL}$	55 $\mu\text{L}$	0 $\mu\text{L}$

(\* Stok BSA çözeltisi 1mg/mL konsantrasyonunda olduğunda geçerli değerlerdir)

- Standartlardan ve örneklerden 25’er  $\mu\text{L}$  96 kuyucuklu plağa konuldu.
- Çalışma çözeltisi; A reaktifi (biçinkonik asit çözeltisi, sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, biçinkonik asit ve sodyum tartarat) ve B reaktifinin (bakır sülfat çözeltisi) 1:50 oranında karıştırılmasıyla hazırlandı.
- 200  $\mu\text{L}$  çalışma çözeltisinden her kuyucuğa eklendi.
- 37 °C’de 30 dakika bekletildi.
- Örnek absorbanları 562 nm’de okundu.
- Protein konsantrasyonları standart grafiği kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar  $\mu\text{g/mL}$  olarak ifade edildi.

Protein örnekleri % 6 SDS-PAGE jel ile ayrımlandı. Daha sonra poliviniliden difilorür (PVDF) membranına transfer edildi ve transfer sonrası bloklama tamponunda inkübe edildi. Yıkama aşamalarından sonra örnekler HRP ile işaretli sekonder antikor ile inkübe edilerek ve yıkama aşamalarından sonra membran bir film kasedine aktarıldı. Görüntüleme için kemiluminesans yöntemine dayanan ECL kiti kullanıldı.

Kemiluminesans görüntü UVP jel dökümantasyon sistemi kullanılarak elde edildi. Tüm bu aşamalar ayrıntılarıyla aşağıda anlatılmıştır.

### **3.5.6.2. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) Jelinin Hazırlanması**

Jel yürütme işlemleri için Atto marka vertikal elektroforez sistemi kullanıldı. Bu sistem, AE-6220 Dual Slab Chamber elektroforez tankı ve Atto marka AE 6210 2 adet Slab Gel Cast jel kalıbı (ikişer adet 1mm'lik cam plaka, 12 kuyulu tarak ve conta) ve AE-8450 1000V güç kaynağından oluşmaktadır.

#### **Uygulama Basamakları :**

- Çalışmalara jellerin hazırlanması ile başlandı. 16x16 cm boyutlarında iki cam düzlemin arasına silikonlar yerleştirilip sıkıştırılarak jel kalıbı hazırlandı.
- Sızıntı olup olmadığı su ile kontrol edildikten sonra bir pipet yardımıyla Tablo 9'da gösterildiği gibi ayırıcı jel monomer karışımının polimerizasyonu amonyum persülfat (APS) ve tetrametiletildiamin (TEMED) eklenerek gerçekleştirildi ve pipet yardımıyla hazırlanan jel çözeltisi iki cam arasındaki boşluğa camın bir kenarından sızdırılarak döküldü. Poliakrilamid jeller monomerik akrilamidin poliakrilamid zincirlerine polimerizasyonu ve N,N'-metilen- bis akrilamid tarafından çapraz bağlanması sonucu oluşmaktadır. Polimerizasyon reaksiyonu APS'nin eklenmesi ile başlatılmaktadır. Reaksiyon APS'den serbest radikallerin oluşmasını katalize eden TEMED ile hızlandırılmaktadır.
- Jelin üst sınırının düzgün olması için hava ile temas eden yüzeyine propanol eklendi.
- Jel polimerize olduktan sonra üstteki propanol boşaltılıp su ile yıkandı.
- Paketleyici jel çözeltisi Tablo 10'da belirtildiği gibi hazırlandı ve ayırıcı jelin üstüne boşaltıldı. 12 kuyulu tarak 45<sup>0</sup> açı ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde iki cam arasına yerleştirildi. Polimerizasyona bırakıldı.

**Tablo 9.** SDS–PAGE yönteminde ayırıcı jelin (%6) hazırlanması

JEL BİLEŞENLERİ	HACİM
Saf su	8,500 mL
Akrilamid/Bisakrilamid (%29.2/%0.8 w/v)	3,200 mL
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	4,000 mL
% 10 SDS	0,160 mL
%10 (w/v) Amonyum persülfat	0,160 mL
TEMED	0,016 mL
Total karışım	16,000 mL

**Tablo 10.** SDS–PAGE yönteminde paketleyici jelin (%4) hazırlanması

JEL BİLEŞENLERİ	HACİM
Saf su	6,00 mL
Akrilamid/Bis-akrilamid(%29.2/%0.8 w/v)	1,33 mL
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2,50 mL
% 10 SDS	0,10 mL
%10 (w/v) amonyum persülfat	0,10 mL
TEMED	0,01 mL
Total karışım	10,00 mL

### 3.5.6.3. Örnek Hazırlanması

Kuyucuk başına 30  $\mu$ L’de yaklaşık 15  $\mu$ g protein olacak biçimde örnekler hazırlandı ve 95 °C’de 5 dakika tutuldu.

### 3.5.6.4. Jelin Yüklenmesi

Paketleyici jel polimerize olduktan sonra tarak çıkartıldı. İki cam arasında bulunan contalar çıkartılarak elektroforez tankı içine yerleştirildi ve 1 litre 1X yürütme tamponu (yürütme tamponu stok: Tris 15.1 g, Glisin 72 g, SDS 5 g, dH<sub>2</sub>O 1000 mL’de) ile

dolduruldu. Kuyulara protein örnekleri ve moleküler ağırlık standartı (Thermo PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 26619) yüklendi.

#### **3.5.6.5. Elektroforetik Yürütme**

Örnek yüklendikten hemen sonra sistem kapatıldı ve Atto Cell üzerine elektrotlar bağlandı. Örnekler ayırıcı jele girinceye kadar 100 Volt gerilim uygulandı. Örnek ayırıcı jele geçtikten sonra ise gerilim 120 Volt'a çıkarıldı. Brom fenol mavisi jelin alt ucuna varınca akım kesildi ve jel tanktan uzaklaştırıldı.

#### **3.5.6.6. Proteinlerin Membrana Transferi**

Çalışmamızda yarı-kuru transfer tekniği kullanıldı. Bu amaçla, ATTO marka elektroblotlama sistemi (AE-6675 HorizBlot ve AE-8450 1000VC güç kaynağı) kullanıldı.

- Transferde kullanılacak polivinilidendiflorid (PVDF) membran metanol ile doyuruldu. Filtre kağıtları (1703956 Thick blot paper 15x20cm) 1X transfer tamponu (Transfer stok çözeltisi: Tris 30.3 g, Glisin 14 g, dH<sub>2</sub>O, Total hacim 1000 mL) ile ıslatıldı.
- Western sandviçi hazırlandı: 2 adet filtre kağıdı (+) yüklü bloğa yerleştirildi, üzerine membran (Millipore, İmmobilon P, Kat No: IPVH09120; Sigma) ardından poliakrilamid jel yerleştirildi. Daha sonra filtre kağıtları transfer solüsyonu ile ıslatılarak en üste yerleştirildi. Bu aşamalar sırasında arada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. (-) yüklü blok kapatılarak 200 mA sabit akımda 2 saat süre ile transfer gerçekleştirildi. Transfer işlemlerini sonlandırmak için güç kaynağı kapatıldı ve sistemin kapağı açıldı. Membran dikkatlice alındı.

#### **3.5.6.7. Bloklama**

Spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla bloklama yapıldı. Değişik süt tozu ve BSA konsantrasyonları denenerek en uygun konsantrasyon (% 3 BSA) seçildi. Bu sonuçlar doğrultusunda, transfer sonrası proteinleri bağlamış olan membran, bloklama çözeltisi (Ki-67 için % 3 BSA ve kalneksin için % 5'lik süt tozu ve % 0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi) içinde 60 dakika oda sıcaklığında bloke edildi. Bu süre sonunda membran üç kez % 0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi (yıkama çözeltisi) ile 10 dakika süre ile yıkandı.

### **3.5.6.8. Primer Antikor ile İnkübasyon**

% 0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi içinde %5'lik süt tozu ve %3'lük BSA taze hazırlandı. Bloklama sonrasında membranlar, sırasıyla 1/500 oranında dilüe edilmiş kalneksin (Santa Cruz, sc-6465) antikorunu içeren %5'lik süt tozu ve 1/250 oranında dilüe edilmiş Ki-67 (Santa Cruz, sc-7844) antikorunu içeren %3'lük BSA ile +4 °C'de gece boyu inkübe edildi. Bu süre sonunda ortamdaki bağlanmamış antikor yıkama çözeltisi (% 0.05 NP-40 içeren % 10 PBS) ile 3 kez 10 dakika süre ile oda sıcaklığında yıkandı.

### **3.5.6.9. Sekonder antikor ile inkübasyon**

Yıkama sonrasında membran primer antikorunu tanıyan sekonder antikorlarla (donkey anti-goat IgG-Horseradish Peroxidase Conjugated Affinity Purified Antibody, Santa cruise, sc-2020) 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Sekonder antikorlar Ki-67 ve kalneksin için sırasıyla % 3 BSA ve % 5 süt tozu içinde 1/1000 oranında % 0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi içinde oranında hazırlandı. Bu sürenin sonunda membran tekrar yıkama çözeltisi ile 10 dakika süre ile 3 kez yıkandı.

### **3.5.6.10. Görüntüleme**

Sinyalin görünür hale getirilmesi amacıyla Perkin Elmer marka (NEL100001EA) ECL plus kiti kullanıldı (sinyal oluşturma çözeltisi: kit içindeki peroksit ve enhancer solüsyonları 1mL:1mL oranında karıştırılarak hazırlandı) Kit, *horseradish* peroksidaz enziminin hidrojen peroksit varlığında substratı olan luminolü oksitlemesi ve luminolün uyarılmış durumdan bazal duruma geçerken film üzerinde kemilüminesans ışımaya başlaması ilkesine dayanmaktadır. Bu filmlerin dansitometrik incelenmesi, protein düzeyinin belirtilmesini sağlamaktadır.

Film aşaması: Kaset içine şeffaf dosya yerleştirildi ve bu dosyanın içine membran kondu. Üzerine sinyal oluşturma çözeltisi eklendi. Kaset (Amersham, RPN 11649) içerisine karanlık odada film (Kodak Biomax Light Film, Katolog No: 1788207) yerleştirildi. Film banyosunda (Konica SRX-101) görüntü alındı.

Araştırmada kullanılan tüm cihazlar araştırmanın gerçekleştirildiği ARLAB'da bulunmakta ve aktif olarak kullanılmaktadır. Araştırmada kullanılan cihazlar ve ne amaçla kullanıldıkları Tablo 11'de gösterilmiştir.

**Tablo 11.** Araştırmada kullanılan mevcut cihaz listesi

<b>Adı/Modeli</b>	<b>Projede Kullanım Amacı</b>
Laminer flow kabinet, Heraus	Hücre kültürü
Ters Faz ışık mikroskop, Olympus	Hücre kültürü
Karbondioksit inkübatörü, Thermo	Hücre kültürü
Derin dondurucu, Heto	Örneklerin saklanması
Jel elektroforez sistemleri, Atta	Western blot
Güç kaynağı, Atta	Western blot
Jel görüntüleme sistemi, UVP	Western blot
ELISA plak okuyucu, Statfax 2100	WST-1, LDH Testleri
GFAAS, Perkin Elmer	Selenyum ölçümü
Otoklav aleti, Hirayama	Hücre kültürü malzemeleri için otoklavlama
Santrifüj aleti, Hettich Rotofix 32	Hücre kültüründe hücre çöktürme
Santrifüj aleti, Sigma 2K15C	Hücre kültüründe protein eldesi
Derin dondurucu (-80) / Sanyo	Reaktiflerin ve stok kimyasal maddelerin saklanması
Derin dondurucu (-20) / Arçelik	Reaktiflerin ve stok kimyasal maddelerin saklanması
Buzdolabı (+4) / İndesit	Reaktiflerin ve stok kimyasal maddelerin saklanması

### 3.6. Araştırma Takvimi

<b>Projelendirme</b>	<b>Aralık 2010 – Mart 2011</b>
<b>Hücre Kültürü</b>	<b>Şubat-Nisan 2012</b>
<b>WST-1 ve LDH Analizleri</b>	<b>Nisan-Mayıs 2012</b>
<b>GFAAS Analizleri</b>	<b>Mayıs-Haziran 2012</b>
<b>Western Blot Analizleri</b>	<b>Temmuz- Kasım 2012</b>
<b>Tez Yazımı</b>	<b>Kasım-Aralık 2012</b>

### 3.7. Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırma sonuçlarının istatistik analizi SPSS 19.0 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Gruplara ait ortalama hücre proliferasyon ve sitotoksosite değerleri Mann Whitney U testi kullanılarak karşılaştırdı. Bulgular arası korelasyon analizi Pearson testi kullanılarak belirlendi (120).  $p < 0.05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma biçiminde verildi.

### 3.8. Araştırmanın sınırlılıkları

Araştırmamız bir *in vitro* çalışmadır. Bilindiği gibi hücre kültürü çalışmalarının sonuçları değerlendirilirken doğrudan organizmaya uyarlanması ve uygulanması mümkün değildir. Ayrıca çalışmamızda primer hücre kültürü eldesi ve idamesi zor olduğundan uygulanmamıştır. Sağlıklı hücrelerin ticari olarak satın alınması araştırma bütçesi göz önüne alındığında mümkün olmadığından kontrol olarak insan astrositom hücreleri kullanılamamıştır. Ancak, her bir hücre hattında, selenometiyoninin etkileri, kontrol olarak aynı hücre hatlarına selenometiyonin uygulanmayan koşullar ile karşılaştırılarak değerlendirme yoluna gidilmiştir.

### 3.9. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu 15.02.2011 tarih ve 2011/04-13 no.lu kararında; 69-GOA protokol numaralı çalışmamızın etik açıdan sakıncalı olmadığına karar vermiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Seleno-L-metiyonin uygulaması ile hücre içine alınan selenyum düzeylerinin belirlenmesi

24, 48 ve 72 saat 50, 100, 500, 1000  $\mu\text{M}$  SeMet ile inkübe edilen GMS-10 ve DBTRG-05MG insan glioblastoma multiforme hücrelerinde hücre içine alınan selenyum düzeyleri GFAAS ile değerlendirildi (Tablo 12, Tablo 13). Konsantrasyon bulguları  $\mu\text{g/L}$  cinsinden verilmiştir. Tablolarda bulgular ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmektedir. Kontrol grubu SeMet uygulanmayan gruptur.

**Tablo 12.** SeMet ile inkübasyon sonucu GMS-10 hücreleri tarafından hücre içine alınan selenyum düzeyleri ( $\mu\text{g/L}$ )

Koşullar	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol	1,8 $\pm$ 0,64	0,7 $\pm$ 0,6	0,2 $\pm$ 1,41
50 $\mu\text{M}$ SeMet	8,0 $\pm$ 0,0	11,3 $\pm$ 0,44	9,7 $\pm$ 0,10
100 $\mu\text{M}$ SeMet	11,6 $\pm$ 0,12	44,5 $\pm$ 1,03	15,1 $\pm$ 0,22
500 $\mu\text{M}$ SeMet	66,8 $\pm$ 0,62	76,7 $\pm$ 1,35	38,7 $\pm$ 2,18
1000 $\mu\text{M}$ SeMet	84,1 $\pm$ 1,76	116,1 $\pm$ 0,14	65,7 $\pm$ 0,19

**Tablo 13.** SeMet ile inkübasyon sonucu DBTRG-05MG hücreleri tarafından hücre içine alınan selenyum düzeyleri ( $\mu\text{g/L}$ )

Koşullar	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol	9,9 $\pm$ 0,00	0,5 $\pm$ 0,27	0,8 $\pm$ 0,00
50 $\mu\text{M}$ SeMet	16,7 $\pm$ 1,73	53,6 $\pm$ 1,64	16,8 $\pm$ 0,12
100 $\mu\text{M}$ SeMet	42,2 $\pm$ 0,02	79,3 $\pm$ 1,05	18,1 $\pm$ 1,15
500 $\mu\text{M}$ SeMet	44,1 $\pm$ 1,11	109,6 $\pm$ 0,35	88,0 $\pm$ 12,65
1000 $\mu\text{M}$ SeMet	91,3 $\pm$ 4,19	125,2 $\pm$ 4,95	100,2 $\pm$ 11,65

Tüm deney bulgularında istatistiksel olarak kontrole göre anlamlı değişim gösteren dozlar grafik üzerinde gösterilmiştir. \*  $p < 0,05$  ve \*\*  $p < 0,01$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. P değerleri Tablo 14 ve Tablo 15’de gösterilmiştir.

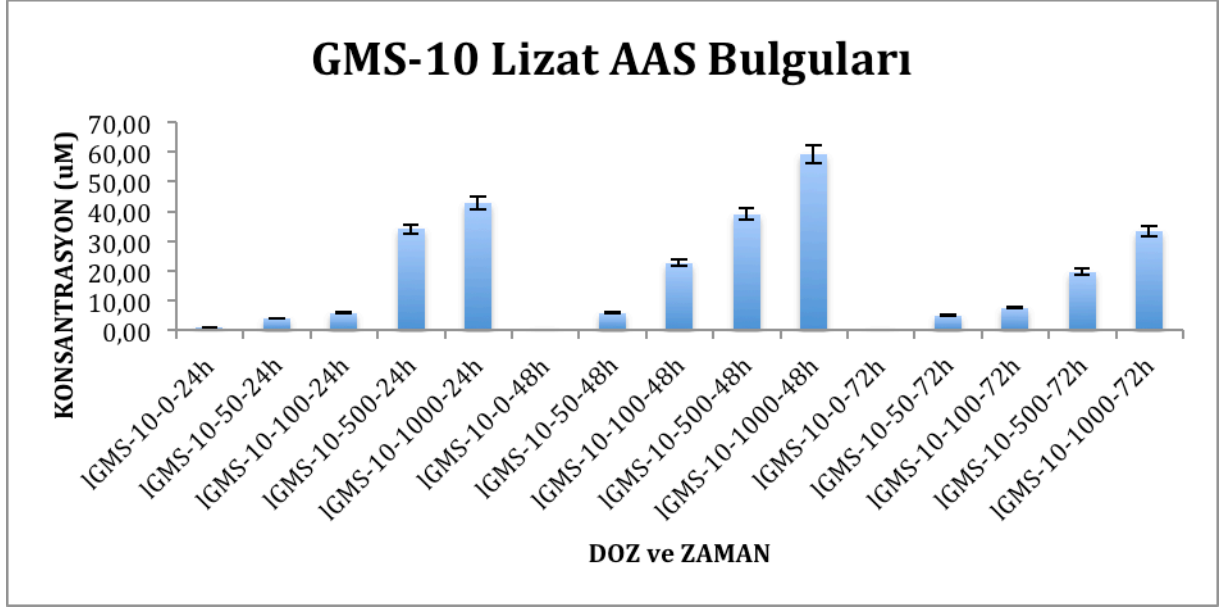
**Tablo 14.** SeMet ile inkübasyon sonucu GMS-10 hücreleri tarafından hücre içine alınan selenyum düzeylerinin “p” değerleri.

<b>Kontrol</b>	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>50 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,221	0,121	0,121
<b>100 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,121	0,121	0,121
<b>500 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,121	0,121	0,121
<b>1000 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,121	0,121	0,121

**Tablo 15.** SeMet ile inkübasyon sonucu DBTRG-05MG hücreleri tarafından hücre içine alınan selenyum düzeylerinin “p” değerleri.

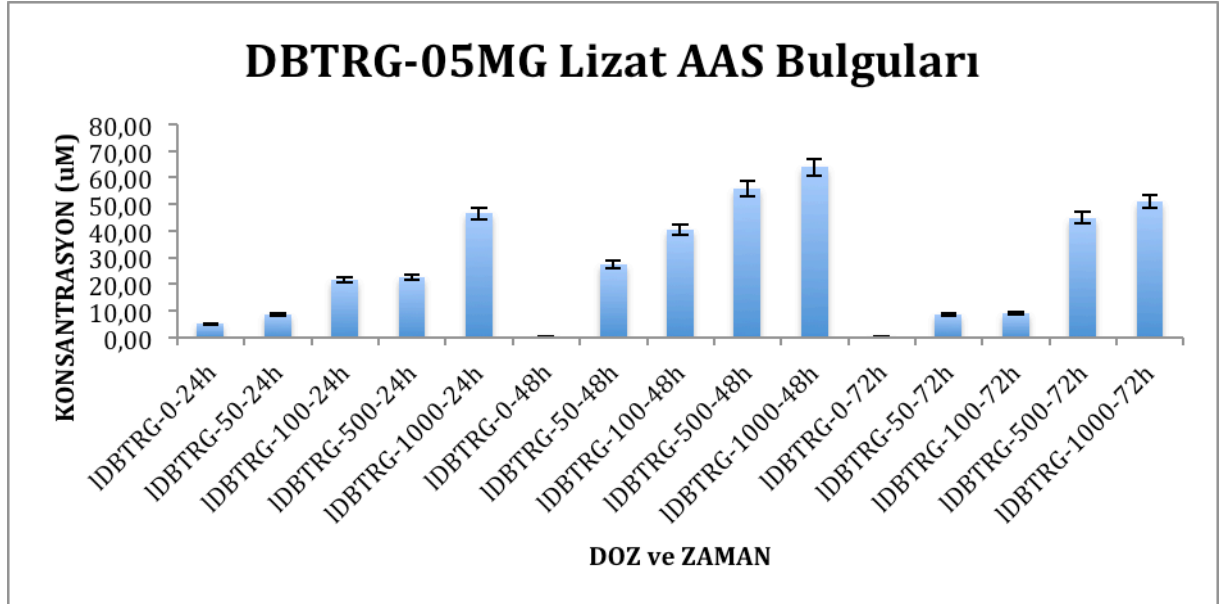
<b>Kontrol</b>	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>50 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,221	0,121	0,221
<b>100 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,221	0,121	0,221
<b>500 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,221	0,121	0,221
<b>1000 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,221	0,121	0,221

GMS-10 ve DBTRG-05MG glioblastoma multiforme hücre hatlarının 24, 48 ve 72 saat farklı konsantrasyonlarda selenyum içeren besiyeri ile inkübasyonu sonunda hücre içine alınan selenyum düzeylerine ait GFAAS bulguları Şekil 5 ve Şekil 6’da gösterilmiştir.



Şekil 5. GMS-10 hücrelerinde zamanla hücre içine alınan Se düzeyi

24, 48 ve 72 saat değişik dozlarda SeMet ile inkübe edilen GMS-10 hücrelerinde hücre içine alınan selenyum düzeyleri GFAAS ile değerlendirildi ve hücre içine alınan Se düzeyinin 48 saat inkübasyonda her dozda en yüksek olduğu görüldü. Kontrole göre anlamlı değişiklik saptanmadı.



Şekil 6. DBTRG-05MG hücrelerinde zamanla hücre içine alınan Se düzeyi

24, 48 ve 72 saat değişik dozlarda SeMet ile inkübe edilen DBTRG-05MG hücrelerinde hücre içine alınan selenyum düzeyleri GFAAS ile değerlendirildi ve hücre

içine alınan Se düzeyinin 48 saat inkübasyonda her dozda en yüksek olduğu görüldü. Kontrole göre anlamlı değişiklik saptanmadı.

#### 4.2. Seleno-L-metiyonin uygulaması ile süpernatantlardaki selenyum düzeylerinin belirlenmesi

24, 48 ve 72 saat 50, 100, 500, 1000 µM SeMet ile inkübe edilen GMS-10 ve DBTRG-05MG insan glioblastoma multiforme hücrelerinde süpernatantlardaki selenyum düzeyleri GFAAS ile değerlendirildi (Tablo 16, Tablo 17). Konsantrasyon bulguları µg/L cinsinden verilmiştir. Tablolarda bulgular ortalama ± standart sapma olarak verilmektedir. Kontrol grubu SeMet uygulanmayan gruptur.

**Tablo 16.** SeMet ile inkübasyon sonucu GMS-10 hücrelerine ait süpernatantlardaki selenyum düzeyleri (µg/L)

Koşullar	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol	-8,3 ± 0,10	-8,2 ± 0,41	-8,2 ± 0,96
50 µM SeMet	32,7 ± 0,17	27,8 ± 0,21	24,1 ± 0,14
100 µM SeMet	72,2 ± 0,75	82,3 ± 0,18	62,7 ± 0,39
500 µM SeMet	337,0 ± 0,35	406,8 ± 7,14	339,6 ± 7,42
1000 µM SeMet	675,2 ± 3,82	626,4 ± 0,14	662,3 ± 3,68

**Tablo 17.** SeMet ile inkübasyon sonucu DBTRG-05MG hücrelerine ait süpernatantlardaki selenyum düzeyleri (µg/L)

Koşullar	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol	-8,2 ± 0,78	-8,4 ± 0,04	-7,9 ± 1,57
50 µM SeMet	22,9 ± 0,71	34,4 ± 0,81	33,5 ± 0,73
100 µM SeMet	65,5 ± 0,07	76,4 ± 0,20	67,2 ± 0,90
500 µM SeMet	142,3 ± 0,85	399,2 ± 0,99	384,7 ± 6,51
1000 µM SeMet	396,6 ± 3,68	663,1 ± 0,28	635,6 ± 6,15

Tüm deney bulgularında istatistiksel olarak kontrole göre anlamlı değişim gösteren dozlar grafik üzerinde gösterilmiştir. \*  $p < 0,05$  ve \*\*  $p < 0,01$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.  $p$  değerleri Tablo 18 ve Tablo 19’da gösterilmiştir.

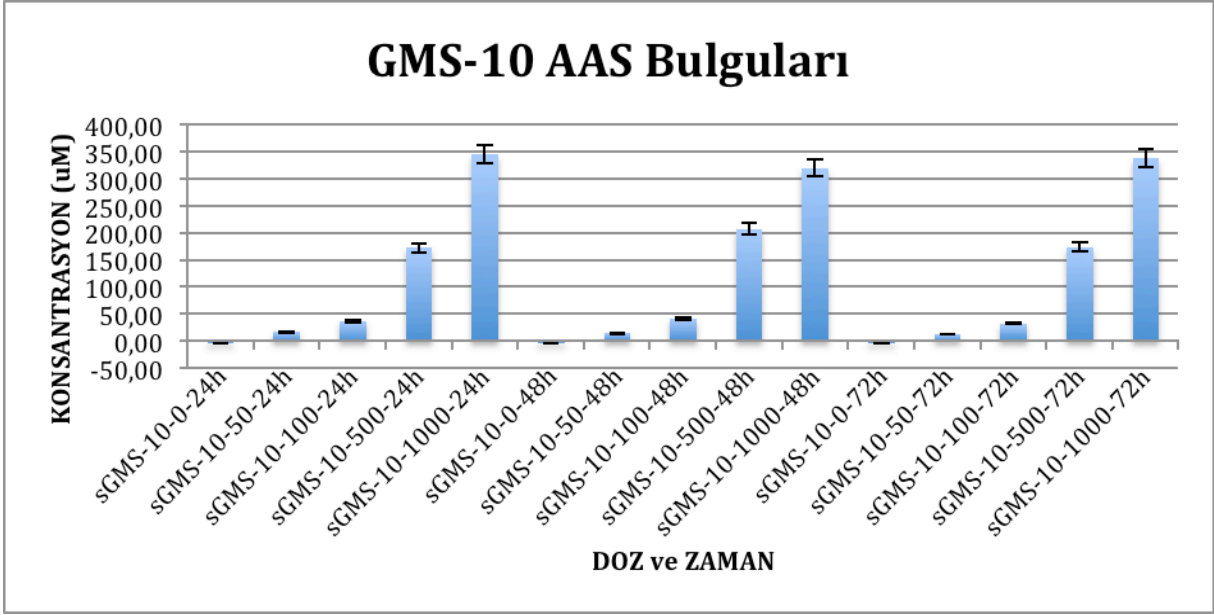
**Tablo 18.** SeMet ile inkübasyon sonucu GMS-10 hücrelerinin süpernatantlarındaki selenyum düzeylerine ait “ $p$ ” değerleri.

<b>Kontrol</b>	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>50 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,121	0,121	0,121
<b>100 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,121	0,121	0,121
<b>500 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,121	0,121	0,121
<b>1000 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,121	0,121	0,121

**Tablo 19.** SeMet ile inkübe edilen DBTRG-05MG hücrelerinin süpernatantlarındaki selenyum düzeylerine ait “ $p$ ” değerleri.

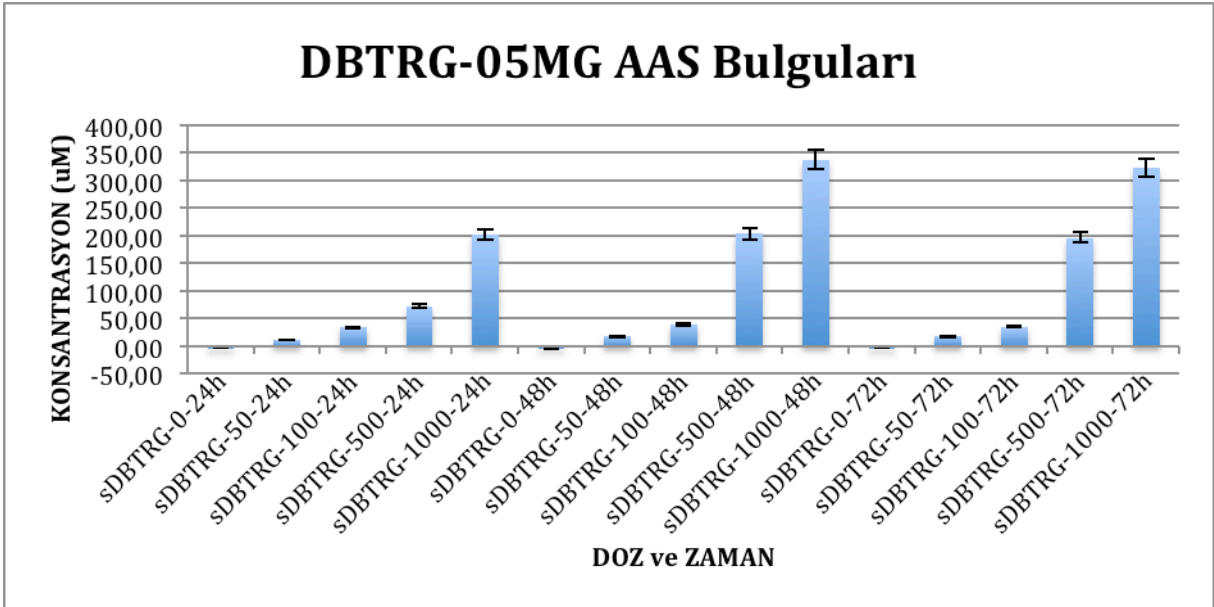
<b>Kontrol</b>	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>50 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,121	0,121	0,121
<b>100 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,121	0,121	0,121
<b>500 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,121	0,121	0,121
<b>1000 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,121	0,121	0,121

GMS-10 ve DBTRG-05MG glioblastoma multiforme hücre hatlarının 24, 48 ve 72 saat farklı konsantrasyonlarda selenyum içeren besiyeri ile inkübasyonu sonunda süpernatantlarındaki selenyum düzeylerine ait GFAAS bulguları Şekil 7 ve Şekil 8 ’de gösterilmiştir.



Şekil 7. GMS-10 hücreleri süpernatantlarındaki Se düzeyleri

24, 48 ve 72 saat değişik dozlarda SeMet ile inkübe edilen GMS-10 hücreleri süpernatantlarındaki selenyum düzeyleri GFAAS ile değerlendirildi ve kontrole göre anlamlı değişiklik saptanmadı.



Şekil 8. DBTRG-05MG hücreleri süpernatantlarındaki Se düzeyleri

24, 48 ve 72 saat değişik dozlarda SeMet ile inkübe edilen DBTRG-05MG hücreleri süpernatantlarındaki selenyum düzeyleri GFAAS ile değerlendirildi ve kontrole göre anlamlı değişiklik saptanmadı.

Her iki hücre hattı için verilen SeMet'in hücre içine alındığı süpernatantlardaki düzeyden de saptandı.

#### 4.3. Seleno-L-metiyonin uygulanması ile proliferasyon-doza eğrisinin WST-1 yöntemi ile belirlenmesi

50, 100, 500 ve 1000  $\mu\text{M}$  seleno-L-metiyonin ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılan insan glioblastoma multiforme hücrelerinde, zaman, hücre hattı ve doza bazında proliferasyon değişiklikleri olmuştur. Elde edilen net proliferasyon bulguları DBTRG-05MG için Tablo 20'de ve GMS-10 için Tablo 21'de verilmiştir. Bulgular ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmektedir. Kontrol grubu SeMet uygulanmayan gruptur.

**Tablo 20.** SeMet'in DBTRG-05MG hücrelerine etkisinin % proliferasyon bulguları.

Koşullar	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol	100,00	100,00	100,00
50 $\mu\text{M}$ SeMet	101,19 $\pm$ 3,02	91,46 $\pm$ 1,22	86,57 $\pm$ 0,22
100 $\mu\text{M}$ SeMet	98,40 $\pm$ 1,50	90,83 $\pm$ 2,28	63,46 $\pm$ 2,38
500 $\mu\text{M}$ SeMet	94,18 $\pm$ 2,43	77,85 $\pm$ 0,15	56,36 $\pm$ 2,70
1000 $\mu\text{M}$ SeMet	87,34 $\pm$ 3,70	73,72 $\pm$ 1,70	29,29 $\pm$ 2,71

**Tablo 21.** SeMet'in GMS-10 hücrelerine etkisinin % proliferasyon bulguları.

Koşullar	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol	100,00	100,00	100,00
50 $\mu\text{M}$ SeMet	108,14 $\pm$ 1,65	100,81 $\pm$ 2,67	82,76 $\pm$ 2,31
100 $\mu\text{M}$ SeMet	102,62 $\pm$ 1,36	93,15 $\pm$ 3,75	77,05 $\pm$ 2,81
500 $\mu\text{M}$ SeMet	94,93 $\pm$ 2,17	87,79 $\pm$ 2,48	51,95 $\pm$ 6,52
1000 $\mu\text{M}$ SeMet	93,57 $\pm$ 3,02	87,24 $\pm$ 1,89	37,76 $\pm$ 3,98

Tüm deney bulgularında istatistiksel olarak kontrole göre anlamlı değişim gösteren dozlar grafik üzerinde gösterilmiştir. \*  $p < 0,05$  ve \*\*  $p < 0,01$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. P değerleri Tablo 22 ve Tablo 23’de gösterilmiştir.

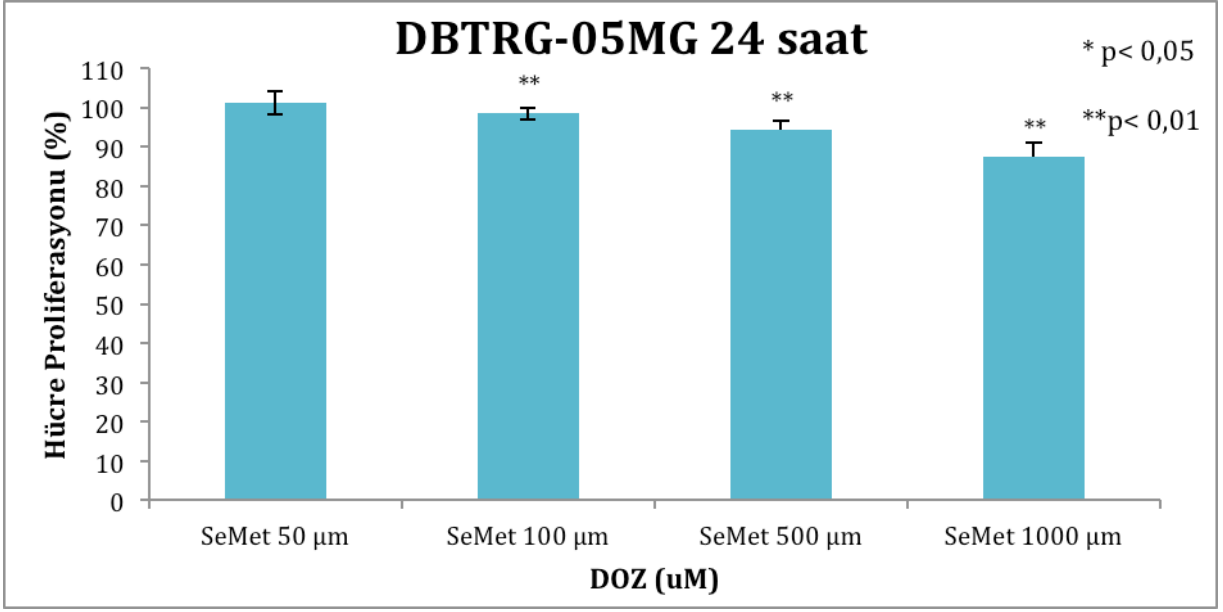
**Tablo 22.** SeMet’in GMS-10 hücrelerine etkisinin kontrole göre “p” değerleri.

<b>Kontrol</b>	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>50 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,007	0,577	0,007
<b>100 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,010	0,005	0,010
<b>500 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,007	0,007	0,010
<b>1000 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,007	0,007	0,005

**Tablo 23.** SeMet’in DBTRG-05MG hücrelerine etkisinin kontrole göre “p” değerleri.

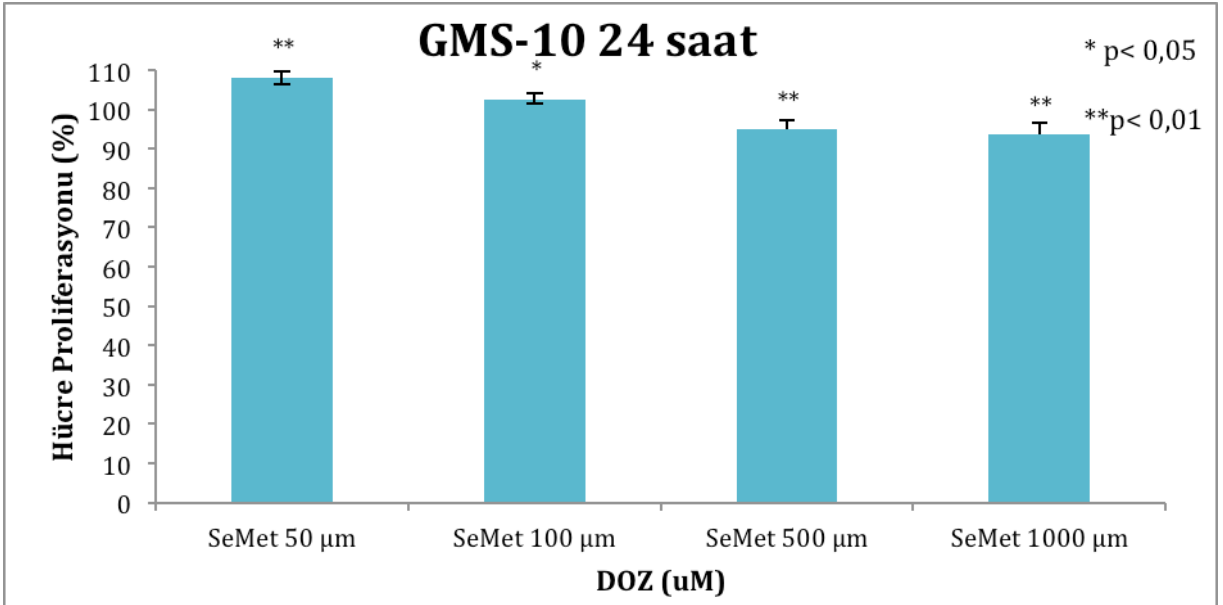
<b>Kontrol</b>	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>50 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,577	0,010	0,010
<b>100 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,005	0,010	0,005
<b>500 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,005	0,010	0,010
<b>1000 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,005	0,007	0,010

GMS-10 ve DBTRG-05MG glioblastoma multiforme hücre hatlarının 24 saatlik farklı konsantrasyonlarda selenyum içeren besiyeri ile inkübasyonu sonunda elde edilen WST-1 testi bulguları Şekil 9 ve Şekil 10’da gösterilmiştir.



**Şekil 9. SeMet'in DBTRG-05MG Hücre Hattına 24 saat inkübasyon sonucu WST-1 testi bulguları**

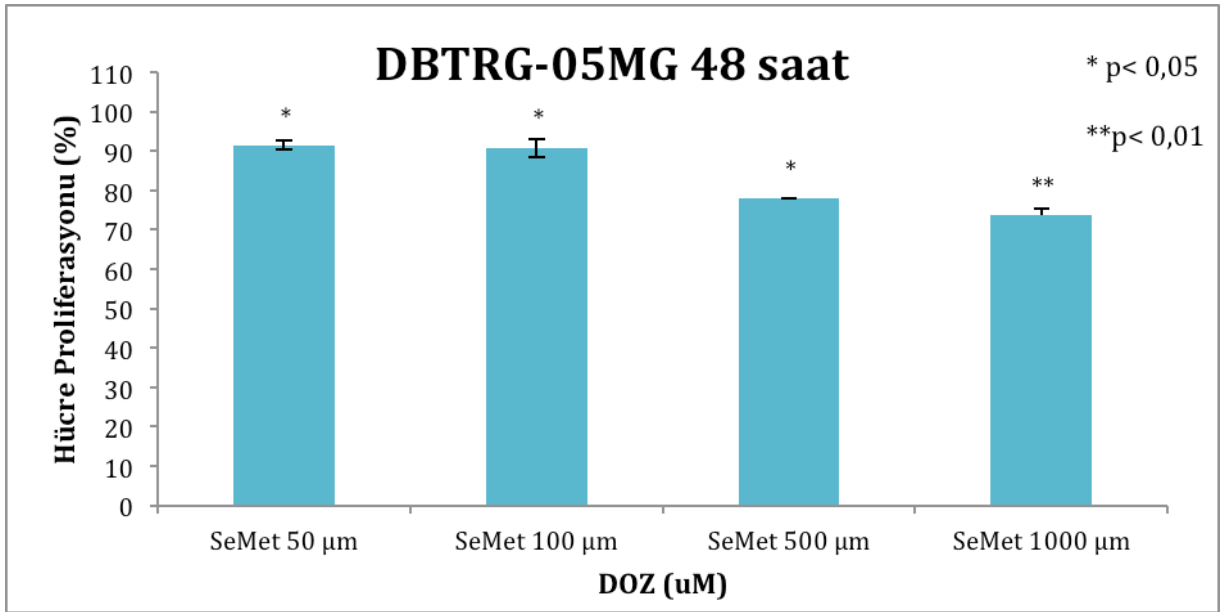
DBTRG-05MG hücreleri 24 saat, 50, 100, 500 ve 1000 µM SeMet ile inkübe edildi. Hücre proliferasyonu WST-1 testi ile değerlendirildi. SeMet'in doza bağımlı proliferasyonu azalttığı gözlemlendi.



**Şekil 10. SeMet'in GMS-10 Hücre Hattına 24 saat inkübasyon sonucu WST-1 testi bulguları**

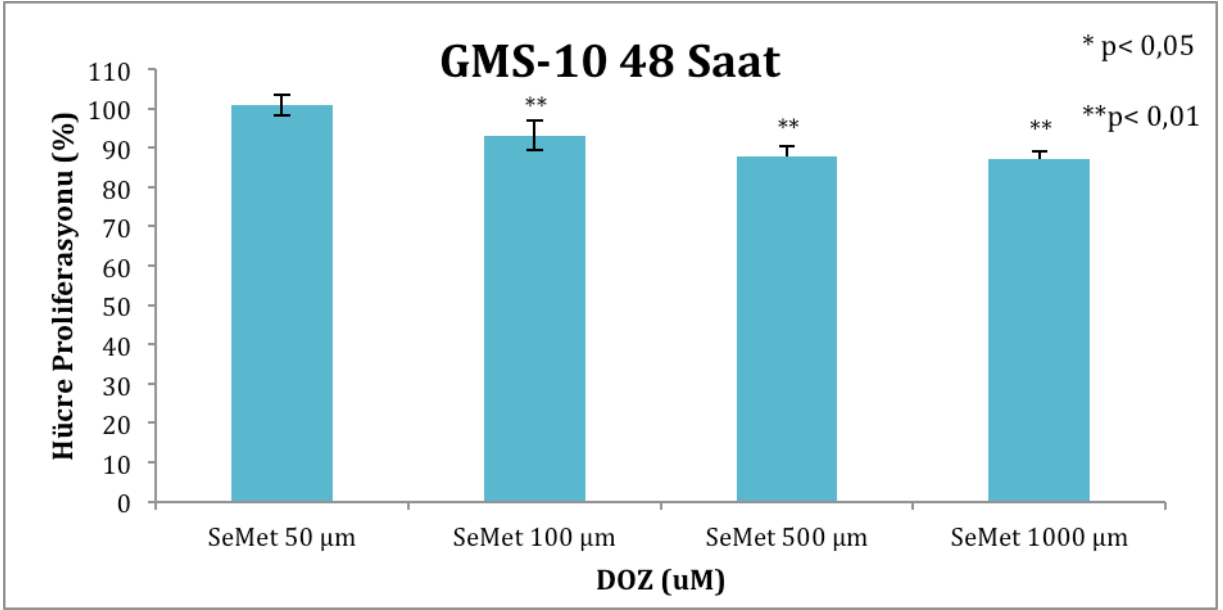
GMS-10 hücreleri 24 saat, 50, 100, 500 ve 1000  $\mu\text{M}$  SeMet ile inkübe edildi. Hücre proliferasyonu WST-1 testi ile değerlendirildi. SeMet'in düşük doz olarak Kabul edilen 50 ve 100  $\mu\text{M}$  dozlarda proliferasyonu arttırdığı gözlemlendi.

GMS-10 ve DBTRG-05MG glioblastoma multiforme hücre hatlarının 48 saatlik farklı konsantrasyonlarda selenyum içeren besiyeri ile inkübasyonu sonunda elde edilen WST-1 testi bulguları Şekil 11 ve Şekil 12 'de gösterilmiştir.



Şekil 11. SeMet'in DBTRG-05MG Hücre Hattına 48 saat inkübasyon sonucu WST-1 testi bulguları

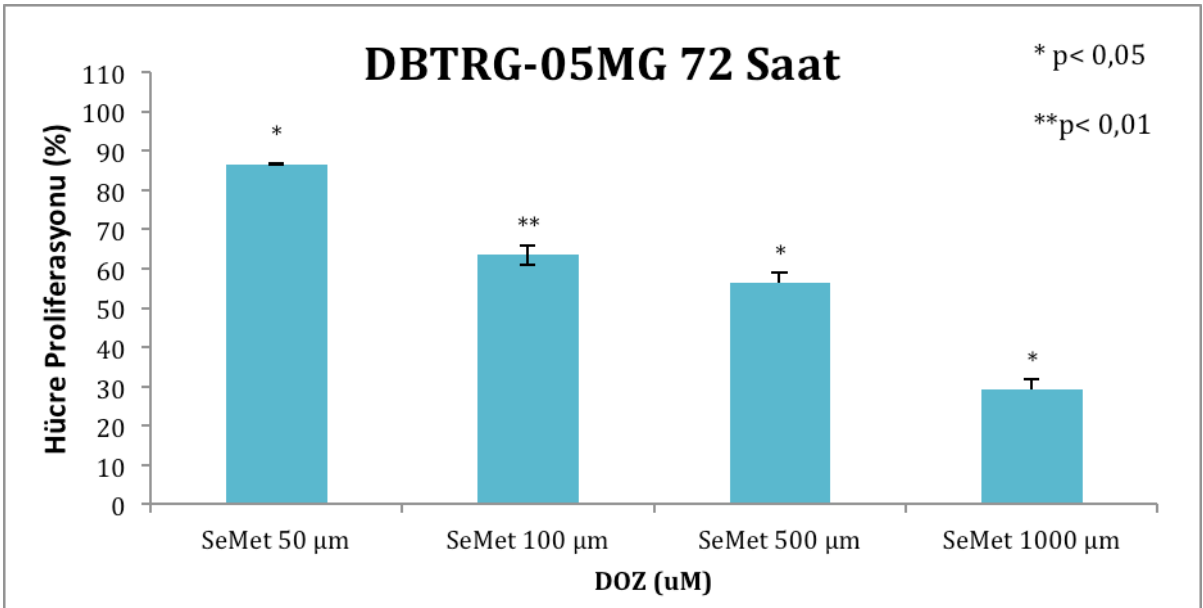
DBTRG-05MG hücreleri 48 saat, 50, 100, 500 ve 1000  $\mu\text{M}$  SeMet ile inkübe edildi. Hücre proliferasyonu WST-1 testi ile değerlendirildi. SeMet'in doza bağlı olarak proliferasyonu azalttığı gözlemlendi.



Şekil 12. SeMet'in GMS-10 Hücre Hattına 48 saat inkübasyon sonucu WST-1 testi bulguları

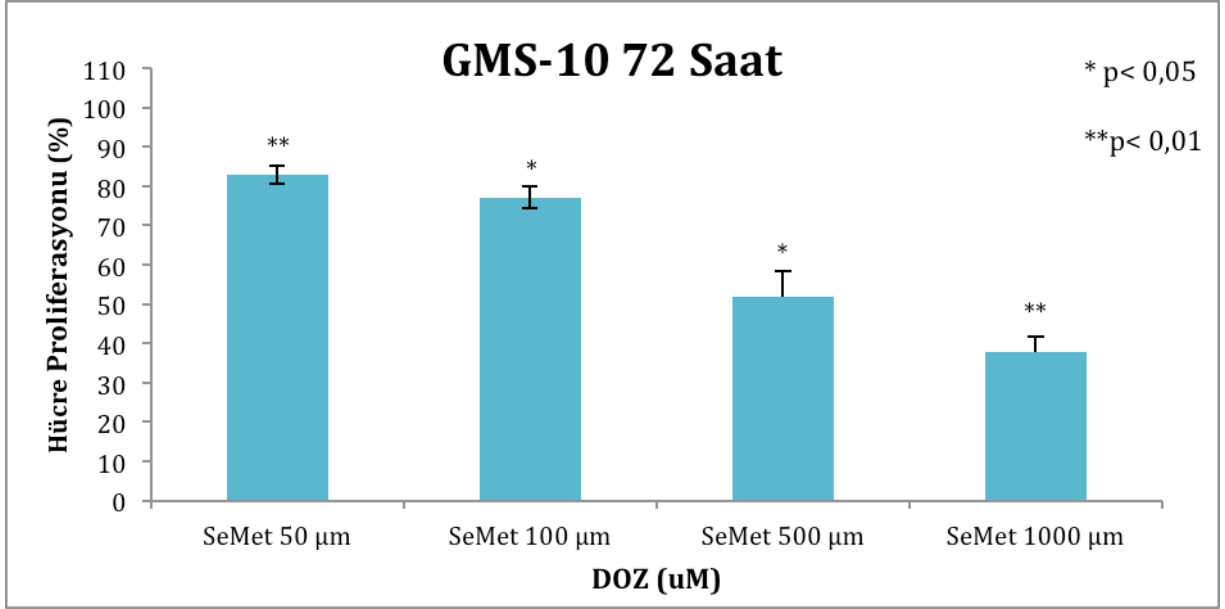
GMS-10 hücreleri 48 saat, 50, 100, 500 ve 1000 µM SeMet ile inkübe edildi. Hücre proliferasyonu WST-1 testi ile değerlendirildi. SeMet'in düşük doz olarak kabul ettiğimiz 50 µM doz dışındaki tüm dozlarda proliferasyonu azalttığı gözlemlendi.

GMS-10 ve DBTRG-05MG glioblastoma multiforme hücre hatlarının 72 saatlik farklı konsantrasyonlarda selenyum içeren besiyeri ile inkübasyonu sonunda elde edilen WST-1 testi bulguları Şekil 13 ve Şekil 14'de gösterilmiştir.



Şekil 13. SeMet'in DBTRG-05MG Hücre Hattına 72 saat inkübasyon sonucu WST-1 testi bulguları

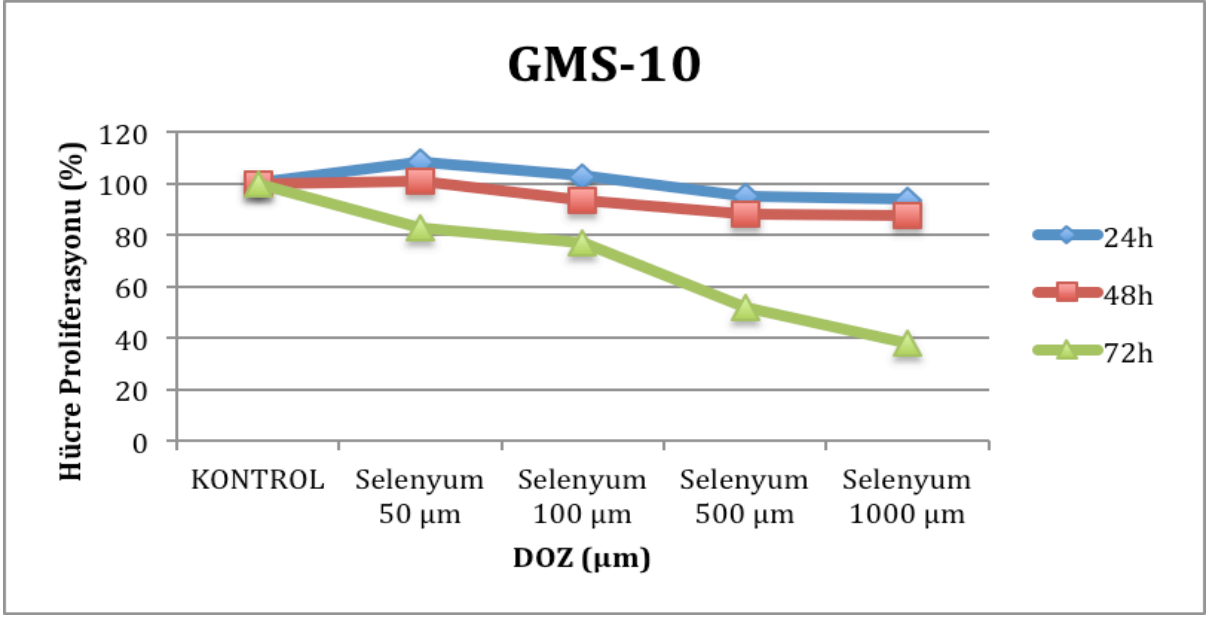
DBTRG-05MG hücreleri 72 saat, 50, 100, 500 ve 1000  $\mu$ M SeMet ile inkübe edildi. Hücre proliferasyonu WST-1 testi ile değerlendirildi. SeMet'in doza bağlı olarak proliferasyonu azalttığı gözlemlendi.



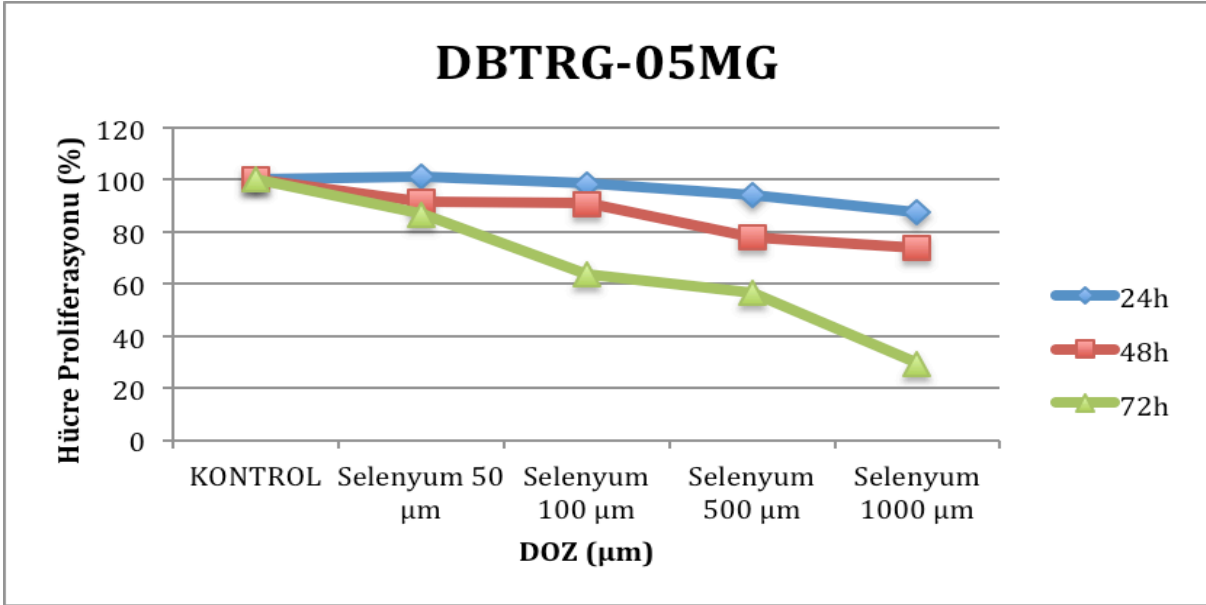
Şekil 14. SeMet'in GMS-10 Hücre Hattına 72 saat inkübasyon sonucu WST-1 testi bulguları

GMS-10 hücreleri 72 saat, 50, 100, 500 ve 1000  $\mu$ M SeMet ile inkübe edildi. Hücre proliferasyonu WST-1 testi ile değerlendirildi. SeMet'in doza bağlı olarak proliferasyonu azalttığı gözlemlendi.

Her iki hücre hattı için inhibitör konsantrasyonları (IC50) belirlendi. GMS-10 hücreleri için her üç inkübasyon süresi için oluşturulmuş dağılım grafiği Şekil 15'de DBTRG-05MG hücreleri için Şekil 16'da verilmiştir. Hücrelere ait IC50 değerleri Tablo 24'de gösterilmiştir.



Şekil 15. SeMet'in GMS-10 Hücre Hattına 24-48-72 saat inkübasyon sonucu WST-1 testi bulgularının dağılım grafiği

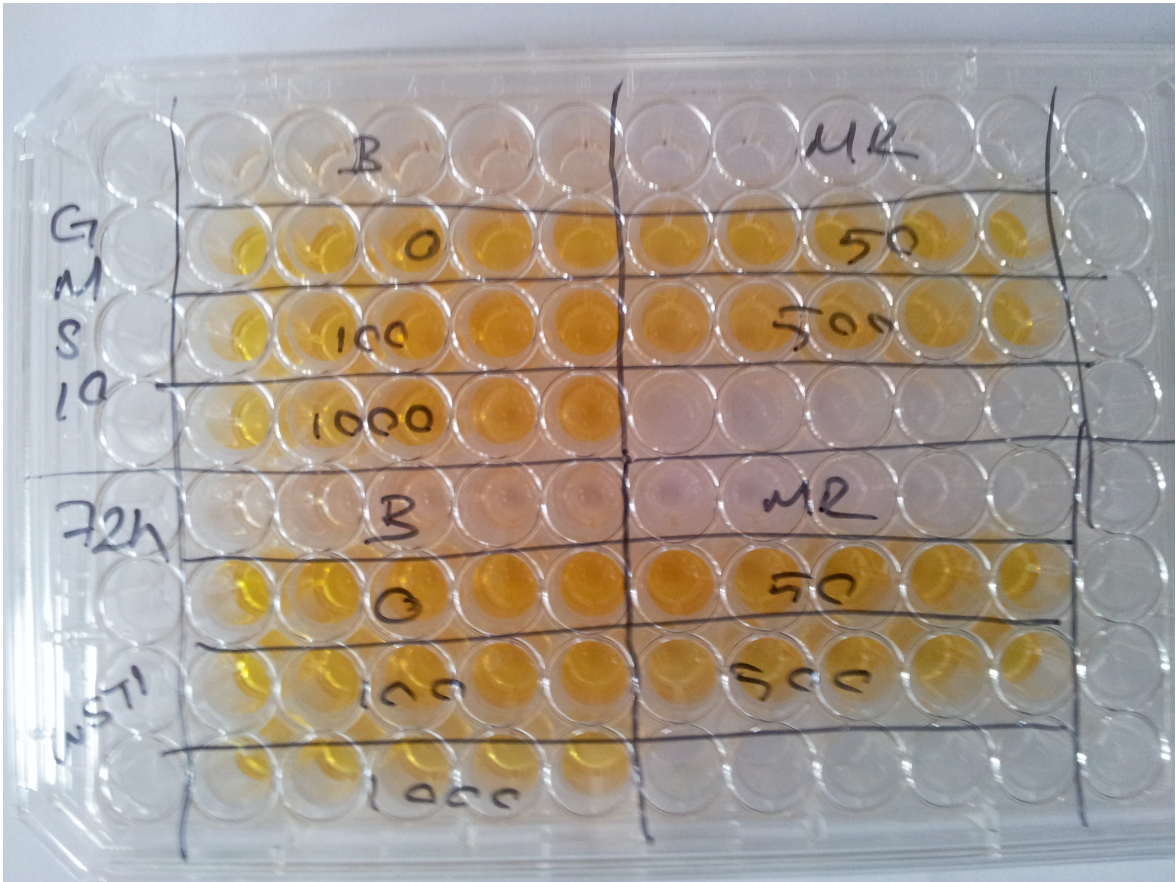


Şekil 16. SeMet'in DBTRG-05MG Hücre Hattına 24-48-72 saat inkübasyon sonucu WST-1 testi bulgularının dağılım grafiği

**Tablo 24. GMS-10 ve DBTRG-05MG Hücrelerine ait IC50 değerleri**

IC50	GMS-10	DBTRG-05MG
24 saat	>1000 $\mu$ M	>1000 $\mu$ M
48 saat	>1000 $\mu$ M	>1000 $\mu$ M
72 saat	628 $\mu$ M	585 $\mu$ M

Yapılan deneylere ait temsili plak görüntüsü Şekil 17’de verilmiştir.



**Şekil 17. WST-1 testi temsili plak görüntüsü**

#### 4.4. Seleno-L-metiyonin uygulanması sonrasında LDH salınımının LDH yöntemi ile belirlenmesi

50, 100, 500 ve 1000  $\mu\text{M}$  seleno-L-metiyonin ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılan insan glioblastoma multiforme hücrelerinde, zaman, hücre hattı ve doz bazında sitotoksosite değişiklikleri olmuştur. Elde edilen net sitotoksosite bulguları DBTRG-05MG için Tablo 25’de ve GMS-10 için Tablo 26’de sunulmaktadır. Bulgular ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmektedir. Kontrol grubu SeMet uygulanmayan gruptur.

**Tablo 25.** SeMet uygulanması sonrasında DBTRG-05MG hücrelerinde % sitotoksosite bulguları.

Koşullar	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol	7,56 $\pm$ 0,93	5,70 $\pm$ 0,68	10,98 $\pm$ 0,36
50 $\mu\text{M}$ SeMet	7,42 $\pm$ 0,64	5,65 $\pm$ 0,87	14,60 $\pm$ 3,47
100 $\mu\text{M}$ SeMet	7,39 $\pm$ 0,21	6,63 $\pm$ 1,40	26,59 $\pm$ 4,74
500 $\mu\text{M}$ SeMet	10,36 $\pm$ 0,56	13,05 $\pm$ 2,28	44,37 $\pm$ 3,13
1000 $\mu\text{M}$ SeMet	11,55 $\pm$ 0,22	21,48 $\pm$ 2,91	55,93 $\pm$ 6,60

**Tablo 26.** SeMet uygulanması sonrasında GMS-10 hücrelerinde % sitotoksosite bulguları.

Koşullar	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol	11,78 $\pm$ 1,49	27,52 $\pm$ 4,32	27,05 $\pm$ 0,25
50 $\mu\text{M}$ SeMet	9,14 $\pm$ 2,16	23,88 $\pm$ 5,33	27,70 $\pm$ 1,38
100 $\mu\text{M}$ SeMet	9,44 $\pm$ 1,16	30,47 $\pm$ 1,12	33,51 $\pm$ 0,61
500 $\mu\text{M}$ SeMet	10,97 $\pm$ 1,17	36,68 $\pm$ 0,98	40,31 $\pm$ 1,38
1000 $\mu\text{M}$ SeMet	12,05 $\pm$ 0,70	39,14 $\pm$ 2,04	50,93 $\pm$ 1,33

Tüm deney bulgularında istatistiksel olarak kontrole göre anlamlı değişim gösteren dozlar grafik üzerinde işaretlenmiştir. \*  $p < 0,05$  ve \*\*  $p < 0,01$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. P değerleri Tablo 27 ve Tablo 28’de gösterilmiştir.

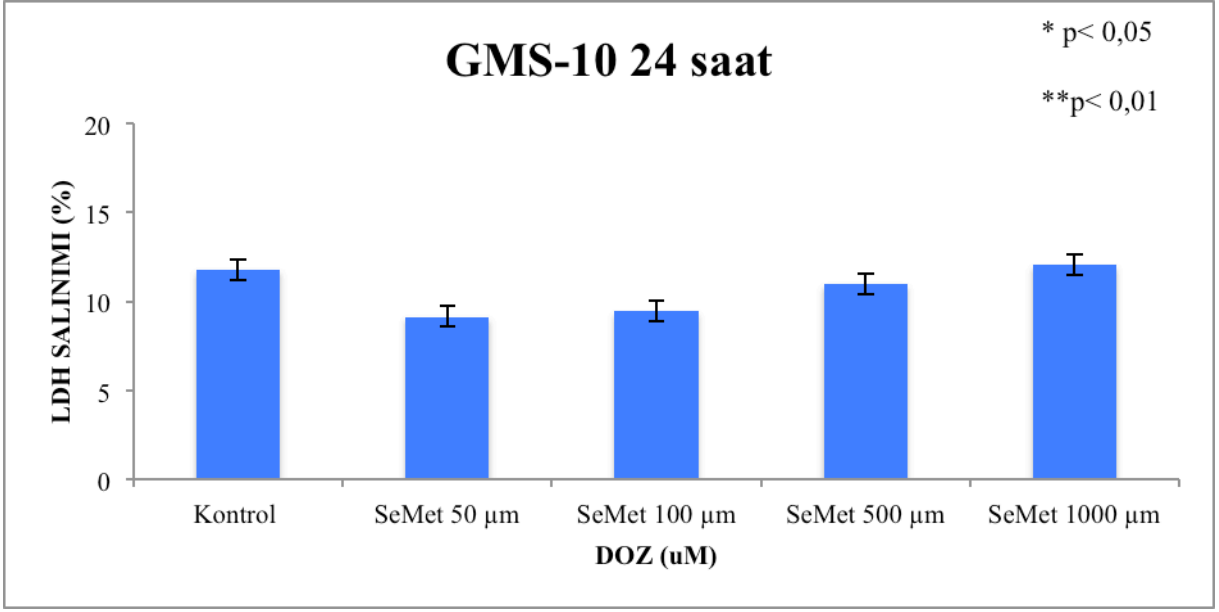
**Tablo 27.** GMS-10 hücrelerine değişik dozlarda SeMet uygulaması sonrasında elde edilen sitotoksosite bulgularının kontrol ile kıyaslanması ile bulunan “p” değerleri.

<b>Kontrol</b>	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>50 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,083	0,456	0,564
<b>100 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,050	0,275	0,083
<b>500 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,539	0,034	0,083
<b>1000 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,902	0,050	0,083

**Tablo 28.** DBTRG-05MG hücrelerine değişik dozlarda SeMet uygulaması sonrasında elde edilen sitotoksosite bulgularının kontrol ile kıyaslanması ile bulunan “p” değerleri.

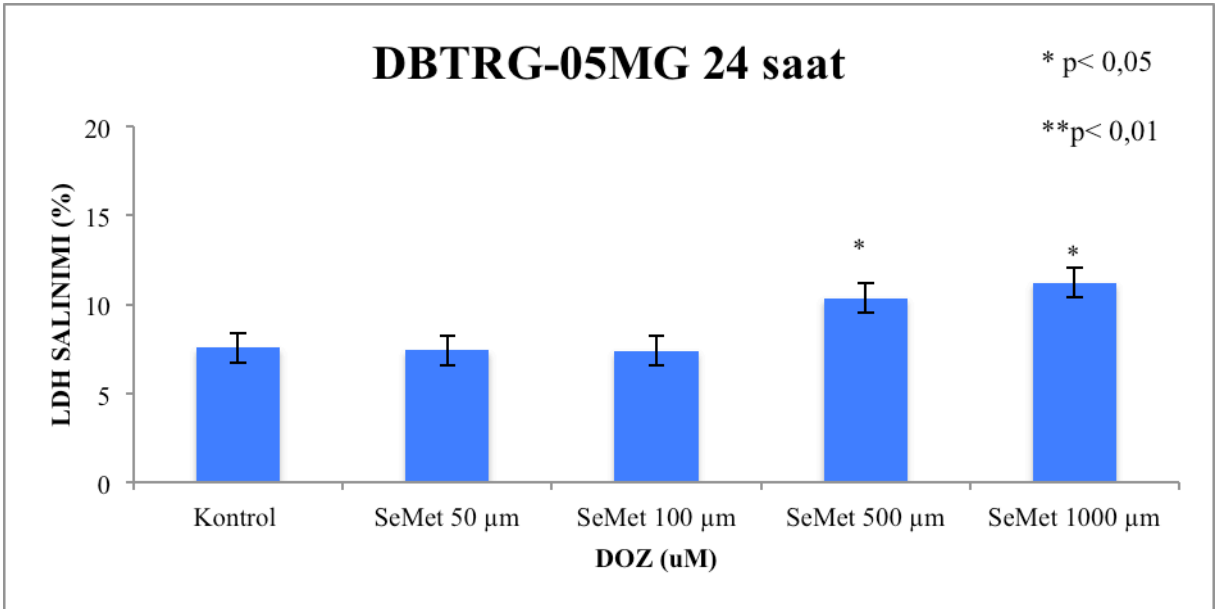
<b>Kontrol</b>	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>50 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,805	0,602	0,101
<b>100 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,623	0,655	0,034
<b>500 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,025	0,009	0,025
<b>1000 <math>\mu</math>M SeMet</b>	0,014	0,025	0,034

GMS-10 ve DBTRG-05MG glioblastoma multiforme hücre hatlarının farklı konsantrasyonlarda selenyum içeren besiyeri ile 24 saat inkübasyonu sonunda elde edilen LDH testi bulguları Şekil 18 ve Şekil 19’da gösterilmiştir.



**Şekil 18. GMS-10 hücrelerine değişik dozlarda 24 saat uygulanan SeMet sonrasında elde edilen sitotoksosite bulguları**

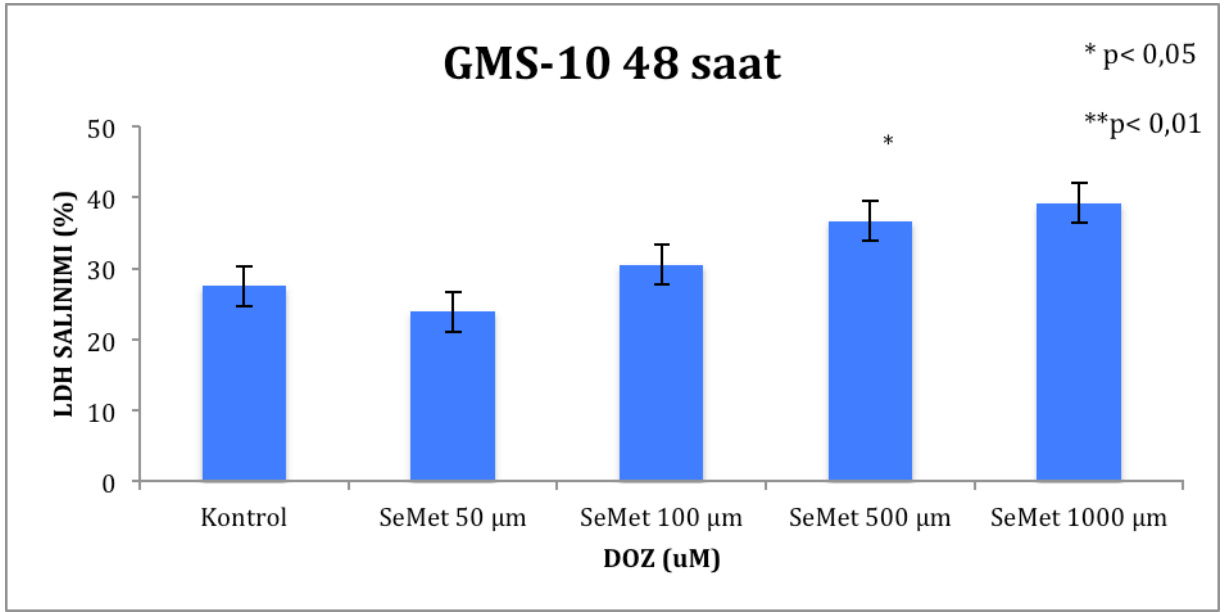
24 saat değişik dozlarda SeMet ile inkübe edilen GMS-10 hücrelerinde oluşan sitotoksosite LDH testi ile değerlendirildi, anlamlı bir ölüm ile karşılaşılmadı.



**Şekil 19. DBTRG-05MG hücrelerine değişik dozlarda 24 saat uygulanan SeMet sonrasında elde edilen sitotoksosite bulguları**

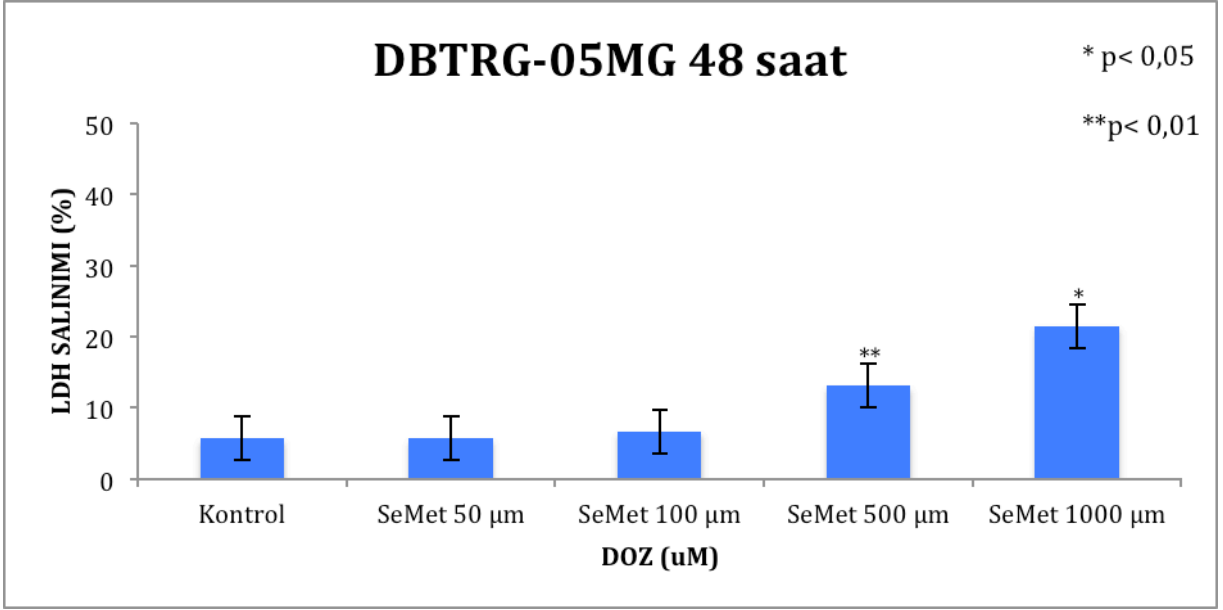
24 saat değişik dozlarda SeMet ile inkübe edilen DBTRG-05MG hücrelerinde oluşan sitotoksosite LDH testi ile değerlendirildi ve yüksek doz olarak kabul edilen 500 ve 1000 µM dozlarında kontrole göre anlamlı ölüm saptandı.

GMS-10 ve DBTRG-05MG glioblastoma multiforme hücre hatlarının farklı konsantrasyonlarda selenyum içeren besiyeri ile 48 saat inkübasyonu sonunda elde edilen LDH testi bulguları Şekil 20 ve Şekil 21’de gösterilmiştir.



Şekil 20. GMS-10 hücrelerine değişik dozlarda 48 saat uygulanan SeMet sonrasında elde edilen sitotoksosite bulguları

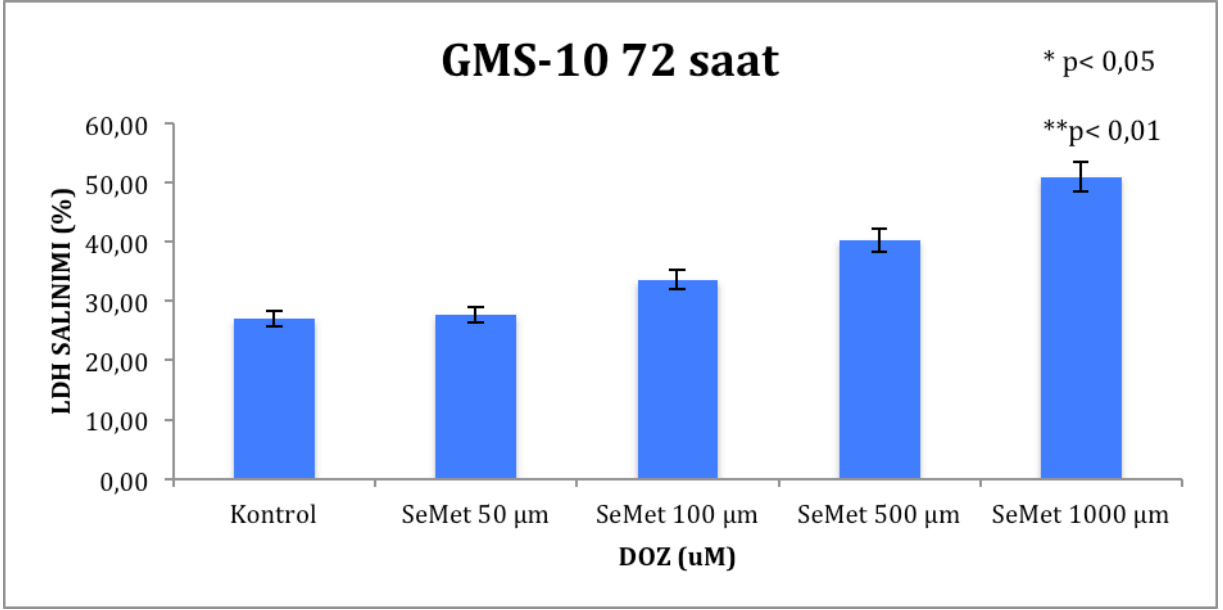
48 saat değişik dozlarda SeMet ile inkübe edilen GMS-10 hücrelerinde oluşan sitotoksosite LDH testi ile değerlendirildi ve yüksek doz olarak kabul edilen 500 µM dozda kontrole göre anlamlı ölüm saptandı.



**Şekil 21. DBTRG-05MG hücrelerine değişik dozlarda 48 saat uygulanan SeMet sonrasında elde edilen sitotoksosite bulguları**

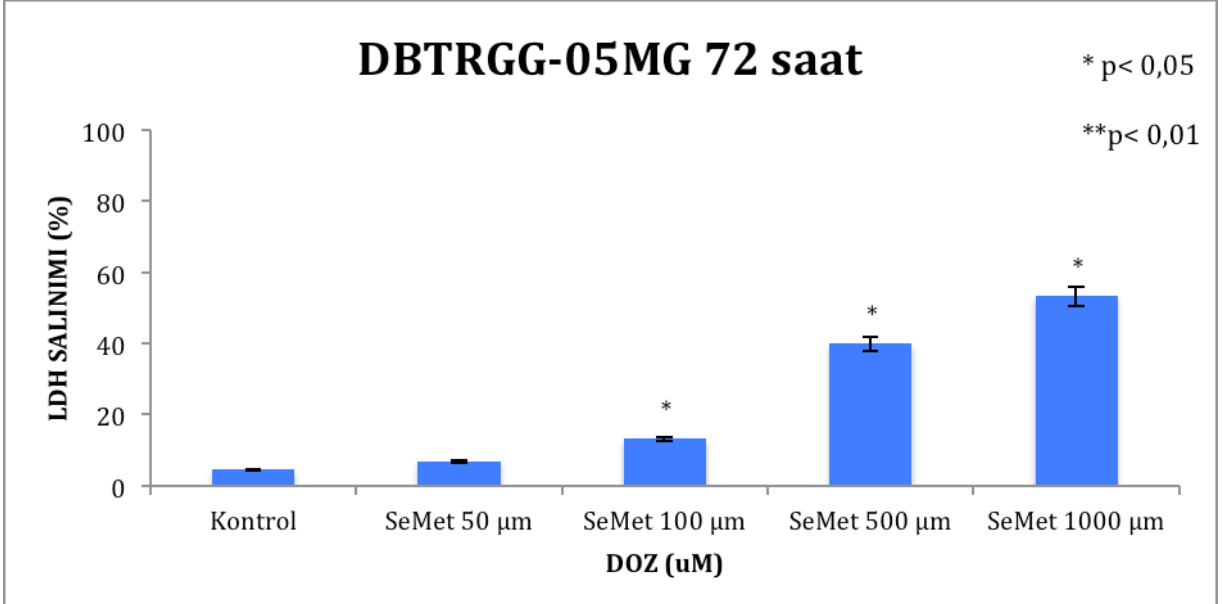
48 saat değişik dozlarda SeMet ile inkübe edilen DBTRG-05MG hücrelerinde oluşan sitotoksosite LDH testi ile değerlendirildi ve yüksek doz olarak kabul edilen 500 ve 1000  $\mu$ M dozlarda kontrole göre anlamlı ölüm saptandı.

GMS-10 ve DBTRG-05MG glioblastoma multiforme hücre hatlarınının 72 saatlik farklı konsantrasyonlarda selenyum içeren besiyeri ile inkübasyonu sonunda elde edilen LDH testi bulguları Şekil 22 ve Şekil 23'de gösterilmiştir.



**Şekil 22. GMS-10 hücrelerine değişik dozlarda 72 saat uygulanan SeMet sonrasında elde edilen sitotoksosite bulguları**

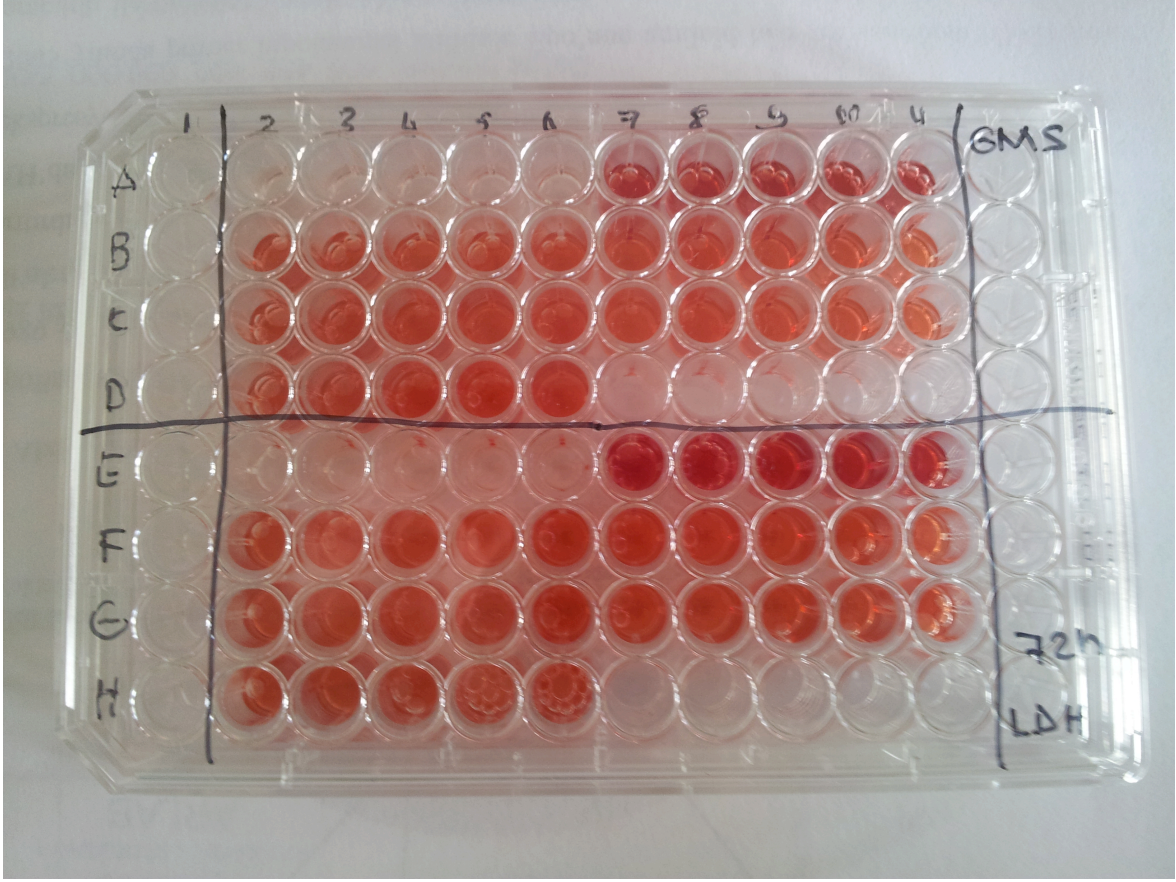
72 saat değişik dozlarda SeMet ile inkübe edilen GMS-10 hücrelerinde oluşan sitotoksosite LDH testi ile değerlendirildi, kontrole göre anlamlı ölüm saptanmadı.



**Şekil 23. DBTRGG-05MG hücrelerine değişik dozlarda 72 saat uygulanan SeMet sonrasında elde edilen sitotoksosite bulguları**

72 saat değişik dozlarda SeMet ile inkübe edilen DBTRGG-05MG hücrelerinde oluşan sitotoksosite LDH testi ile değerlendirildi ve yüksek doz olarak kabul edilen 500 ve 1000 µM dozların yanında 100 µM'da da kontrole göre anlamlı ölüm saptandı.

Yapılan deneylere ait temsili plak görüntüsü Şekil 24’de verilmiştir.



Şekil 24. LDH Testi denemelerine ait temsili plak görüntüsü

Hücrelerin 24, 48 ve 72 saat seleno-L-metiyonin ile inkübasyonundan elde edilen yukarıdaki bulgular (hücre içine alınan selenyum, proliferasyon ve sitotoksisite) arasında Tablo 29, Tablo 30 ve Tablo 31’da gösterildiği gibi korelasyon bulunmaktadır. Korelasyon analizinde  $p < 0,01$  ve  $p < 0,05$  anlamlı kabul edilmektedir.

**Tablo 29.** SeMet’in GMS-10 ve DBTRG-05MG hücrelerine proliferatif etkisi ve hücre içine giren Se düzeyleri arasındaki korelasyon bulguları (R: Korelasyon katsayısı).

	24 saat	48 saat	72 saat
GMS-10	$p=0,067$ $R=- 0, 852$ anlamsız	$p=0,013$ $R=- 0, 950$ $p < 0,05$	$p=0,001$ $R= 0, 993$ $p < 0,01$
DBTRG-05MG	$p=0,011$ $R=- 0, 956$ $p < 0,05$	$p=0,049$ $R=- 0, 879$ $p < 0,05$	$p=0,010$ $R= 0, 960$ $p < 0,05$

**Tablo 30.** SeMet'in GMS-10 ve DBTRG-05MG hücrelerine sitotoksik etkisi ve hücre içine giren Se düzeyleri arasındaki korelasyon bulguları (R: Korelasyon katsayısı).

	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>GMS-10</b>	p=0,342 R=0,545 anlamsız	p=0,014 R= 0, 947 p<0,05	p=0,001 R=0, 990 p<0,01
<b>DBTRG-05MG</b>	p=0,081 R=0, 831 anlamsız	p=0,104 R=0,800 anlamsız	p=0,002 R=0, 987 p<0,01

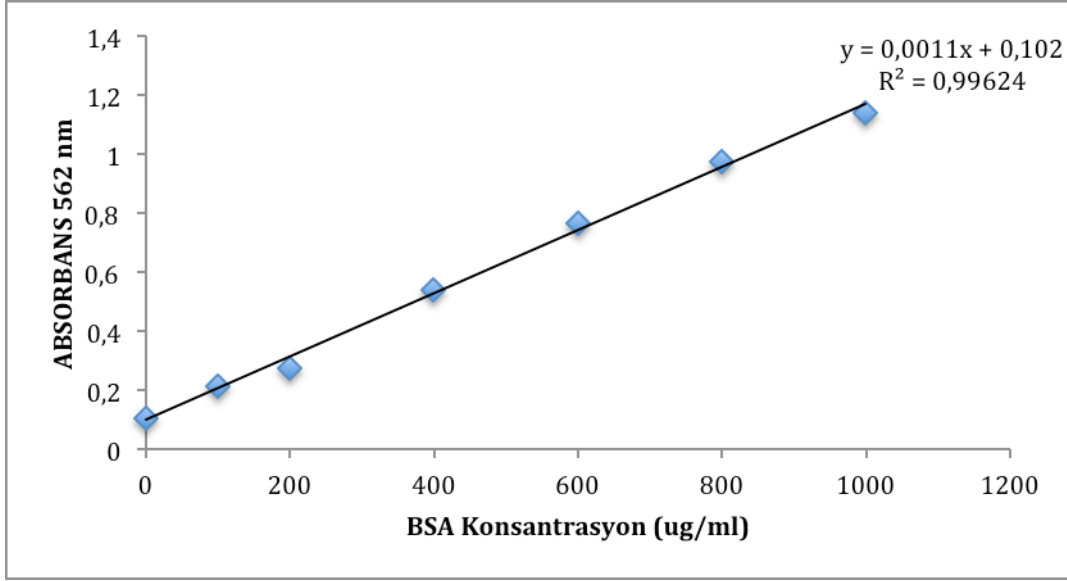
**Tablo 31.** SeMet'in GMS-10 ve DBTRG-05MG hücrelerine proliferatif ve sitotoksik etkisinin korelasyon bulguları (R: Korelasyon katsayısı).

	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>GMS-10 WST-1-LDH</b>	p=0,028 R=- 0,505 p < 0,05	p=0,000 R=- 0, 821 p < 0.01	p=0,000 R=- 0, 934 p < 0,01
<b>DBTRG-05MG WST-1-LDH</b>	p=0,000 R=- 0, 809 p < 0,01	p=0,000 R=- 0, 845 p < 0,01	p=0,000 R=- 0, 941 p < 0,01

#### **4.5. SDS-PAGE ve WESTERN BLOT ile Ki-67 PROTEİN DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

##### **4.5.1. Kontrol ve Deney Gruplarındaki Protein Düzeyleri**

Şekil 25'de gösterilen standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak kontrol ve deney gruplarında hücre lizatında protein düzeyleri hesaplandı (Tablo 32, Tablo 33 ).



Şekil 25. BSA standart kalibrasyon eğrisi

Tablo 32. GMS-10 hücre hattı için kontrol grubu ve deney gruplarında hücre lizati ortalama protein düzeyleri ( $\mu\text{g/mL}$ )

Gruplar	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol	564 $\pm$ 0,008	1545,82 $\pm$ 0,013	749,45 $\pm$ 0,012
50 $\mu\text{M}$ SeMet	760,36 $\pm$ 0,008	727,64 $\pm$ 0,005	482,18 $\pm$ 0,007
100 $\mu\text{M}$ SeMet	667,64 $\pm$ 0,007	945,82 $\pm$ 0,002	482,18 $\pm$ 0,007
500 $\mu\text{M}$ SeMet	853,09 $\pm$ 0,001	602,18 $\pm$ 0,001	144,00 $\pm$ 0,004
1000 $\mu\text{M}$ SeMet	738,54 $\pm$ 0,002	1114,91 $\pm$ 0,004	296,72 $\pm$ 0,007

Tablo 33. DBTRG-05MG hücre hattı için kontrol grubu ve deney gruplarında hücre lizati ortalama protein düzeyleri ( $\mu\text{g/mL}$ )

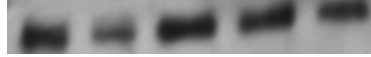
Gruplar	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol	3149,45 $\pm$ 0,193	1142,18 $\pm$ 0,0078	400,36 $\pm$ 0,004
50 $\mu\text{M}$ SeMet	613,09 $\pm$ 0,018	1344,00 $\pm$ 0,003	1104,00 $\pm$ 0,010
100 $\mu\text{M}$ SeMet	1333,09 $\pm$ 0,018	1573,09 $\pm$ 0,010	940,36 $\pm$ 0,014
500 $\mu\text{M}$ SeMet	1534,90 $\pm$ 0,005	411,27 $\pm$ 0,004	138,54 $\pm$ 0,106
1000 $\mu\text{M}$ SeMet	56,73 $\pm$ 0,015	264,00 $\pm$ 0,0000	29,45 $\pm$ 0,018

#### 4.5.2. Kontrol ve Deney Gruplarında Ki-67 Protein Ekspresyonunun Western Blot İle Gösterilmesi

24, 48 ve 72 saat 50, 100, 500 ve 1000  $\mu$ M SeMet ile inkübe edildikten sonra GMS-10 ve DBTRG-05MG hücrelerinde, kontrol ve deney gruplarında Ki-67 protein ekspresyonu Western blot yöntemi ile değerlendirildi. Ki-67 protein ekspresyonunun GMS-10 hücrelerinde 24 ve 48 saat temsili film görüntüleri Şekil 26'da verilmektedir. Kalneksin için temsili film görüntüleri de Şekil 27'de verilmiştir. DBTRG-05MG hücrelerinde 24 saat SeMet inkübasyonu sonucu elde edilen Ki-67 temsili film görüntüleri Şekil 28'de ve kalneksin görüntüsü Şekil 29'da verilmiştir.



**Şekil 26.** GMS-10 hücrelerinde 24 ve 48 saat kontrol grubu ve deney Ki-67 ekspresyonunun temsili Western blot bulguları.



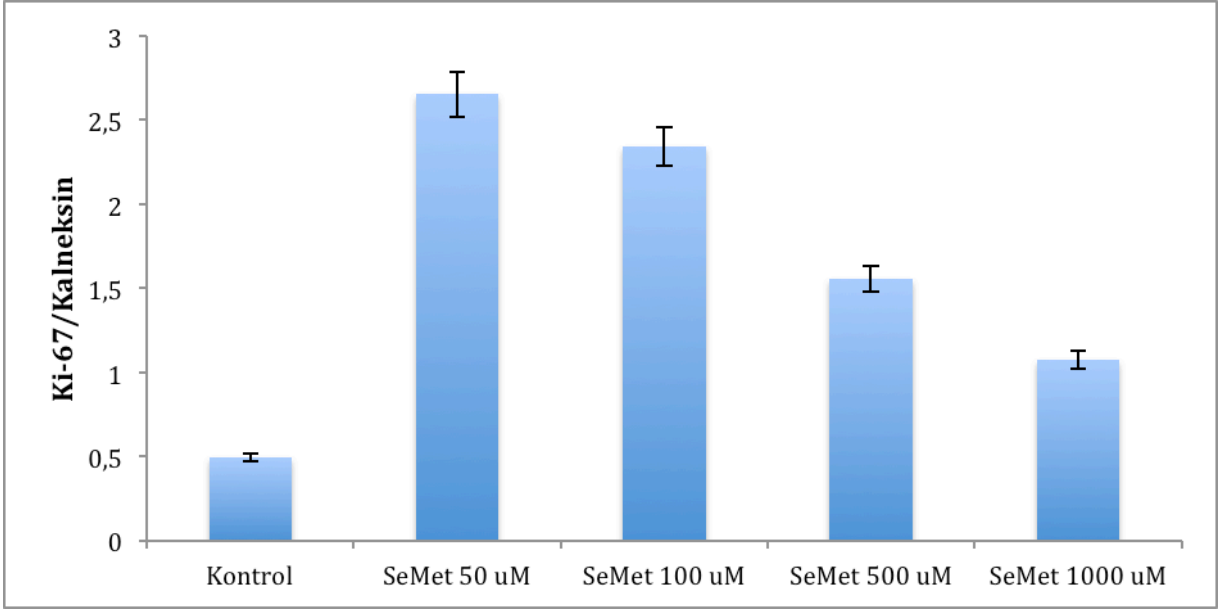
**Şekil 27.** GMS-10 hücrelerinde 24 saat kontrol grubu ve deney gruplarında kalneksin ekspresyonunun temsili Western blot bulguları.



**Şekil 28.** DBTRG-05MG hücrelerinde 24 saat kontrol grubu ve deney gruplarında Ki-67 ekspresyonunun temsili Western blot bulguları.



**Şekil 29.** DBTRG-05MG hücrelerinde 24 saat kontrol grubu ve deney gruplarında kalneksin ekspresyonunun temsili Western blot bulguları.



**Şekil 30. GMS-10 hücrelerinde 24 saat kontrol grubu ve deney gruplarında Ki-67 Western Blot spotlarının dansitometrik analizi.**

Bulgular Ki-67 proteininin dansitometrik ölçümünün kalneksine oranı şeklinde verilmiştir.

Diğer inkübasyon sürelerinin araştırıldığı deney düzeneğinde tekrarlanabilir band görüntüleri elde edilemedi.

## 5. TARTIŞMA

Bundan bir asır önce Paul Ehrlich tarafından ortaya atılan ‘magic bullet theory’ halen kanser tedavisinde geçerliliğini korumaktadır (121). Paul Ehrlich’e göre kanser hücrelerini hedefleyen ancak normal hücrelere zarar vermeyen ilaçlar kanser için bir çözüm olabilirdi. Günümüzde de gelinen nokta ve çalışılan en geçerli alan, hedeflenmiş moleküler tedavi alternatifleridir.

Glioblastoma Multiforme de diğer kanser türlerinde olduğu gibi aynı durum geçerlidir. Üstelik GBM oldukça agresif, prognozu kötü ve rekürrensi çok yüksek bir kanser tipidir. Bunun yanı sıra GBM’de ilaç dirençliliği gelişmesi sık rastlanan bir durumdur. İlaçlarla ilgili en önemli sorun ilaçların kan-beyin bariyerini geçebilmeleriyle ilişkilidir (122).

Selenyum esansiyel eser bir element olarak beyin dokusu için oldukça önemlidir. Beyindeki selenoprotein ekspresyonunun selenyum düzeyi ile serum selenyum düzeyi arasında bir ilişki yoktur. Bu durum ‘selenyum hiyerarşisi’ diye bilinir. Selenyum proteinlerin yapısına katılarak selenoprotein yapısında vücudun çeşitli bölgelerinde görev alır. Selenyum eksikliği durumunda bu hiyerarşi nedeniyle vücudun selenyuma en çok ihtiyacı olan bölgesinde selenoproteinler eksprese olur. Beyinde bulunan selenyumla ilişkili iki molekül vardır; Selenoprotein P ve apolipoprotein E reseptör-2. Selenyum taşınımında apoER-2 görev alır. Selenyum kan-beyin bariyerini geçebilir ve burada SelP eksprese olur (123).

Selenoproteinlerin beyinde bulduklarına dair kanıtlar çeşitli hayvan ve insan çalışmalarıyla gösterilmiştir (124). Nöron ve glial hücrelerde GPx1 aktivitesi söz konusudur. SelP purkinje hücrelerinde ve beyin kapillerlerinde bulunur. Sıçan glial hücrelerinde SelY eksprese olduğu gösterilmiştir. İnsan beyinde deiyonidaz aktivitesi ve mRNA düzeyinde ekspresyonu mevcuttur. SelR aktivitesi ve mRNA düzeyinde ekspresyonu da fare beyinde gösterilmiştir. Bunların yanında SelW, SelN, SelM, Sel15’de beyin dokusunda eksprese olduğu bilinen selenoproteinlerdendirler. Sağlıklı beyin hücreleri üzerine selenyum bileşiklerinin, GPx aktivitesini artırıcı, lipid peroksidasyonunu azaltıcı, hücre ölümünden koruyucu ve olgunlaşmamış oligodendrositlerin miyelin oluşturan oligodendrositlere dönüşmesi gibi farklılaşmayı indükleyici etkileri vardır (123,124).

Bu araştırmada glioblastoma multiforme hücre hatları olan GMS-10 ve DBTRG-05MG hücre hatları kullanılmıştır. Daha önceki çalışmalarda U87MG, U373MG, TG98, A172, C6 (20-23) gibi insan ve sıçan glioblastoma hücre hatları kullanılmıştır. GBM oldukça heterojen bir tümör olduğundan hücre hatları arasında dahi uygulanan maddeye bağlı olarak farklı yanıtlar söz konusu olabilir. Araştırmamızda kullandığımız bu iki hücre hattı erişilebilir literatür incelendiğinde selenyumla ilişkili çalışmalarda daha önce kullanılmamıştır. Bu hücrelerden GMS-10 malign tümörü olan bir hastadan cerrahi müdahale sonrası elde edilen hücrelerdir. DBTRG-05MG hücreleri ise radyoterapi ve kemoterapi sonrası cerrahi müdahale sonucu elde edilen hücrelerdir (111). Sağlıklı hücre ile kanser hücresi arasında uzun yıllardır tartışılan farklılıklar tedavi almış kanser hücresi ile tedavi almamış kanser hücresi arasında da söz konusudur. Bu iki hücre hattı arasında tedavi alması nedeniyle DBTRG-05MG hücre hattında meydana gelmiş bir takım değişiklikler olması olasıdır. DBTRG-05MG hücreleri için bilinen NSE, vimentin, EGFR eksprese ettiği, p53 +/- ve Rb + olduğudur. GMS-10'un p53- ve Rb geninde mutasyon olduğu bilinmektedir (111,134). Özellikle 24 saat inkübasyon ardından iki hücrenin SeMet'e verdiği yanıtı bakıldığında bu durumun hücreye özgü genlerin etkisi ile olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Bu araştırmada selenyum bileşiklerinden seleno-L-metiyonin kullanılmıştır. Seleno-L-metiyonin selenyumun organik formudur, Metiyonin aminoasiti üzerinde kükürt (S) atomu yerine Se geçmesi ile oluşur. İlk başlarda selenyum çalışmalarında selenyumun inorganik formları olan selenit ve selenat kullanılmıştır (21,22). SeMet inorganik selenyum formlarından daha az toksik olduğundan son yıllarda çalışmalarda daha çok tercih edilmeye başlanmıştır.

Bu araştırmada seleno-L-metiyoninin GMS-10 ve DBTRG-05MG insan glioblastoma multiforme hücreleri üzerindeki *in vitro* etkileri ilk kez incelendi. SeMet'in hücre proliferasyonuna etkisi WST-1 testi, sitotoksitesi LDH testi ile, hücre içine alınan selenyum düzeyi GFAAS ile ve önemli bir proliferasyon belirteci olan Ki-67 protein ekspresyonu western blot yöntemi ile belirlendi.

Hücrelere 24, 48 ve 72 saat süre ile uygulanan SeMet'in hücre içine ne düzeyde alındığı ve süpernatantlarda kalan düzeyi araştırıldı. Bu amaçla GFAAS kullanıldı. Tüm zaman noktaları sonunda her iki hücre hattına da literatürle uyumlu olarak selenyum

alındığı saptandı. Hücrelerin selenyumdan faydalandığı saptandıktan sonra araştırmamıza proliferasyon ve sitotoksitesite denemeleri ile devam edildi.

Hücrelerden boyanın atılması ve hücrelere alınmasına, hücrelerden salınan enzim aktivitelerinin ölçümüne ve hücrelerde kolorimetrik [2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum (WST-1) tuzu indirgenmesi esasına dayalı testler olmak üzere hücre proliferasyonu ve sitotoksitesinin değerlendirilmesinde birçok değişik yöntem kullanılmaktadır. Tripan mavisi ve fluoresans boyaları (propidyum iyodid gibi) fonksiyonel hücre membranı olan canlı hücrelerden dışarı atılmakta, membran hasarlı olduğunda boya penetre olmaktadır. Memeli hücrelerinde temel olarak eksprese edilen ve hasarlı hücrelerden salınan giseraldehit-3- fosfat dehidrogenaz ve laktat dehidrogenaz gibi enzim aktivitelerinin ölçümü hücre sitotoksitesinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. WST-1 testi ise, WST-1'in hücrelere endositoz yoluyla girmesine ve canlı hücrelerdeki mitokondride formazana indirgenmesine dayanmaktadır. Bu çalışmada hücre proliferasyonu WST-1 testi ve hücre sitotoksitesini hücre kültür ortamına LDH salınımının ölçülmesi ile değerlendirildi (112,113). Çalışmada kullanılan LDH "Cytotoxicity Detection Kit" (Roche Diagnostics GmbH)'inde önerildiği şekilde optimum hücre sayısını belirlemek için hücreler 96 kuyucuklu plaklara 200 µl/10000 -50000 arası hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelere hiç SeMet uygulanmaksızın kit protokolü eksiksiz yerine getirildi ve optimum hücre sayısı ve inkübasyon süresi 10000 hücre/200 µL olarak ve inkübasyon süreleri de WST-1 testi için 2 saat, LDH için 15-30 dakika olarak belirlendi. LDH testi için optimum hücre sayısı, spontan LDH salınımı/ maksimum LDH salınımı oranının en düşük olduğu değeri ifade etmektedir. SeMet konsantrasyonu ve zaman noktaları literatür incelenerek ve ön çalışmalar yaparak belirlendi ve ARLAB koşullarında optimize edildi. Çalışmada, SeMet her iki hücre hattına 24, 48 ve 72 saat süreyle 50, 100, 500 ve 1000 µM konsantrasyonlarda kullanıldı.

DBTRG-05MG hücrelerinin 24 saat SeMet ile inkübasyonu sonucu 50 µM konsantrasyon dışındaki tüm dozlarda hücre proliferasyonunda istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı ( $p<0,01$ ). GMS-10 hücrelerinde ise 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda proliferasyonu arttırdığı, 500 ve 1000 µM konsantrasyonda ise azalttığı saptandı ( $p<0,01$ ,  $p<0,05$ ). 48 saat inkübasyon sonucunda ise 24 saat inkübasyon ile uyumlu olarak DBTRG-05MG hücrelerinde hücre proliferasyonunda istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenirken GMS-10 hücrelerinde 50 µM hariç diğer dozlarda anlamlı azalma gözlenmedi.

( $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ ). 72 saat inkübasyon sonunda ise tüm konsantrasyonlarda SeMet her iki hücre hattında da hücre proliferasyonunu anlamlı olarak azalttı ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ ).

Erişilebilir literatür incelendiğinde SeMet'in selenyumun toksisitesi düşük bileşiklerinden olduğu bilgisine ulaşılabilir. SeMet değişik hücre tiplerinde farklı konsantrasyonlarda ve inkübasyon sürelerinde etki gösterir. *Kaur ve ark.'nın* yaptığı çalışmada civa nörotoksitesisi üzerinde SeMet'in etkilerinin araştırıldığı çalışmada C6 sıçan glioma ve B35 nöron hücre hatları 20 ve 50  $\mu\text{M}$  SeMet ile inkübe edilmiştir (125). İnsan prostat kanseri hücreleri üzerinde 10 ve 25  $\mu\text{M}$  SeMet (126) uygulanmıştır. *Redman ve ark.larının* yaptıkları çalışmaya göre MCF-7/S hücreleri için IC50 değeri 45  $\mu\text{M}$ , UACC-375 hücreleri için 50  $\mu\text{M}$ , HT-29 hücreleri için 130  $\mu\text{M}$ , DU-145 hücreleri için 40  $\mu\text{M}$ , A549 hücreleri için 65  $\mu\text{M}$  ve fibroblast hücreleri için 1 mM bulunmuştur (127). Suzuki ve ark.larının yaptıkları bir çalışmada da SeMet 48 saat süreyle HSC-3 ve HSC-4, A549 ve MCF-7 hücrelerine 10-1000  $\mu\text{M}$  aralığında verilmiştir (57). 50  $\mu\text{M}$  doz ile 4-5 gün süreyle p53 + A549 hücrelerinin inkübasyonu sonucu apoptoza giden hücre sayısında artış gözlemlenmiştir. Bu çalışmada 72 saat inkübasyon sonrasında GMS-10 için IC50 değeri 628  $\mu\text{M}$  ve DBTRG-05MG için 585  $\mu\text{M}$  bulunmuştur. Bu değerler toksik değeri aşmamaktadır.

DBTRG-05MG hücrelerinin 24 saat SeMet ile inkübasyonu sonucu 500 ve 1000  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda hücre sitotoksitesinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ( $p < 0,05$ ). GMS-10 hücrelerinde ise 24 saat sonunda anlamlı bir ölüm durumu gözlenmedi. 48 saat inkübasyon sonucunda ise 24 saat inkübasyon ile uyumlu olarak DBTRG-05MG hücrelerinde 500 ve 1000  $\mu\text{M}$  dozlarda istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenirken GMS-10 hücrelerinde sadece 500  $\mu\text{M}$  dozda kontrole göre anlamlı artış gözlemlendi ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ ). 72 saat inkübasyon sonunda GMS-10 hücrelerinde kontrole göre anlamlı bir artış saptanmazken DBTRG-05MG hücrelerinde 100, 500 ve 1000  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda SeMet hücre proliferasyonunu anlamlı olarak artırmıştır ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ ).

Çalışma sonucu elde edilen WST-1 ve LDH bulguları analiz edildiğinde proliferasyon ve sitotoksiste bulguları arasında negatif yönde korelasyon olduğu saptandı.

Erişilebilir literatür incelendiğinde *Zhu ve ark.* tarafından A172 insan glioblastoma ve C6 sıçan glioblastoma hücre hatları üzerinde sodyum selenit (0,01-100  $\mu\text{M}$ ) kullanılarak 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinde yapılan çalışmada da selenyumun anti-proliferatif etkileri gösterilmiştir ve bu etkinin A172 hücreleri üzerinde daha etkili olduğunu ortaya

koymuşlardır (22). Yine *Zhu ve ark.'larının* A172 ve T98G insan glioblastoma hücreleri üzerine sodyum selenit kullanarak yaptıkları başka bir çalışmada selenyumun hücre ölümünü apoptozu indükleyerek gerçekleştirdiğini göstermişlerdir (21).

Hücre içine alınan selenyum düzeyleri ile proliferasyon ve sitotoksosite bulguları karşılaştırıldığında 24 saat sonunda hücre içine alınan selenyum düzeyleri ile GMS-10 hücre hattına ait proliferasyon bulguları arasında korelasyon yokken, 48 ve 72 saat sonunda korelasyon saptandı. DBTRG-05MG hücre hattı için her üç inkübasyon süresi sonunda elde edilen bulgular arasında korelasyon vardır. Sitotoksosite bulguları ile GMS-10 hücrelerinde 48 ve 72 saatte korelasyon vardır. Hücre içine alınan selenyum düzeyi ile sitotoksosite artmıştır. DBTRG-05MG hücrelerinde bu korelasyon sadece 72 saat inkübasyon sonunda saptandı.

Erişilebilir literatür incelendiğinde insanlar için selenyumun günlük alım miktarının 55- 70 µg/gün olduğunu görürüz (63). Organizmanın tolere edebileceği maksimum selenyum düzeyi 400 µg/gün'dür (128). Bu durumda bizim kullandığımız dozları incelediğimizde en yüksek doz olan 1000 µM dozun bu sınırlar içinde kaldığını görüyoruz. Selenyumun hücre içine girdikten sonra proteinlere katılarak selenoproteinler aracılığı ile vücut dengesini korumaya yardımcı olduğundan hücre içine girip girmediği, verilen selenyumun ne kadarının hücre içine alındığı oldukça önemlidir. *Combs ve ark.'larının* yaptıkları çalışma sonucunda diyetine düzenli olarak günlük selenyum eklenen kişilerin plazma ve idrar selenyum düzeylerinde artma gözlenirken, GPX3 aktivitesi ya da Selp konsantrasyonunda değişiklik olmamıştır (49). *Shiobara ve ark.larının* yaptıkları çalışmaya göre diyetine organik selenyum katılan sıçanlar ile inorganik selenyum katılan sıçanların saç, kan ve idrar örneklerindeki selenyum düzeyleri karşılaştırıldığında selenit saç ve serumda doza bağlı olmaksızın en düşük sabit değerleri veririrken, SeMet selenitten daha yüksek değerlerde doza bağlı olarak sonuç vermiştir. Bunun aksi olarak idrar selenyum düzeyinin selenyum bileşiğine bağlı olmadığını göstermişlerdir. Bu noktada görülmektedir ki selenyum bileşiklerinin halen tam olarak aydınlatılamamış metabolizması üzerine çalışmalar devam etmektedir.

Literatür incelendiğinde Ki-67'nin proliferasyon göstergesi sayıldığı pek çok çalışmaya rastlanır (25-29). Ki-67 ekspresyon düzeyi çalışmalarda immünohistokimya, ELİZA ve western blot gibi yöntemlerle gösterilmiştir (29,129). *Liu ve ark.larının* yaptığı çalışmaya göre survivin geni susturulmuş prostat kanseri hücrelerinde selenyumun hücre

büyümesini etkilediği gösterilirken Ki-67 ekspresyonuna da immünohistokimya yöntemi ile bakılmışlardır. Yapılan araştırmalarda Ki-67 aynı zamanda prognostik bir faktör olarak da nitelendirilmektedir. *Qiang ve ark.larının* yaptıkları çalışmaya göre Ki-67'nin GBM'de hücrel büyüme, proliferasyonun düzenlenmesi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır (27). Çalışmamızda Ki-67 protein ekspresyonu western blot yöntemi ile gösterildi. GMS-10 hücrelerinde 24 ve 48 saatte band görüntüleri elde edildi. Band yoğunluklarının doz arttıkça azaldığı gözlemlendi. DBTRG-05MG hücrelerinde ise sadece 24 saatte kontrol grubu ve 50, 100 uM konsantrasyonlarda band gözlemlendi. Erişilebilir literatür incelendiğinde GMS-10 hücrelerinde Ki-67 ekspresyonu ilk kez bizim çalışmamızda incelenmiştir. DBTRG-05MG hücrelerindeki ekspresyon ise *Lin ve ark.larının* çalışmalarında gösterilmiştir (129).

Araştırmamızda seleno-L-metiyoninin GMS-10 ve DBTRG-05MG insan glioblastoma hücre hatları üzerindeki etkileri ilk kez incelenmiştir. Araştırmada DBTRG-05MG hücrelerinde ve GMS-10 hücrelerinde SeMet'in, *in vitro* ortam koşullarında, doza ve inkübasyon süresine bağımlı olarak proliferasyonu azalttığı ve sitotoksikite gösterdiği, bu olayların da hücre içine alınan SeMet ile büyük ölçüde korele olduğu ortaya çıkarıldı. GMS-10 hücrelerinin DBTRG-05MG hücrelerine göre SeMet'e daha geç yanıt vermesinin nedeni p53 içermemesi olabilir. *Seo ve ark.ları* (52) SeMet'in redoks mekanizmaları aracılığıyla p53'ü aktive edebileceğini göstermişlerdir ve bu durum p53 içeren ve içermeyen hücreleri farklı etkileyecektir. GMS-10 p53 içermeyen, DBTRG-05MG ise p53<sup>±</sup> heterozigot hücrelerdir (111). Bununla beraber DBTRG-05MG hücreleri için bilinen NSE, vimentin, EGFR eksprese ettiği ve Rb + olduğudur. GMS-10'un p53- ve Rb geninde mutasyon olduğu bilinmektedir (111,134). Elde ettiğimiz bulguların ileri çalışmalarla desteklenerek bu alanda çalışan diğer araştırmacılara ışık tutacağımızı düşünüyoruz.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmanın hipotezi; “kullandığımız selenyum formu SeMet glioblastoma multiforme hücre hatları olan GMS-10’un ve DBTRG-05MG’nin proliferasyonlarını baskılar,” şeklinde kurgulandı. Bu amaçla, selenyum bileşiklerinin GBM hücre hatlarında hücre proliferasyonu ve sitotoksosite üzerine etkileri hücreler dört farklı selenyum dozu ile 24, 48, 72 saat inkübe edilerek belirlendi. Hücre proliferasyonundaki değişiklikler WST-1 testi ile, sitotoksosite LDH testi ile belirlendi. Araştırmamızın temelinde hücre proliferasyonunun baskılanması amaçlandığından bir proliferasyon belirteci olan Ki-67 protein ekspresyon değişiminin western blot yöntemi kullanılarak belirlenmesi amaçlandı. Selenyumun hücre içine alınımını belirlemek amacı ile hücre lizatlarındaki ve süpernatantlarındaki selenyum düzeyleri GFAAS kullanılarak ölçüldü.

Araştırmanın bulguları şu şekilde özetlenebilir:

SeMet, GMS-10 ve DBTRG-05MG hücrelerinde 24 saat inkübasyonun ardından düşük dozlarda (50 ve 100  $\mu$ M) proliferatif etki gösterirken 48 ve 72 saat inkübasyon ardından sitotoksik etki göstermiştir. Proliferasyon ve sitotoksiste bulguları arasında negatif yönde korelasyon vardır. DBTRG-05MG hücre hattında ise doza ve zamana bağlı olarak proliferasyonda azalma gözlemlendi, benzer şekilde sitotoksitede de artış oldu. Proliferasyon ve sitotoksosite bulguları arasında negatif yönde korelasyon vardır. 24 saat sonunda hücre içine alınan selenyum düzeyleri ile GMS-10 hücre hattına ait proliferasyon bulguları arasında korelasyon yokken, 48 ve 72 saat sonunda korelasyon saptandı. DBTRG-05MG hücre hattı için her üç inkübasyon süresi sonunda elde edilen bulgular arasında korelasyon vardır. Sitotoksosite bulguları ile GMS-10 hücrelerinde 48 ve 72 saatte korelasyon vardır. Hücre içine alınan selenyum düzeyi ile sitotoksosite artmıştır. DBTRG-05MG hücrelerinde bu korelasyon sadece 72 saat inkübasyon sonunda saptandı. Ki-67 protein düzeyleri GMS-10 hücreleri için kontrole göre anlamlı değişiklik göstermezken DBTRG-05MG hücrelerinde western blot yöntemi ile deteksiyon mümkün olmadı. Bu bulgular başta kurgulanan hipotezi desteklemektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada, gerek DBTRG-05MG hücrelerinde, gerekse GMS-10 hücrelerinde SeMet’in, *in vitro* ortam koşullarında, doza ve inkübasyon süresine bağımlı olarak proliferasyonu azalttığı ve sitotoksosite gösterdiği, bu olayların da hücre içine alınan

SeMet ile büyük ölçüde korele olduğu ortaya çıkartılmıştır. IC50 konsantrasyonlarının toksik dozu geçmediği bulunmuştur.

Çalışmamız erişilebilir literatür incelendiğinde SeMet'in glioblastoma multiforme hücre hatlarında olası *in vitro* etkilerinin incelendiği ilk çalışmadır.

Çalışmamızdaki bulgular ışığında ileriye yönelik yapılması uygun olacak çalışmaları şöyle sınıflandırabiliriz:

- SeMet'in GBM hücreleri üzerindeki anti-proliferatif ve hücre ölümünü indükleyici etkisinin nekrotik bir ölüm mü, yoksa apoptotik bir ölüm mü olduğu araştırılmalıdır. Bunun için Cell Death ELISA yöntemi uygulanabilir.
- Akım Sitometri kullanılarak hücre döngüsü analizleri yapılabilir.
- Hücre içine alınan selenyumun hangi yolakları etkilediği, selenyumun hücre içine alınmasında rol alan diğer moleküllerin incelenmesinin ve selenyum metabolizmasına ilişkin daha detaylı bilgilere ulaşmak için çalışmaların yapılmasının anlamlı olacağını düşünmekteyiz.
- Ki-67 protein düzeylerinin western blot yöntemine alternatif olarak immünohistokimya ya da ELİZA yöntemleri ile değerlendirilmesi gerekmektedir.
- Hücrelerdeki GPx1 seviyeleri spektrofotometrik yöntemlerle incelenmelidir.
- SeIP düzeyi DNA-HPLC tekniği ile belirlenebilir.
- İleri çalışmalarda selenyumun yanında farklı ilaç kombinasyonları kullanılarak daha etkili sonuç alınıp alınmayacağı denenmelidir.
- Kontrol olarak SeMet verilmeyen grubun yanında sağlıklı astrosit hücreleri kullanılması çalışmanın değerini artıracaktır. Gerçekleştirdiğimiz *in vitro* çalışmalar yanında *in vivo* çalışmaların da yapılmasının uygun olduğunu düşünmekteyiz.

Hedeflenmiş moleküler tedavinin çok önemli olduğu GBM tedavisi ya da yaşam süresini uzatmak ve hasta refahını artırmak için SeMet'in aday molekül olduğunun söylenmesi için daha ileri çalışmalar yapılmalıdır. İlaç dirençliliğinin en büyük sorun olduğu GBM'de hücreleri öldürmek için yüksek doz ilaç uygulaması normal hücrelere

zarar vermektedir. Organizma için toksik sayılacak dozlara çıkılmayacağından bu dozlarda SeMet uygulamasının GBM için yeterliliği tartışmalıdır. Bundan sonra aydınlatılması gereken nokta SeMet'in gliomagenesis süresinde nasıl rol oynadığıdır. Bunun için daha ileri denemeler yapılarak rolü olacağı düşünülen yollar incelenmeli ve bunlara yönelik fonksiyonel analizler yapılmalıdır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Barceolux DG. Selenium. *Clinical Toxicology* 1999 ; 37(2):145-172.
2. Mckenzie RC, Arthur JR, Beckett GJ. Selenium and the Regulation of Cell Signaling, Growth, and Survival : Molecular and Mechanistic Aspects. *Antioxidants & Redox Signaling* 2002 ; 4(2):339-351.
3. Rayman MP. Selenium in Cancer Prevention : A Review of the Evidence and Mechanism of Action. *Proceedings of the Nutrition Society* 2005 ; 64 : 527-542.
4. Combs GF, Gray WP. Chemopreventive Agents : Selenium. *Pharmacol. Ther* 1998 ; 79 (3):179-192.
5. Letavayova L, Vickova V, Brozmanova J. Selenium : From Cancer Prevention to DNA Damage. *Toxicology* 2006 ; 227:1-14.
6. Flohe L, Andreesen JR, Flohe-Brigelius R, Maiorino M ve ark. Selenium, the Element of the Moon, in Life on Earth. *IUBMB Life* 2000; 49: 411-420.
7. Jackson MI, Combs GF. Selenium and Anticarcinogenesis : Underlying Mechanisms. *Clinical Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2008; 11:718-726.
8. Mut M, Schiff D. Unmet Needs in the Treatment of Glioblastoma. *Anticancer Ther.* 2009; 9(5): 545-551.
9. Groot J, Milano V. Improving the Prognosis for Patients with Glioblastoma : The Rationale for Targeting Src. *J Neurooncol* 2009; 95: 151-163.
10. Tolgay E, Bahar A, Yurtoğulları Ş, Karlı N ve ark. A Case with Multicentric Glioblastoma Multiforme. *Türk Nörol. Derg.* 2008; 14(4): 272-276.
11. Jansen M, Yip S, Louis DN. Molecular Pathology in Adult Gliomas: Diagnostic, Prognostic, and Predictive Markers. *Lancet Neurol.* 2010; 9: 717-26.
12. Mao X, Hamoudi RA. Molecular and Cytogenetic Analysis of Glioblastoma Multiforme. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2000; 122: 87-92.
13. Zhong W, Oberley TD. Redox-mediated Effects of Selenium on Apoptosis and Cell Cycle in the LNCaP Human Prostate Cancer Cell Line. *Cancer Res* 2001; 61: 7071-7078.
14. Jiang C, Wang Z, Ganther H ve ark. Distinct Effects of Methylseleninic Acid versus Selenite on Apoptosis, Cell Cycle, and Protein Kinase Pathways in DU145 Human Prostate Cancer Cells. *Mol Cancer Ther* 2002;1:1059-1066.

15. Nyman DW, Stratton MS, Kopplin MJ, Dalkin BL ve ark. Selenium and Selenomethionine Levels in Prostate Cancer Patients. *Cancer Detection and Prevention* 2004; 28: 8-16.
16. Hawkes WC, Alkan Z. Delayed Cell Cycle Progression from SEPW1 Depletion is p53- and p21-dependent in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2011; 413: 36-40.
17. Cao S, Durrani FA, Rustum YM. Selective Modulation of the Therapeutic Efficacy of Anticancer Drugs by Selenium Containing Compounds against Human Tumor Xenografts. *Clin Cancer Res* 2004;10:2561-2569.
18. Rigobello MP, Gandin V, Folda A, Rundlöf AK ve ark. Treatment of Human Cancer Cells with Selenite or Tellurite in Combination with Auranofin Enhances Cell Death due to Redox Shift. *Free Radical Biology & Medicine* 2009; 47:710-721.
19. Song H, Hur I, Park H, Nam J ve ark. Selenium Inhibits Metastasis of Murine Melanoma Cells through the Induction of Cell Cycle Arrest and Cell Death. *Immune Network* 2009;9(6):236-242.
20. Sundaram N, Pahwa AK, Ard MD, Lin N ve ark. Selenium Causes Growth Inhibition and Apoptosis in Human Brain Tumor Cell Lines. *Journal of Neuro-Oncology* 2000; 46: 125-133.
21. Zhu Z, Kimura M, Itokawa Y, Aoki T ve ark. Apoptosis Induced by Selenium in Human Glioma Cell Lines. *Biological Trace Element Research* 1996;54: 123-134.
22. Zhu Z, Kimura M, Itokawa Y, Nakatsu S ve ark. Effect of Selenium on Malignant Tumor Cells of Brain. *Biological Trace Element Research* 1995;49:1-7.
23. Rooprai HK, Kyriazis I, Nuttall RK, Edwards DR ve ark. Inhibition of Invasion and Induction of Apoptosis by Selenium in Human Malignant Brain Tumour Cells *In Vitro*. *International Journal of Oncology* 2007; 30: 1263-1271.
24. Brown DC, Gatter KC. Ki67 Protein : The Immaculate Deception? *Histopathology* 2002; 40: 2-11.
25. Whitfield ML, George LK, Grant GD, Perou CM. Common Markers of Proliferation. *Nature Reviews* 2006; 6 :99-106.
26. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *Journal of Cellular Physiology* 2000; 182: 311-322.

27. Qiang J, Wei Z, Xiao-guang Q, Wei Y, ve ark.'ları. Gene Expression Profiling Reveals Ki-67 Associated Proliferation Signature in Human Glioblastoma. *Chin Med J* 2011; 124(17): 2584-2588.
28. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C ve ark. Proliferative Markers as Prognostic and Predictive Tools in Early Breast Cancer: Where are we now? *Annals of Oncology* 2005; 16: 1723-1739.
29. Facchini A, Borzi MR, Flamigni F. Induction of Ornithine Decarboxylase in T/C-28a2 Chondrocytes by Lysophosphatidic Acid: Signaling Pathway and Inhibition of Cell Proliferation. *FEBS Letters* 2005; 579: 2919-2925.
30. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From Selenium to Selenoproteins : Synthesis, Identity, and Their Role in Human Health. *Antioxidants & Redox Signaling* 2007 ; 9 (7) : 775-806.
31. Schwarz K, Foltz CM. Selenium As An Integral Part of Factor 3 Against Dietary Necrotic Liver Degeneration. *Communications to the Editor* 1957; 70: 3292-3293.
32. Dumont E, Vanhaecke F, Cornelis R. Selenium Speciation from Food Source to Metabolites : A critical Review. *Anal Bioanal Chem.* 2006; 385: 1304-1323.
33. Schomburg L, Schweizer U, Köhrle J. Selenium and Selenoproteins in Mammals : Extraordinary, Essential, Enigmatic. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004 ; 61 : 1988-1995.
34. Gromer S, Eubel JK, Lee BL, Jacob J. Human Selenoproteins at a Glance. *Cell.Mol.Life Sci.* 2005 ; 62:2414-2437.
35. Driscoll DM, Copeland PR. Mechanism and Regulation of Selenoprotein Synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 2003 ; 23:17-40.
36. Mistry HD, Pipkin FB, Redman CWG, Poston L. Selenium in Reproductive Health. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2012; 34: 21-30.
37. Papp LV, Holmgren A, Khanna KK. Selenium and Selenoproteins in Health and Disease. *Antioxidants&Redox Signaling* 2010; 12(7): 793-795.
38. Suzuki KT. Metabolomics of Selenium: Se Metabolites Based on Speciation Studies. *Journal of Health Science* 2005; 51(2) :107-114.
39. Schrauzer GN. Selenomethionine : A Review of Its Nutritional Significance, Metabolism and Toxicity. *J. Nutr.* 2000; 130: 1653-1656.
40. Abul-Hassan KS, Lehnert BE, Guant L, Walmsley R. Abnormal DNA Repair in Selenium-treated Human Cells. *Mutation Research* 2004 ; 565:45-51.

41. Donaldson MS. Nutrition and Cancer : A Review of the Evidence for An Anti-cancer Diet. *Nutrition Journal* 2004 ; 3(19):1-21.
42. Dennert G, Zwahlen M, Brinkman M, Vinceti M ve ark.ları. Selenium for Preventing Cancer. *Wiley & Sons* 2011 ; 8: 1-19.
43. Alaejos MS, Romero FRD, Romero CD. Selenium and Cancer : Some Nutritional Aspects. *Nutrition* 2000 ; 16:376-383.
44. Klein EA. Selenium : Epidemiology and Basic Science. *The Journal of Urology*. 2004 ;171:50-53.
45. Zhuo H, Smith AH, Steinmaus C. Selenium and Lung Cancer: A Quantitative Analysis of Heterogeneity in the Current Epidemiological Literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:771-778.
46. Brinkman M, Reulen RC, Kellen E, Buntinx F ve ark.ları. Are Men with Low Selenium Levels at Increased Risk of Prostate Cancer? *European Journal of Cancer* 2006; 42: 2463-2472.
47. Micke O, Schuomburg L, Buentzel J, Kisters K ve ark. Selenium in Oncology : From Chemistry to Clinics. *Molecules* 2009; 14: 3975-3988.
48. Glattre E, Nygard JF, Aaaseth J. Selenium and Cancer Prevention : Observations and Complexity. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2012 ; 26 :168-169.
49. Combs Jr GF, Jackson MI, Watts JC, Jonhson LK ve ark. Differential Responses to Selenomethionine Supplementation by Sex and Genotype in Healthy Adults. *British Journal of Nutrition* 2011; 13(31): 1-12.
50. Li WJ. Selenium Content and Glutathione Peroxidase in Erythrocytes from Different Populations in Areas with High and Low Mortality of Esophageal Cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 1991; 13(4): 265-268.
51. Selenius M, Fernandes AP, Brodin O, Björnstedt M ve ark. Treatment of lung cancer cells with cytotoxic levels of sodium selenite: Effects on the thioredoxin system. *Biochemical Pharmacology* 2008; 75: 2092-2099.
52. Seo YR, Kelley MR, Smith ML. Selenomethionine Regulation of p53 by a ref1-dependent Redox Mechanism. *PNAS* 2002; 99(2): 14548-14553.
53. Philipov Ph, Tzatchev K. Selenium in the treatment of patients with brain gliomas. *Zent. Bl. Neurochir.* 1990; 51: 145-146.

54. Schueller P, Puettmann S, Micke O, Senner V ve ark. Selenium Influences the Radiation Sensitivity of C6 Rat Glioma Cells. *Anticancer Research* 2004; 24: 2913-2918.
55. Yu SY, Zhu YJ & Li WG. Protective role of selenium against hepatitis b virus and primary liver cancer in Qidong. *Biological Trace Element Research* 1997; 56: 117-124.
56. Clark LC, Combs GF Jr, Turnbull BW, Slate EH ve ark. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA* 1996; 276(24):1957-63.
57. Redman C, Scott JA, Baines AT, Basye JL ve ark. Inhibitory Effect of Selenomethionine on the Growth of Three Selected Human Tumor Cell Lines. *Cancer Letters* 1998; 125: 103-110.
58. Combs Jr GF, Clark LC, Turnbull BW. An Analysis of Cancer Prevention by Selenium. *Biofactors* 2001; 14: 153-159.
59. Duffield-Lillico AJ, Reid ME, Turnbull BW, Combs Jr GF ve ark. Baseline Characteristics and the Effect of Selenium Supplementation on Cancer Incidence in a Randomized Clinical Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 630-639.
60. Zeng H. Selenite and Selenomethionine Promote HL-60 Cell Cycle Progression. *J Nutr.* 2002; 132(4):674-679.
61. Zeng H, Briske-Anderson M, Wu M, Moyer MP. Methylselenol, a Selenium Metabolite, Plays Common and Different Roles in Cancerous Colon HCT116 Cell and Noncancerous NCM460 Colon Cell Proliferation. *Nutr Cancer* 2012; 64(1): 128-135.
62. Luo H, Yang Y, Huang F, Li F ve ark. Selenite Induces Apoptosis in Colorectal Cancer Cells via AKT-mediated Inhibition of  $\beta$ -catenin Survival Axis. *Cancer Lett.* 2012; 315(1) :78-85.
63. Suzuki M, Endo M, Shinohara F, Echigo S ve ark. Differential Apoptotic Response of Human Cancer Cells to Organoselenium Compounds. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66:475-484.

64. Zhao R, Xiang N, Domann FE, Zhong W. Effects of Selenite and Genistein on G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells. *Nutr Cancer* 2009; 61(3): 397-407.
65. Hou J, Wang T, Liu M, Li S ve ark. Suboptimal Selenium Supply- A Continuing Problem in Keshan Disease Areas in Heilongjiang Province. *Biol Trace Elem Res* 2011; 143(3):1255-63.
66. Moreno-Reyes R. Iodine, Selenium Deficiency and Kashin-Beck Disease, In : Preedy VR, Burrow GN, Watson RR, editors. *Comprehensive Handbook of Iodine*. Birinci Basım. Academic Press ; 2009. 685-698.
67. Lei C, Niu X, Ma X, Wei J. Is Selenium Deficiency Really the Cause of Keshan Disease? *Environ Geochem Health* 2011; 33:183-188.
68. Lei C, Niu X, Wei J, Zhu J ve ark. Interaction of Glutathione Peroxidase-1 and Selenium in Endemic Dilated Cardiomyopathy. *Clinica Chimica Acta* 2009; 399:102-108.
69. Stranges S, Navas-Acien A, Rayman MP, Guallar E. Selenium Status and Cardiometabolic Health: State of the Evidence. *Nutrition, Metabolism&Cardiovascular Diseases* 2010; 20: 754-760.
70. Benton D. Selenium Intake, Mood and Other Aspects of Psychological Functioning. *Nutritional Neuroscience* 2002; 5(6): 363-374.
71. Nuttall KL. Evaluating Selenium Poisoning. *Annals of Clinical* 2006;36(4):409-420.
72. Zwolak I, Zaporowska H. Selenium Interactions and Toxicity : A Review. *Cell Biol Toxicol* 2011;11:9203-9.
73. MacFarquar JK, Broussard DL, Melstrom P, Hutchinson R ve ark. Acute Selenium Toxicity Associated with a Dietary Supplement. *Arch Intern Med*. 2010;170(3):256-261.
74. Haraguchi H, Fujimori E, Inagaki K. Trace Element Analysis of Biological Samples by Analytical Atomic Spectroscopy. In: Armstrong D, editor. *Methods in Molecular Biology*. Birinci Basım. Humana Press ; 1998 : 389-411.
75. Chatterjee A, Shibata Y, Morita M. Determination of Selenomethionine by High Performance Liquid Chromatography-direct Hydride Generation-atomic Absorption Spectrometry. *Microcheöical Journal* 2001; 69: 179-187.

76. Weekley CM, Aitken JB, Vogt S, Finney AL ve ark. Uptake, Distribution, and Speciation of Selenoamino Acids by Human Cancer Cells: X-ray Absorption and Fluorescence Methods. *Biochemistry* 2011; 50: 1641-1650.
77. Zhao QX, Chen YW, Belzile N, Wang M. Low Volume Microwave Digestion and Direct Determination of Selenium in Biological Samples by Hydride Generation-atomic Fluorescence Spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2010; 665: 123-128.
78. Harrison I, Littlejohn D, Fell GS. Improved Molecular Fluorescence Method for the Determination of Selenium in Biological Samples. *Analyst* 1996; 121: 1641-1646.
79. Brueggemeyer TW, Fricke FL. Comparison of Furnace Atomization Behaviour of Aluminum from Standard and Thorium-Treated L'vov Platforms. *Anal.Chem.* 1986;58:1143-1148.
80. Andersen JC, McFarland BC, Gladson CL. New Molecular Targets in Angiogenic Vessels of Glioblastoma Tumours. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2008; 10: 1-25.
81. CBTRUS. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the united states in 2004-2007. Hinsdale, IL: Central Brain Tumor Registry of the United States; 2011.
82. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus con-comitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96.
83. CBTRUS. CBTRUS statistical report: Primary brain tumors in the united states, 2000-2004. Hinsdale, IL: Central Brain Tumor Registry of the United States; 2008.
84. Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin.* 2007 Nov;25(4):867,90, vii.
85. Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, Barnholtz-Sloan JS ve ark. Brain tumor epidemiology: Consensus from the brain tumor epidemiology consortium. *Cancer.* 2008 Oct 1;113(7 Suppl):1953-68.
86. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. WHO classification of tumours of the central nervous system. 4th ed. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, editors. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2007.
87. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007 May;170(5):1445-53.

88. Kleihues P, Ohgaki H. Primary and Secondary Glioblastomas : From Concept to Clinical Diagnosis. *Neuro-Oncology* 1999 ; 1: 44-51.
89. Rich JN, Hans C, Jones B ve ark. Gene Expression Profiling and Genetic Markers in Glioblastoma Survival. *Cancer Res.* 2005; 65: 4051-4058.
90. Sehgal A. Molecular Changes During the Genesis of Human Gliomas. *Seminars in Surgical Oncology* 1998; 14:3-12.
91. Sharma V, Tewari R, Hossain U, Joseph C ve ark. Ebselen Sensitizes Glioblastoma Cells to Tumor Necrosis Factor (TNF $\alpha$ )-induced Apoptosis Through Two Distinct Pathways Involving NF- $\kappa$ B Downregulation and Fas-mediated Formation of Death Inducing Signaling Complex. *Int.J.Cancer* 2008 ; 123 : 2204-2212.
92. Avcı Biray Ç, Doğan ZÖ, Oktar N, Dalbastı T ve ark. The Effect of Cyclosporine A via p53, MDM2 and PIK3CA Gene Expressions in Glioblastoma Multiforme Cells. *Journal of Neurological Sciences* 2010 ; 27(2) :170-177.
93. Kast RE. Profound Blockage of CXCR4 Signaling at Multiple Points Using the Synergy Between Plerixafor, Mirtazapine, and Clotrimazole as A New Glioblastoma Treatment Adjunct. *Turkish Neurosurgery* 2010 ; 20(4) : 425-429.
94. Chen J, Kesari S, Rooney C, Strack PR ve ark. Inhibition of Notch Signaling Blocks Growth of Glioblastoma Cell Lines and Tumor Neurospheres. *Genes Cancer* 2010 ; 1(8) : 822-835.
95. Mut M, Amos S, Hussaini IM. PKC Alpha Phosphorylates Cytosolic NF-kappaB/p65 and PKC Delta Delays Nuclear Translocation of NF-kappaB/p65 in U1242 Glioblastoma Cells. *Turkish Neurosurgery* 2010 ; 20(3) : 277-285.
96. De Souza SJ, Stransky B, Camargo AA. Insights into gliomagenesis : systems biology unravels key pathways. *Genome Medicine* 2009; 1: 101-103.
97. Steinbach JP, Weller M. Apoptosis in Gliomas: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Journal of Neuro-Oncology* 2004; 70: 245-254.
98. Chen J, McKay RM, Parada LF. Malignant Glioma: Lessons from Genomics, Mouse Models, and Stem Cells. *Cell* 2012; 149: 36-47.
99. Hadjipanayis CG, Van Meir EG. Brain Cancer Propagating Cells : Biology, Genetics and Targeted Therapies. *Trends in Molecular Medicine* 2009; 15(11): 519-530.

100. Tuğcu B, Postalıcı LS, Gunaldı O, Tanrıverdi O ve ark. Efficacy of Clinical Prognostic Factors on Survival in Patients with Glioblastoma. Turkish Neurosurgery 2010; 20(2): 117-125.
101. Durmaz R, Vural M, Işıldı E, Coşan E ve ark. Efficacy of Prognostic Factors on Survival in Patients with Low Grade Glioma. Turkish Neurosurgery 2008 ; 18(4) : 336-344.
102. Midi A, Belirgen M, Sav A, Bozkurt S ve ark. Giant Cell Glioblastoma ; Long-term Survival, and Correlation with Usual Glioblastoma. Journal of Neurosurgical Sciences 2008 ; 25(4) : 272-282.
103. Oktar N, Özgiray E, Akalın T. Long Term Survivors of Glioblastoma. Journal of Neurological Sciences 2009; 26(4): 376-382.
104. Kocaoğulları Y, Güney Ö, Erdi F, Tavlı L. Servikal Bölge Omurilik Yerleşimli Primer Glioblastoma Multiforme. Selçuk Tıp Derg. 2010; 26(1): 23-25.
105. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. N Engl J Med. 2008 Jul 31;359(5):492-507.
106. Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ. Exciting new advances in neu-ro-oncology: The avenue to a cure for malignant glioma. CA Cancer J Clin. 2010 May-Jun;60(3):166-93.
107. Stupp R, Hegi ME, Gilbert MR, Chakravarti A. Chemoradiotherapy in malignant glioma: Standard of care and future directions. J Clin Oncol. 2007 Sep 10;25(26):4127-36.
108. Wen PY, Brandes AA. Treatment of recurrent high-grade gliomas. Curr Opin Neurol. 2009 Dec;22(6):657-64.
109. Cohen MH, Shen YL, Keegan P, Pazdur R. FDA drug approval summary: Bevacizumab (avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. Oncologist. 2009 Nov;14(11):1131-8.
110. <http://bioinfoweb.com/CLDB-GMS-10.htm> 10.12.2012.
111. Kruse AC, Mitchel DH, Kleinschmidt-deMasters BK, Franklin WA ve ark. Characterization of A Continuous Human Glioma Cell Line DBTRG-05MG : Growth Kinetics, Karyotype, Receptor Expression, and Tumor Suppressor Gene Analyses. In Vitro Cell. Dev. Biol. 1992; 28: 609-614.

112. Jacobson BE, Lockitch G. Direct determination of selenium in serum by graphite-furnace atomic absorption spectrometry with deuterium background correction and reduced palladium modifier: age-specific reference ranges. *Clinical Chemistry* 1988;34(4):709-714.
113. Burgin C, Gray TA, Morris BW. Serum selenium measured by Zeeman electrothermal atomic absorption spectrophotometry. *Metal Ions in Biology and Medicine* 1998;5:23-27.
114. Ferrer E, Alegria A, Barbera R, Fare R, Lagarda MJ. Whole blood selenium determination : optimization of an ET-AAS method. *Metal Ions in Biology and Medicine* 1998;5:23-27.
115. Berridge MV, Herst PM , and Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review* 2005; 11: 127-152.
116. Pagana, Kathleen Deska. *Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests*. St. Louis: Mosby, Inc., 1998.
117. Bonifacino, JS, Dasso, M, Harford, JB, Lippincott-Schwartz, J, and Yamada, KM. *Current Protocols in Cell Biology*, 2000 ; Wiley, New York.
118. Burnette WM. 'Western Blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981;112:195-203.
119. Smith PK ve ark. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 1985; 150 (1): 76–85.
120. Kruskal, William H. Historical Notes on the Wilcoxon Unpaired Two-Sample Test" *Journal of the American Statistical Association* 1957; 52 (279): 356–360.
121. Pellegatta S, Cuppini L, Finocchiaro G. Brain Cancer Immunoediting: Novel Examples Provided by Immunotherapy of Malignant Gliomas. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2011; 11(11): 1759-1774.
122. Sarafian V, Koev I, Staykov D. Mechanisms of Cell Resistance in Glioblastoma Multiforme. *Journal of IMAB* 2009 ; (1):6-8.

123. Sunde AR, Raines AM. Selenium Regulation of the Selenoprotein and Nonselenoprotein Transcriptomes in Rodents. *American Society for Nutrition Adv. Nutr.* 2011; 2: 138-150.
124. Schweizer U, Brauer AU, Köhrle J, Nitsch R ve ark. Selenium and Brain Function : A Poorly Recognized Liaison. *Brain Research Reviews* 2004 ; 45 :164-178.
125. Kaur P, Evje L, Ascher M, Syversen T. The *in vitro* Effects of Selenomethionine on Methylmercury-induced Neurotoxicity. *Toxicology in Vitro* 2009; 23: 378-385.
126. El-Bayoumy K, Sinha R. Molecular Chemoprevention by Selenium : A Genomic Approach. *Mutation Research* 2005; 591: 224-236.
127. Rooprai HK, Christidou M, Pilkington GJ. The Potential for Strategies Using Micronutrients and Heterocyclic Drugs to Treat Invasive Gliomas. *Acta Neurochir.* 2003; 145: 683-690.
128. Wang H, Zhang J, Yu H. Elemental Selenium at Nano Size Possesses Lower Toxicity without Compromising the Fundamental Effect on Selenoenzymes: Comparison with Selenomethionine in mice. *Free Radical Biology&Medicine* 2007; 42: 1524-1533.
129. Lin PC, Lin SZ, Chen YL, Chang JS ve ark. Butylidenephthalide Suppresses Human Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) in Human Glioblastomas. *Ann Surg Oncol* 2011; 18(12):3514-27.
130. Sanmartin C, Plano D, Sharma AK, Palop JA. Selenium Compounds, Apoptosis and Other Types of Cell Death : An Overview for Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2012 ; (13): 9649-9672.
131. Li S, Zhou Y, Dong Y, Ip C. Doxorubicin and Selenium Cooperatively Induce Fas Signaling in the Absence of Fas/ Fas Ligand Interaction. *Anticancer Research* 2007 ; 27: 3075-3082.
132. Davis CD, Uthus EO. DNA Methylation, Cancer Susceptibility, and Nutrient Interactions. *Exp Biol Med* 2004; 229(10): 988-995.
133. Davis CD, Uthus EO, Finley JW. Dietary Selenium and Arsenic Affect DNA Methylation In Vitro in Caco-2 Cells and In Vivo in Rat Liver and Colon. *J. Nutr.* 2000; 130 (12): 2903-2909.

134. Michaud K, Solomon DA, Oermann E, Kim JS ve ark. Pharmacologic Inhibition of cdk4/6 Arrests the Growth of Glioblastoma Multiforme Intracranial Xenografts. *Cancer Res.* 2010; 70(8): 3228–3238.
135. Schweizer U, Schomburg L, Savaskan NE. The Neurobiology of Selenium : Lessons from Transgenic Mice. *J. Nutr.* 2004; 134(4): 707-710.
136. Davis CD, Tsuji PA, Milner JA. Selenoproteins and Cancer Prevention. *Annu. Rev. Nutr.* 2012; 32:73-95.

## 8. EKLER

### EK-1 Etik Kurul Onayı

<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	<b>Karar No:2011/04- 13</b>	<b>Tarih:15.02.2011</b>				
Prof.Dr.Gül Güner AKDOĞAN'ın sorumlusu olduğu " Selenyumun insan glioblastoma multiforme hücre hatlarında in vitro etkilerinin araştırılması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.						
<b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b>						
<b>ÇALIŞMA ESASI</b>	Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurullar Yönetmeliği, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
<b>ETİK KURUL ÜYELERİ</b>						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Ph.D.Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Ph.D..Z.Candan ALGUN	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Ph.D.Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Işıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.PhD.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yılı Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

## ÖZGEÇMİŞ

### A. GENEL

<b>DÜZENLEME TARİHİ</b>	<b>:11.01.2013</b>
<b>T.C. KİMLİK NO</b>	<b>:17920772634</b>
<b>ÜNVANI ADI SOYADI</b>	<b>:Araş. Gör. Duygu Harmancı</b>
<b>YAZIŞMA ADRESİ</b>	<b>: DEÜ Tıp Fakültesi Öğrenme Kaynakları Merkezi ARLAB 35340 Narlıdere/İzmir</b>
<b>DOĞUM TARİHİ ve YERİ</b>	<b>: 28/07/1987 İZMİR</b>
<b>TEL : 0232 412 46 76</b>	<b>GSM: 0507 768 29 83</b>
<b>E-POSTA : duyguharmanci@gmail.com</b>	

### B. EĞİTİM

ÖĞRENİM DÖNEMİ	DERECE	ÜNİVERSİTE	ÖĞRENİM ALANI
2009-2013	Yüksek Lisans	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp AD
2005-2009	Lisans	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi- Kimya Bölümü
2004-2005	Lise	Keşan Anadolu Lisesi	Matematik-Fen

### C. AKADEMİK MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Moleküler Tıp	Araştırma Görevlisi	2010-
Viyana Tıp Üniversitesi	Avusturya	Viyana	Moleküler Nöroonkoloji Araştırma Birimi	Konuk Araştırmacı	2011

### D. KATILDIĞI/GÖREV ALDIĞI MESLEKİ BİLİMSEL ETKİNLİKLER

4-5 Aralık 2012, İzmir, Türkiye	ARLAB Hücresel, Moleküler ve Analitik Teknikler Kursu, ( Yardımcı Eğitici olarak)
24-25 Kasım 2012, İstanbul, Türkiye	1. Ulusal Moleküler Biyoloji Kongresi (poster bildirisi ile katılımcı olarak)
25-28 Eylül 2012, Konya, Türkiye	XXIV Ulusal Biyokimya Kongresi (poster bildirisi ile katılımcı olarak, konaklama bursu alındı)
13-16 June 2012 , Opatija, Croatia	FEBS3+ Meeting From Molecules to life and back, (Poster bildirisi ile katılımcı olarak, kayıt ve konaklama bursu alındı)
29-30 March 2012, İzmir, Türkiye	FEBS Workshop on Biochemistry and Molecular Biology Education Trends&Tips, (Poster bildirisi ile katılımcı olarak-aynı zamanda lisansüstü

	öğrenci düzenleme kurulu üyeliği)
23 Eylül 2012,	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi V. ÖÇM Sempozyumu, (Poster bildirisi ile katılımcı olarak)
4 Mayıs 2011, İzmir, Türkiye	Proteomik : Temel Bilgiler ve Uygulama Örnekleri, ( İzlenimci - Katılımcı Olarak)
31 Mayıs- 3 Haziran 2011, İzmir, Türkiye	Kanser Biyolojisinde Güncel Konular Teorik Kurs, ( İzlenimci - Katılımcı Olarak)
27-30 Nisan 2011, İzmir, Türkiye	6th ORPHEUS Conference PhD Quality Indicators for Biomedicine and Health Sciences, (Poster bildirileri ile, aynı zamanda Lisansüstü Öğrenci Kurulu Üyesi olarak)
11-13 Şubat 2011, Çeşme, Türkiye	Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi, ( İzlenimci - Katılımcı Olarak) – (Kongre Burslusu olarak)
31 Ocak 2011, İzmir, Türkiye	AB 7. Çerçeve Programı Marie Curie Araştırma Programları ve Bursları Bilgi Günü, ( İzlenimci - Katılımcı Olarak)
16-18 Aralık 2010, İzmir, Türkiye	KLİNİK LABORATUARLARDA ANALİTİK KALİTE YÖNETİMİ VE REFERANS ARALIKLARI HESAPLAMA KURSU (izlenimci/katılımcı olarak)
İzmir, 30 Kasım- 1 Aralık	ARLAB Hücresel, Moleküler ve Analitik Teknikler Kursu, ( Yardımcı Eğitici olarak)
Eskişehir, 27-30 Ekim 2010	XXII. ULUSAL BİYOKİMYA KONGRESİ, ( izlenimci/katılımcı olarak )
İstanbul, 20 October 2010	ATCC Cell Culture Seminar ( izlenimci/katılımcı olarak )
İzmir, 12-14 October 2010	EBI Bioinformatics Roadshow ( izlenimci/katılımcı olarak )
Ürkmez, 1-2 Ekim 2010	Laboratuvar Hayvanları Bilimi Sempozyumu ( izlenimci/katılımcı olarak)
İzmir, 24 Eylül 2010	Thermo Scientific Varioskan Multi-Mode Mikro Plaka Okuyucu, Derin dondurucu ve Cryo Plus Sıvı Azotlu Soğutucu Sistemi Kullanıcı Eğitimi( izlenimci/katılımcı olarak)
İzmir, 15-18 Haziran 2010	Oksidatif Stres, DNA Hasarı, DNA Onarımı, Hastalıklarla İlişkisi ( izlenimci/katılımcı olarak )
İzmir, 5-6 Mayıs 2010	Onkolojide Bioinformatik ve Biyonanoteknolojik Yöntemler Kursu ( izlenimci/katılımcı olarak )
İzmir, 23 Mart 2010	EBİLTET 2.Kök Hücre Sempozyumu ( izlenimci/katılımcı olarak )
İzmir, 16-23 Şubat 2010	Deney Hayvanları Kullanımı Sertifika Kurs Programı ( izlenimci/katılımcı olarak )
İzmir, 19 Şubat 2010	Araştırma- Buluş-Patent Yolunda Üniversite, ( izlenimci/katılımcı olarak )

İzmir, 8-12 Şubat 2010	Web-Based Clinical Case Simulations and Problem-Based Learning Tutorials ( izlenimci/katılımcı olarak )
------------------------	---

### E. PROJE DENEYİMİ

PROJE ADI	TARİH	GÖREV
Gastritli çocuklarda noninvaziv aktivite belirteçlerinin histopatolojik bilgilerle ilişkisinin incelenmesi- tamamlandı (Herhangi bir kuruluştan destek alınmaksızın mevcut malzemelerle etik kurul onayı alınarak yapılmıştır)	2012	Araştırmacı
2011.KB.SAG. 024 –(Dokuz Eylül Üniversitesi BAP) Selenyumun insan glioblastoma multiforme hücre hatlarında in vitro etkilerinin araştırılması – tamamlandı	2012	Araştırmacı

### F. HAKEMLİ KONFERANS/SEMPOZYUMLARIN BİLDİRİ KİTAPLARINDA YER ALAN YAYINLAR

1. Seleno-L-Methionine Plays Role In Glioblastoma Multiforme Cells GMS-10 and DBTRG-05MG Cell Proliferation and Cell Death – <u>Duygu Harmancı</u> , Zübeyde Erbayraktar, Gül Güner – 1. Ulusal Moleküler Biyoloji Kongresi, 24-25 Kasım 2012, İstanbul, Türkiye
2. Sodium Selenite Influences Cell Proliferation and Cell Cycle of SF4433 Human Meningioma Cells – <u>Duygu Harmancı</u> , Zübeyde Erbayraktar, Oya Sayın, Gül Güner – XXIV Ulusal Biyokimya Kongresi, 25-28 Eylül 2012, Konya, Türkiye
3. In Vitro Effects of Seleno-L-Methionine on Glioblastoma Multiforme Cell Proliferation and Death – <u>Duygu Harmancı</u> , Zübeyde Erbayraktar, Gül Güner – Congress 22nd IUBMB-37th FEBS 4-9 September 2012, Sevilla, Spain
4. Detrimental and Cell Cycle Arresting Effects of Sodium Selenite Treatment on Glioblastoma Multiforme Cell Lines and Primary Cells - <u>Duygu Harmancı</u> , Zübeyde Erbayraktar, Gül Güner – FEBS3+ Meeting From Molecules to life and back, Abstract Book p152, 13-16 June 2012, Opatija, Croatia
5. Post- Graduate Education in Molecular Medicine at Graduate School of Health Sciences, Dokuz Eylül University, Izmir, Turkey – <u>Duygu Harmancı</u> , Zübeyde Erbayraktar, Gül Güner – FEBS Workshop on Biochemistry and Molecular Biology Education Trends& Tips, Abstract Book p106, 29-30 March 2012, Izmir, Türkiye
6. An Outlook to the Scientific Activities of Supervisors at Dokuz Eylül University Graduate School of Health Sciences – Reza Salimi, Mehtap Yüksel Eğrilmez, Roghaiyeh Safari, <u>Duygu Harmancı</u> , Güldal Kırkcalı, Gül Güner - FEBS Workshop on Biochemistry and Molecular Biology Education Trends& Tips,

Abstract Book p110, 29-30 March 2012, Izmir, Türkiye
7. Selenyum ve Bir Beyin Tümörü : Glioblastoma Multiforme –Ümit Öztürk, Özlem Dinc, Cisem Duman, Nesibe Kübra Göl, Tuba Akide Çoban, <u>Duygu Harmancı</u> , Gül Güner – 5. Özel Çalışma Modülü Sempozyumu, Özet Kitabı s9, Eylül 2011, Izmir, Türkiye
8. Post- Graduate Education in Molecular Medicine at Graduate School of Health Sciences, Dokuz Eylül University, Izmir, Turkey – <u>Duygu Harmancı</u> , Zübeyde Erbayraktar, Roghaiyeh Safari, Gül Güner - 6th Orpheus Conference 2011- PhD Quality Indicators for Biomedicine and Health Sciences, Dokuz Eylül University Abstract Book p51, 27-30 April 2011, Izmir/ Turkey
9. An Outlook to the Scientific Activities of Supervisors at Dokuz Eylül University Graduate School of Health Sciences – Reza Salimi, Mehtap Yüksel Eğrilmez, Roghaiyeh Safari, <u>Duygu Harmancı</u> , Güldal Kırkali, Gül Güner - 6th Orpheus Conference 2011- PhD Quality Indicators for Biomedicine and Health Sciences, Dokuz Eylül University 2011, Abstract Book p55, 27-30 Izmir/ Turkey
10. An Outlook to Journal Publications From Theses of MSc and PhD Students at Dokuz Eylül University Graduate School of Health Sciences - Mehtap Yüksel Eğrilmez, Şeniz İnanç, Feriha Özkaya, Reza Salimi, <u>Duygu Harmancı</u> Roghaiyeh Safari, Güldal Kırkali, İbrahim Astarcioglu, Gül Güner - 6th Orpheus Conference 2011- PhD Quality Indicators for Biomedicine and Health Sciences, Dokuz Eylül University 2011, Abstract Book p66, 27-30 April 2011 Izmir/ Turkey
11. Educational Views and Opinions of MSc and PhD Students About the Molecular Medicine Programme at the University of Dokuz Eylül University - Roghaiyeh Safari, <u>Duygu Harmancı</u> , Vildan Mevsim, Gül Güner - 6th Orpheus Conference 2011- PhD Quality Indicators for Biomedicine and Health Sciences, Dokuz Eylül University 2011, Abstract Book p77, 27-30 April 2011 Izmir/ Turkey
12. Detrimental and Cell Cycle Arresting Effects of Sodium Selenite Treatment on Glioblastoma Multiforme Cell Lines and Primary Cells - <u>Duygu Harmancı</u> , Zübeyde Erbayraktar, Gül Güner – FEBS3+ Meeting From Molecules to life and back, Abstract Book p152, 13-16 June 2012, Opatija, Croatia
13. Post- Graduate Education in Molecular Medicine at Graduate School of Health Sciences, Dokuz Eylül University, Izmir, Turkey – <u>Duygu Harmancı</u> , Zübeyde Erbayraktar, Gül Güner – FEBS Workshop on Biochemistry and Molecular Biology Education Trends& Tips, Abstract Book p106, 29-30 March 2012, Izmir, Türkiye
14. An Outlook to the Scientific Activities of Supervisors at Dokuz Eylül University Graduate School of Health Sciences – Reza Salimi, Mehtap Yüksel Eğrilmez, Roghaiyeh Safari, <u>Duygu Harmancı</u> , Güldal Kırkali, Gül Güner - FEBS Workshop on Biochemistry and Molecular Biology Education Trends& Tips, Abstract Book p110, 29-30 March 2012, Izmir, Türkiye

#### G. ÜYE OLUNAN MESLEKİ BİLİMSEL KURULUŞLAR

2010-	Türk Biyokimya Derneği, Ankara (2012-İzmir Şubesi Dernek Saymanlığı)
-------	--