



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**PRİMER GLİOBLASTOMA MULTİFORME TÜRÖR
HÜCRELERİNDE LOMEGUATRİB TEMOZOLOMİD
KOMBİNASYONUNUN MGMT METİLASYONU VE
EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Mehmet TAŞPINAR

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU**

2010- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PRİMER GLİOBLASTOMA MULTİFORME TÜMÖR
HÜCRELERİNDE LOMEGUATRİB TEMOZOLOMİD
KOMBİNASYONUNUN MGMT METİLASYONU VE
EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Mehmet TAŞPINAR

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU**

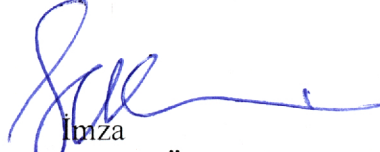
2010- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Doktora Programı

Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/12/2010



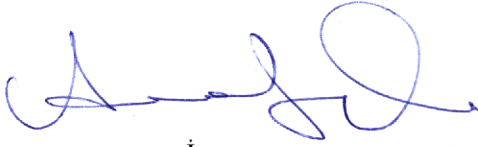
İmza

Prof. Dr. Şefik GÜRAN

GATA

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri Başkanı



İmza

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji A.D.



İmza

Prof. Dr. Haluk ATAÖĞLU

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D.



İmza

Prof. Dr. Çiğdem GÜNGÖR

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D.



İmza

Doç. Dr. Ashlan AVCI

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyokimya A.D.

Raportör

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	x
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1.Sinir Sistemi Hücreleri	1
1.1.1.Glia Hücrelerinin Sınıflandırılması	2
1.1.1.1. Makroglialar	3
1.1.1.1.1. Astrositler	3
1.1.1.1.2. Oligodendrositler	5
1.1.1.1.3. Ependimal hücreler	6
1.1.1.1.4. Radyal Glia	7
1.1.1.2. Mikroglia	7
1.1.1.3. Shwann Hücreleri	8
1.1.1.3.1. Satellit Hücreleri	8
1.1.2. Glia Hücreler ve Hastalıklar	8
1.2. Beyin Tümörleri	9
1.2.1. Glioblastoma Multiforme	12
1.2.1.1. GBM'in Genetik Özellikleri	14
1.2.1.2. GBM Tedavisi	17
1.2.1.2.1. GBM Tedavisinde Cerrahi	17
1.2.1.2.2. GBM Tedavisinde Radyoterapi	18
1.2.1.2.3. GBM Tedavisinde Kemoterapi	18
1.3.Alkilasyon Ajanlarının Sitotoksik Etkisi	20
1.3.1. Alkilasyon Ajanlarına Karşı Dirençte Rol Alan Tamir Enzimleri	23
1.3.1.1. MGMT	23
1.3.1.1.1. MGMT Ekspresyonu ve Düzenlenmesi	23
1.3.1.1.2. MGMT Tamir Mekanizması	25
1.3.1.2. MGMT İnhibitörleri	27
1.3.1.2.1. O ⁶ -Benzilguanin	29
1.3.1.2.2. Lomeguatrib	30
1.4.Temozolomid	31
1.4.1. TMZ Aktivasyonu	32
1.4.1.1.TMZ Aktivasyon Mekanizması	33
1.4.2.Farmakokinetik ve Toksik Etki	34
1.4.3. TMZ'nin Sitotoksik Etkisine Direnç	35
1.4.4. TMZ'nin Klinik Kullanımdaki Önemi	39
1.5.Amaç	40

2. GEREÇ VE YÖNTEM	41
2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar	41
2.1.1. Hücre Kültürü	41
2.1.2. İmmünohistokimya	44
2.1.3. [3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid] (MTT) Sitotoksosite Testi	45
2.1.4. RNA İzolasyonu	45
2.1.4.1. RNA Kantitasyonu	46
2.1.5. Komplementer DNA (cDNA) İzolasyonu	46
2.1.6. Genomik DNA İzolasyonu	46
2.1.7. Bisüfit DNA Modifikasyonu	47
2.1.8. Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (MS-PZR)	48
2.1.9. Gerçek Zamanlı PZR (RT-PZR)	48
2.1.10. Tek Hücre Jel Elektroforezi (COMET)	49
2.1.11. Agaroz Jel Elektroforezi	50
2.1.12. Akım Sitometrisi	51
2.2. Yöntemler	51
2.2.1. Primer Hücre Kültürü	51
2.2.1.1. Standart Hücre Kültürü	53
2.2.2. İmmünohistokimya	54
2.2.3. MTT ile Sitotoksosite Testi	56
2.2.4. RNA İzolasyonu	58
2.2.5. cDNA İzolasyonu	61
2.2.6. Kültüre Edilen Hücrelerden DNA izolasyonu	62
2.2.7. DNA Modifikasyon Protokolü	63
2.2.8. Metilasyon Spesifik PZR (MS-PZR)	65
2.2.9. RT-PZR	66
2.2.10. Tek Hücre Jel Elektroforezi (COMET)	66
2.2.11. Agaroz Jel Elektroforezi	68
2.2.12. Akım Sitometrisi	68
2.3. Sonuçların Değerlendirilmesi	69
3. BULGULAR	70
3.1. Primer Hücre Kültüründen Glia Kökenli Hücrelerin Elde Edilmesi	70
3.2. Primer kültür hücrelerinde GFAP ekspresyonu yapan hücrelerin saptanması	75
3.3. MTT ile Sitotoksosite Analizi	78
3.4. MS-PZR	81
3.5. MTT IC ₅₀ Değerleri ve Metilasyon Yapıları Arasındaki İlişki	83
3.6. MGMT ve p53 Ekspresyon Analizi	83
3.7. Akım Sitometri Analizi	87
3.8. Tek Hücre Elektroforezi	91
4. TARTIŞMA	93
4.1. GBM'de Primer Kültür Oluşturma	93
4.2. MGMT Metilasyonu ve TMZ Direnci	96
4.3. Lomeguatrib, Klinik Öncesi ve Klinik Uygulamaları	99
4.4. MGMT ve p53 Ekspresyonu Arasındaki İlişki	104
4.5. Lomeguatrib, MGMT ve p53 Ekspresyonu	106

5. SONUÇ ve ÖNERİLER	109
ÖZET	111
SUMMARY	112
KAYNAKLAR	113
EKLER	121
EK-1	121
ÖZGEÇMİŞ	124

ÖNSÖZ

GBM hastalarının kemoterapötik tedavisinde kullanılan Temozolomid'e yanıtları farklılık göstermektedir. Ayrıca, tedavi sürecinde Temozolomid'e direnç gelişebilmektedir. Bu direncin gelişmesinde O⁶-Metilguanin- DNA-Metiltransferaz (MGMT) enzimi rol almaktadır. MGMT enzimini inhibe etmek için MGMT inhibitörleri geliştirilmektedir. Lomeguatrib, bu MGMT inhibitörlerinde biridir. Bu tez çalışmasında, GBM hastalarından alınan primer hücre kültürlerinde ve GBM hücre dizilerinde Lomeguatrib kullanılmıştır. Lomeguatrib'in GBM primer hücrelerinde ve hücre dizilerinde MGMT ekspresyonunu düşürdüğü, ancak bunu metilasyon mekanizması üzerinden yapmadığı ilk kez gösterilmiştir. Bu tez çalışması sonunda, GBM hastalarında Lomeguatrib'in Temozolomid ile birlikte kullanılabilmesi önerilmektedir.

Doktora eğitimim süresince ve tez çalışmamda yardımlarıyla, desteğiyle ve problemlerin çözümünde yol göstericiliğiyle her zaman yanımda olan tez danışmanım Prof.Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na, tümör dokularının temininde ve tez çalışması sırasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Hasan Çağlar UĞUR'a, immünohistokimya yöntemini öğrenmemde yardımcı olan Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a, akım sitometri analizlerinde yardımcı olan Öğr.Gör. Dr. Hande CANPINAR'a, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm hocalarıma, tezin istatistiksel analizlerini yapan, değerlendiren manevi kardeşim, dostum Uzm. Dr. Derya ÖZTUNA'ya, tez süresince destekleriyle her zaman yanımda olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Biyoistatistik Anabilim Dalı çalışanlarına en içten duygularıyla teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Eğitimimin her aşamasında sonsuz sevgi, anlayış ve sabırla bana destek olan sevgili aileme, akademik yaşama katılmamda bana destek olan ve karşılaştığım her konuda desteğini gördüğüm manevi babam Prof. Dr. Mehmet KOYUNCU'ya, anlayışı ve sevgisiyle hayattaki en büyük destekçim olan sevgili eşime ve en büyük doktora tezime, sevinç ve umut kaynağım kızım İpek'e sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

AA	Anaplastik Astrositom
AIC	5-Aminoimidazole-4-Karboksamid
ATP	Adenozin trifosfat
AUC	Plazma Konsantrasyonunun Altındaki Alan
Baz Çifti	BÇ
BER	Baz Çıkarım Tamiri
BLU	Akciğer Kanseri B-Katenin Geni
Ca ⁺⁺	Kalsiyum iyonu
CDK	Cyclin Bağımlı Kinaz
CDKN2A	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2
cDNA	Komplementer DNA
C _{maks}	Plazma Tepe Konsantrasyonu
COMET	Tek Hücre Jel Elektroforezi
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dH ₂ O	distile su
DKK-1	Dickkopf-1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoxynükleotid Trifosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DTIC	Dakarbazin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraasetik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ELISA	Enzim ilintili immün test

FBS	Fötal Dana Serumu
FITC	Fluorescein İzotiyosiyanat
G2	Gap2
G6PD	Glikoz 6 Fosfatdehidrogenaz
GBM	Glioblastoma Multiforme
GFAP	Glial Fibriler Asidik Protein
GM-CSF	Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
GREs	Glikokortikoid Yanıt Elementleri
GRP78	Glikoz Düzenleyici Protein 78
Gy	Gray
HDM2	İnsan Double Minute 2
IC ₅₀	İnhibitör doz
IDH1	İzositrat Dehidrogenaz 1
IDL	Eklenme / Çıkarılma
IGFRBP	İnsülin Büyüme Faktörü Bağlanma Proteini
K ⁺	Potasyum iyonu
kb	Kilobaz
LOH	Heterozigosite Kaybı
MAPK	Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz
MGMT	O ⁶ -Metilguanin- DNA-Metiltransferaz
MMR	Yanlış Eşleşme Tamir Merkanizması
MSH	Muts Homoloğu
MS-PZR	Metilasyon Spesifik-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
MTIC	Metil-Triazen-İmidazol-Karboksamid
MTT	[3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid]
MutL	Mlh Homoloğu
N1-O ⁶ -G	N1-O ⁶ -Etanoguanin
N ³ MeA	N ³ -metiladenin
N ³ MeG	N ³ -metilguanin
N ⁷ MeG	N ⁷ -metilguanin

NAD ⁺	Nikotinamid Dinükleotit
NER	Nükleotit Çıkarım Tamiri
NFκB	Nükleer Faktör κB
ng	nanogram
O ⁴ MeT	O ⁴ -metiltimin
O ⁶ -BG	O ⁶ -Benzilguanin
O ⁶ -BTG	O ⁶ -(4-Bromotenil) Guanin
O ⁶ -CIG	O ⁶ -kloroetilguanin
O ⁶ MeG	O ⁶ -metilguanin
PAR	Poli Adp-Riboz
PARP	Poly(Adp-Riboz) Polimerazlar
PBS	Fosfat Tuz Tamponu
PCV	Prokarbazin, Lomustin, Vinkristin
PDGFRA	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü A
PI3K	Fosfatidilinositol 3 Kinaz
PKB	Protein Kinaze B
pRB1	Retinoblastom Yatkınlık Lokusu 1 Protein
PSS	Periferik Sinir Sistemi
PTEN	Fosfat ve Tensin Homolog
RCF	Rölatif Santrifüj Gücü
RNA	Ribonükleik Asit
RNAi	RNA interferans
RPM	Dakikadaki Devir Sayısı
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PZR	Gerçek Zamanlı PZR
TBE	Tris-Borik Asit EDTA
TE	Tris EDTA
TMZ	Temozolomid
TP53	Tümör Baskılayıcı Protein 53
V _d	Dağılım Hacmi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Sinir sistemi hücrelerinin sınıflandırılması	3
Şekil 1.2. Glia-nöron ilişkisinin gösterimi	6
Şekil 1.3. Primer ve seonder GBM gelişmesinde meydana gelen genetik değişiklikler	16
Şekil 1.4. Alkilasyon ajanlarının sitotoksik etkisi	22
Şekil 1.5. MGMT inaktivasyon mekanizması	26
Şekil 1.6. MGMT inhibitörleri	28
Şekil 1.7. O ⁶ -BG'nin aktivasyon mekanizması	29
Şekil 1.8. Triazin'lerin genel yapısı	32
Şekil 1.9. TMZ'nin aktivasyon mekanizması	34
Şekil 1.10. TMZ'nin sitotoksik mekanizması	38
Şekil 2.1. MTT testi için 96 kuyucuklu bir plağa ilaçların farklı konsantrasyonlarda eklenme düzeni	57
Şekil 2.2. Farklı zamanlarda hücre kültüründe elde edilen RNA örneklerinin genel görüntüsü	60
Şekil 2.3. cDNA'nın varlığının kontrol edilmesi.	62
Şekil 2.4. Farklı zamanlarda hücre kültüründen elde edilen genomik DNA örneklerinin genel görüntüsü	63
Şekil 2.5. RT-PZR için oluşturulan standart eğri	66
Şekil 2.6. DNA hasarının COMET ile gösterimi	68
Şekil 3.1. Tümör dokusundan çoğalan hücrelerin görüntüleri	73
Şekil 3.2. Tümör dokusundan elde edilen hücre topluluğuna ait bir görüntü	73
Şekil 3.3. Kültür hücrelerinin çoğalmasıyla oluşan yoğun hücre popülasyonuna ait örnek görüntüler	73

Şekil 3.4. Primer kültürde birbirlerinden farklı tümör dokularından elde edilen astrositlerin görüntüsü-1	74
Şekil 3.5. Primer kültürde birbirlerinden farklı tümör dokularından elde edilen astrositlerin görüntüsü-2	75
Şekil 3.6. Glia kökenli hücrelerin GFAP ile gösterimi-1	76
Şekil 3.7. Glia kökenli hücrelerin GFAP ile gösterimi-2	77
Şekil 3.8. Glia kökenli hücrelerin GFAP ile gösterimi-3	78
Şekil 3.9. MGMT metilasyonunun agaroz jeldeki görüntüsü	82
Şekil 3.10. Lomeguatrib ve TMZ sonrası MGMT metilasyon analizinin (U-118 MG için) jeldeki görüntüsü	82
Şekil 3.11. Lomeguatrib ve TMZ sonrası MGMT metilasyon analizinin (T98G için) jeldeki görüntüsü	82
Şekil 3.12. Lomeguatrib ve TMZ sonrası MGMT metilasyon analizinin (SÇ için) jeldeki görüntüsü	82
Şekil 3.13. Akım sitometri analizi sonucu elde edilen örnek görüntü	88
Şekil 3.14. NB isimli hastanın kontrol grubuna ait akım sitometri grafiği	88
Şekil 3.15. NB isimli hastanın TMZ grubuna ait akım sitometri grafiği	88
Şekil 3.16. NB isimli hastanın Lomeguatrib grubuna ait akım sitometri grafiği	89
Şekil 3.17. NB isimli hastanın Temozolomid + Lomeguatrib grubuna ait akım sitometri grafiği	89

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. MSS tümörlerinin genel sınıflandırılması	10
Çizelge 1.2. Glioma sınıflandırılması	11
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan hücre dizilerinin özellikleri	43
Çizelge 2.2. MGMT metilasyon analizi için PZR şartları	65
Çizelge 2.3. MGMT, p53 ve G6PD için RT-PZR şartları	66
Çizelge 3.1. Primer kültür yapılan hastalara ait genel bilgiler	72
Çizelge 3.2. Primer kültür hücrelerinin TMZ ve TMZ + Lomeguatrib kombinasyonu sonrasında kontrole göre canlılık düzeyleri	79
Çizelge 3.3. Hücre dizilerinin TMZ ve TMZ + Lomeguatrib kombinasyonu sonrasında kontrole göre canlılık düzeyleri	80
Çizelge 3.4. Primer kültür hücrelerinde ve hücre dizilerinde TMZ ve TMZ + Lomeguatrib kombinasyonu için elde edilen IC ₅₀ değerlerinin dağılımı	81
Çizelge 3.5. Primer kültür yapılan hastaların ve hücre dizilerinin MGMT metilasyon yapıları	81
Çizelge 3.6. MGMT metilasyon yapılarına göre MTT değerlerinin karşılaştırılması	83
Çizelge 3.7. Primer kültür hücrelerinde ilaç uygulaması sonrasında MGMT ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler	84
Çizelge 3.8. Hücre dizilerinde ilaç uygulaması sonrasında MGMT ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler	84
Çizelge 3.9. Gruplar arasında MGMT ekspresyonuna ait değişikliklerin istatistiksel değerlendirilmesi	85
Çizelge 3.10. Primer kültür hücrelerinde ilaç uygulaması sonrasında p53 ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler	86
Çizelge 3.11. Hücre dizilerinde ilaç uygulaması sonrasında p53 ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler	86

Çizelge 3.12. Gruplar arasında p53 ekspresyonuna ait değişikliklerin istatistiksel değerlendirilmesi	87
Çizelge 3.13. Akım sitometri sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi	90
Çizelge 3.14. Tek hücre jel elektroforezi sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi	92

1.GİRİŞ

1.1. Sinir Sistemi Hücreleri

Sinir sistemi, merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferik sinir sistemi (PSS) olarak iki kısımdan oluşur. PSS, vücudun dış bölge alıcısı gibi işlev gören, dışarıdan alınan duyu bilgilerini MSS'ne taşıyan ve bu bilgilere verilecek cevabı ilgili dokulara götüren sinir ağından oluşur. Sinir sistemi hücreleri genel olarak "Nöron" ve "Glia" hücresi olarak 2 gruba ayrılır. Sinir sisteminde hücrelerin %10'unu nöronlar ve %90'nını glia'lar oluşturmaktadır (Verkhatsky ve Butt, 2007). Glia ismi, yunanca "Gli" kelimesinden köken almıştır, yapışkan, yapışkan görünümlü ve tutkal anlamlarına gelmektedir. (Azevedo ve ark, 2009) Bu kelime, ilk kez 1858 yılında patolog Rudolf Ludwig Karl Virchow tarafından sinir macunu anlamında kullanılmıştır (Verkhatsky ve Butt, 2007).

Glia hücreleri evrimsel açıdan korunmuştur, farklı formda da olsalar omurgasızlardan insanlara kadar tüm canlılarda bulunmaktadır. Canlıların sahip olduğu glia hücre miktarı kendi fiziksel büyüklükleriyle orantılıdır. Küçük iplik kurdunda birkaç tane glia hücresi bulunurken, beyin hücrelerinin meyve sineğinde %25'i, farede %65'i, insanda %90'ı ve filde %97'sinin glia hücresi olduğu bildirilmiştir (Allen ve Barres, 2009). Organizmanın gelişim düzeyi arttıkça glia hücrelerinin çeşidi, oranı, fonksiyonu ve organizma için gerekliliği artmaktadır.

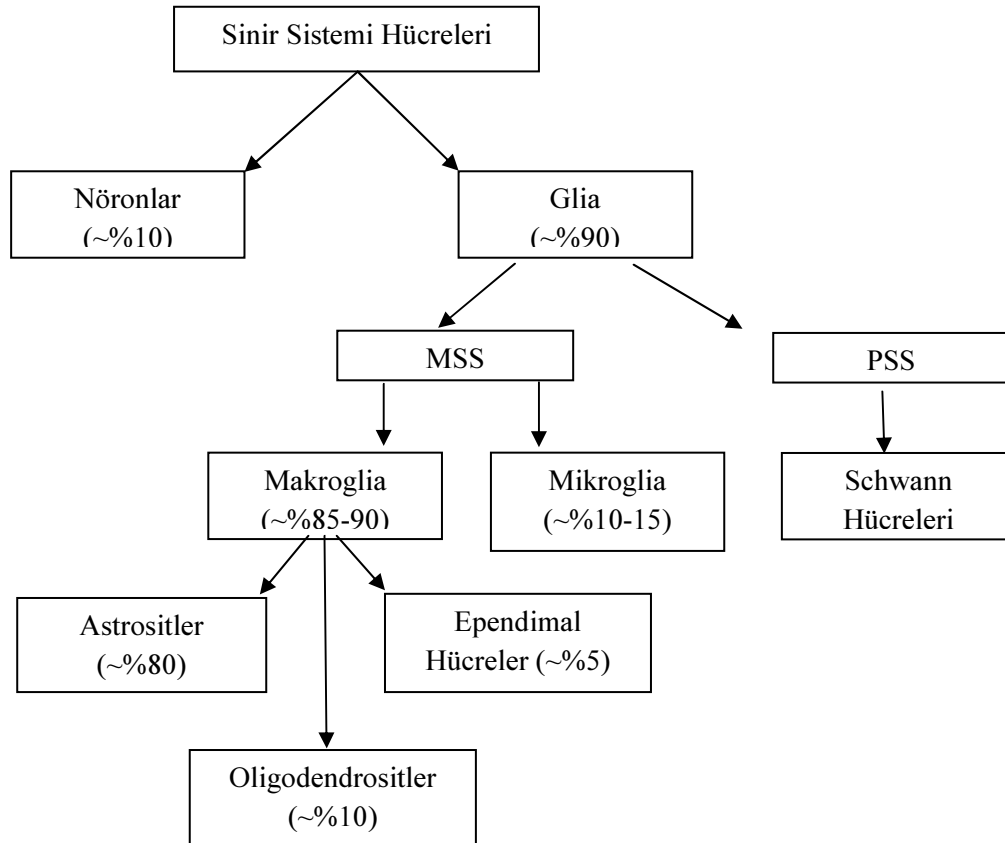
Sinir sisteminde önemli fonksiyonları olan glia hücreleri nöronların çevresinde yerleşiktir. Genel olarak bu hücreler, nöronlara fiziksel destek sağlanmasında, besin ve oksijen temininde, nöronal iletişimde, patojenlerin yok edilmesinde ve ölen nöronların temizlenmesinde görev almaktadır (Barres, 2008).

Glia hücreleri bir çok açıdan nöronlardan farklıdır. Glia hücreleri, uyarılara karşı aksiyon potansiyeli oluşturamazken, nöronların uyarılara karşı aksiyon potansiyeli oluşturabilmesi, glial hücrelerin mitotik, nöronların ise post mitotik olması en

belirgin iki farklılıktır (Herrup ve Yang, 2007; Allen ve Barres, 2009). Bu hücrelerin tek ortak özelliği ise her ikisinin de ektodermden (mikroglia hariç) gelişmesidir (Allen ve Barres, 2009). Embriyogenezin ilk aşamalarında, akson ve dendrit gelişimi için çeşitli moleküller üreten glia hücreleri, nöron göç sürecinin idaresini de sağlamaktadır (Verkhratsky ve Butt, 2007). Ayrıca, glialar, embriyonik gelişim sürecinde nöronların doğru lokalizasyonda yerleşimine rehberlik ederler (Allen ve Barres, 2009). Glia hücrelerinin dinamik yapısı, plastisitesi diğer hücrelerden farklıdır. Bunların nöronlara göre daha esnek bir hücre hücre ve hücre matriks ilişkisi vardır. Bu özellik onlara, MSS içerisinde kemokin sinyallerine göre göç kabiliyeti sağlamaktadır (Van Noort, 2006).

1.1.1. Glia Hücrelerinin Sınıflandırılması

Glia hücreleri, morfolojilerine, fonksiyonlarına ve sinir sistemindeki yerleşimlerine göre sınıflandırılmaktadır (Şekil 1.1) (Verkhratsky ve Butt, 2007). Genel olarak bu hücreler, MSS ve PSS’de yer alan glial hücreler olarak ayrıldığında, MSS’de yer alan hücreler “Makroglia” ve “Mikroglia”, PSS’de yer alan glia hücreler ise “Schwann hücreleri” olarak adlandırılır. Makroglia hücreleri, MSS’de yer alan glia hücrelerinin %85-90’nını, mikroglialar ise %10-15’ini oluşturmaktadır. Ayrıca embriyonik köken açısından bakıldığında mikroglialar hariç çoğu glia, embriyonal gelişim sırasında ektodermal dokudan gelişmektedir. Mikroglialar ise hematopoietik hücrelerden köken almıştır. MSS’de yer alan glia hücrelerinden oligodendrosit, ependimal ve astrositler nöral tüpün ventriküler zonundan gelişirken, PSS’de yer alan shwann hücreleri ve satellit hücreleri nöral krestten gelişir.



Şekil 1.1. Sinir sistemi hücrelerinin sınıflandırılması (Verkhatsky ve Butt, 2007)

1.1.1.1. Makroglialar

MSS'deki glial hücreler "makroglia" veya "nöroglia" olarak tanımlanır ve bu terim astrositleri (%80), oligodendrositleri (%15) ve ependimal hücreleri (%5) kapsar (Verkhatsky ve Butt, 2007).

1.1.1.1.1. Astrositler

Astrositler (Astroglia) makrogliaların en büyük grubunu ve fonksiyonel açıdan MSS'nin en önemli grubunu oluşturur. Protoplazmik ve fibröz olmak üzere iki tip astrosit vardır. Bu iki tip astrositin morfolojik farklılıklarına rağmen görevleri benzerlik gösterir. Protoplazmik astrositler, kısa ve kalın yapılarıyla çokca dallanma gösterirler ve tipik olarak gri maddede yer alırlar. Bunlar nöronların hücre gövdesiyle ve sinaptik bölgelerle ilişkilidir. Ayrıca, gri maddedeki protoplazmik astrositler birbirlerinden farklılık gösterebilir. Beyin ile ilgili bir çok önemli süreçte fonksiyonel olan astrositlerin aynı beyin bölgesinde bile birbirlerinden morfolojik olarak

farklılıklar içermesi beklenen bir durumdur (Barres, 2008). Fibröz astrositler ise uzun ve ince yapıda olup, az dallanma gösterirler ve yaygın olarak beyaz maddede yer alırlar. Fibröz astrositler nöronların aksonlarıyla ilişkilidir (Verkhratsky ve Butt, 2007; Allen ve Barres, 2009). Astrositlerin gelişim ve yetişkin dönemde beyin fonksiyonlarında ve bilgi sürecinde önemli role sahip olduğu bildirilmiştir (Sofroniew ve Vinters, 2010; Allen ve Barres, 2009). Astrositler beyinde homeostazisi sağlayan temel hücrelerdir ve birbirlerine oluklu bağlantılarıyla bağlıdırlar. Astrositlerin sinir sistemi içindeki sorumluluklarına ilişkin bilgiler aşağıda özetlenmiştir.

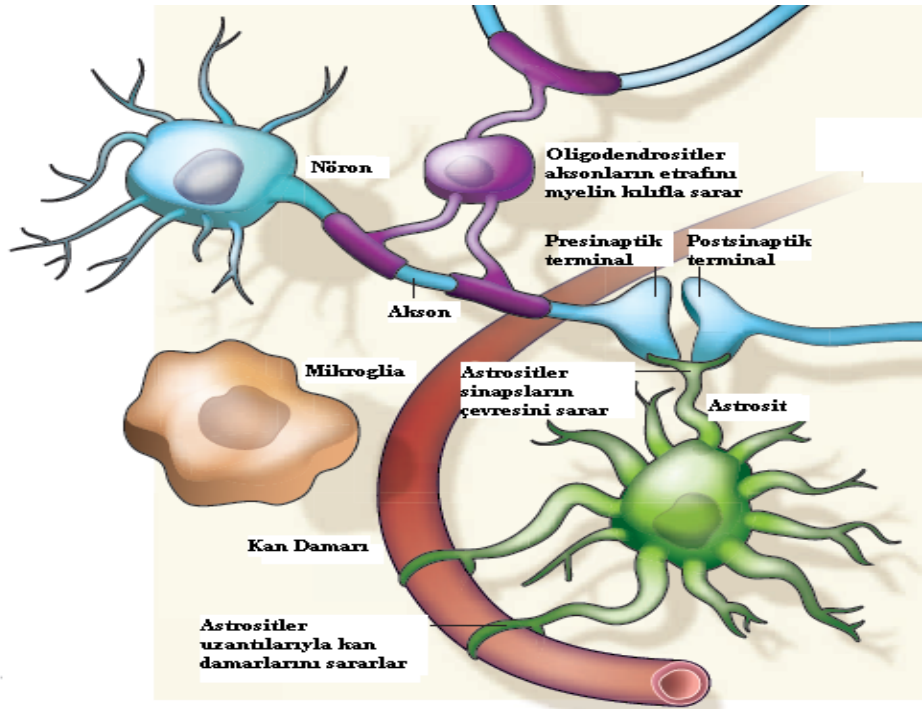
Astrositlerin fonksiyonları

- Akson gelişimi boyunca nöronların doğru yerleşimi için rehberlik yaparlar.
- Nöronlarla doğrudan ve çift yönlü ilişki kurarak ve bazı faktörler salarak hem presinaptik hem de post sinaptik süreci düzenlenler. Astrositler binlerce sinaptik bölge ile bağlantı kurabilir ve bu bölgelerde iki nöron ucuyla bağlantılı olarak bulunabilirler. Astrositler üzerinde bir çok nörotransmitter reseptör bulunmaktadır. Bir nöronun presinaptik ucundan bir nörotransmitter salındığında astrositik reseptörlerin de aktive olduğu, hücre içi Ca^{++} (Kalsiyum) iyonunun arttığı ve Ca^{++} sinyal yolağının aktive olduğu düşünülmektedir. Aktive olan astrositler, ATP (Adenozin trifosfat) gibi maddeler üreterek nöronal aktiviteyi ya artırır veya azaltırlar. Ayrıca, astrositler çeşitli proteinler salarak sinaps oluşumunu kontrol eder, presinaptik fonksiyonu düzenler ve postsinaptik cevabı ayarlar (Sofroniew ve Vinters, 2010).
- Hücreler arası alanda nörotransmitter ve K^{+} (Potasyum) gibi bazı iyonların düzeylerini kontrol ederler (Barres, 2008).
- Astrositler, bir çok nörotransmitter eksprese edebilmenin yanısıra, bilinen ve bilinmeyen bir çok nöroaktif madde salınımı yaparlar. Bu maddelerin çoğunun fonksiyonuna ilişkin bilgiler gizemini korusa da nöronların yaşamına, kan akışına, sinapsların gelişimine ve fonksiyonunun kontrol edilmesine yardımcı olduğu bilinmektedir (Barres, 2008).
- Sinaptik iletim sırasında salınan nörotransmitterlerin tekrar döngüye katılmalarını sağlayarak sinir iletimini desteklerler.

- Nöronların çevresindeki aşırı iyonların özellikle potasyumun kaldırılarak iyonik dengenin korunmasında görev alırlar.
- Aksonların yalıtımında görev alırlar (Allen ve Barres, 2009).
- Çeşitli maddeler salarak damar genişlemesinin ve daraltılmasının düzenlenmesinde görev alırlar. Kan damarları ve nöronlarla yakın ilişki kurarlar ve bu sayede kan akışını kontrol ederler (Şekil 1.2). Artmış nöronal aktiviteye cevaben, astrositler, kan damarlarına sinyaller ileterek bölgesel kan akışında artışa neden olurlar. Böylece ilgili bölgeye besin ve oksijen sağlanmış olur (Allen ve Barres, 2009).
- Astrositler glukozu laktata çevirirler. Nöronlara aktarılan laktat prövata dönüştürülerek enerji elde edilir (Allen ve Barres, 2009; Sofroniew ve Vinters, 2010)
- Ayrıca, astrositlerin kan beyin bariyerinin yapı taşı olduğuna ilişkin güncel teoriler vardır (Sofroniew ve Vinters, 2010).

1.1.1.1.2. Oligodendrositler

Oligodendrositler, astrositlerin %15'ini oluşturmaktadır. Bu hücreler, MSS'de aksonları örten, lipitten zengin kılıfın hammaddesi myelini üretirler. Myelinizasyon akson üzerindeki iyon kanallarının kümeleşmesine neden olur ve böylece sinir iletim hızı artırılır. Oligodendrositlerin hasarı, myelizasyonun bozulmasına ve dolayısıyla multipl skleroz ve kalıtsal nöropati gibi hastalıkların gelişmesine neden olur (Allen ve Barres, 2009). Ayrıca, oligodendrositlerin, sinaps oluşumunu da katkı sağladığı belirtilmektedir (Verkhatsky ve Butt, 2007).



Şekil 1.2. Glia-nöron ilişkisinin gösterimi (Allen ve Barres, 2009).

1.1.1.1.3. Ependimal hücreler

Ependimosit olarak adlandırılan ependimal hücreler, MSS oyuklarını doldururlar ve ventrikül duvarlarının düzenlenmesinde görev alırlar. Bu hücreler, beyin omurilik sıvısını üretir ve bunun salınımını yapar. Ependimal hücreler, spinal kord ve beyin serebrospinal sıvı dolu ventriküler sistem duvarlarında dizili hücrelerdir. Bu hücreler, serebrospinal sıvı ve MSS arasında ayırıcı tabaka görevi görür, iki kısım arasında madde alışverişini, CSF'in üretimi ve hareketini sağlar (Verkhatsky ve Butt, 2007; Allen ve Barres 2009). Şekil 1.1'de yer almayan ancak glia sınıflandırılmalarında yer alan diğer bir makroglia hücre tipi de Radyal Glia hücreleridir.

1.1.1.1.4. Radyal Glia

Nörogenezin başlamasından sonra nöroepitel hücrelerden meydana gelirler. Ancak, bu hücrelerin farklılaşma potansiyelleri nöroepitelere göre düşüktür. Radyal glia hücreleri, gelişen sinir sisteminde, nöron göçünde ve nöronal progenitor olarak görev yapar. Nöronlar yerleşimini tamamladıktan sonra radyal glia hücreleri kortikal astrositlere dönüşür (Allen ve Barres, 2009). Olgun beyinde, beyincik ve retinada radyal glial hücreler bulunur. Beyincikte bulunan radyal hücreler “Bergmann Glia Hücreleri” olarak adlandırılır ve sinaptik plastisiteyi düzenlerler. Retinada bulunan radial glia hücreleri “Müller hücreleridir” ve bunlar nöronların iki yönlü iletişimine katılırlar (Barres, 2008).

1.1.1.2. Mikroglia

Mikroglialar, mezodermden gelişen dolayısıyla nöronal kökenli olmayan, heterojen şekilli ve dikdörtgene benzer nükleusları olan hücrelerdir. Bunlar, makroglialara göre daha küçüktürler. Mikroglialar, erken gelişim döneminde beyne yerleşen, hematopoietik kökenli makrofajlardan köken almış, fagosit olarak davranan, göç edebilen ve büyük oranda kendini yenileme kapasitesine sahip olan hücrelerdir (Barres, 2008). Mikroglialar, MSS hücrelerinin %10-15’ini oluşturur. Beynin parankimasında yerleşik olan bu hücreler, beyin içerisindeki hasar ve benzeri değişimlerle dış çevreden gelen sinyalleri algılayan sensör gibi hareket ederler. Mikroglialar beyni hasar ve enfeksiyon açısından inceler, hasar meydana geldiğinde hemen çoğalır ve ölü hücreleri yok ederler. Nöronlarla sürekli iletişim halinde olan bu hücrelerin fagositik yeteneği normal immün sistem makrofajları kadar üstün değildir (Davalos ve ark., 2005). Mikroglialar, gelişim sırasında uygun olmayan sinaptik oluşumları kaldırarak sinaptik yeniden düzenlenmeyi ve nöronal ağın şekillenmesini sağlarlar (Hanish ve Kettenmann, 2007). Bu hücrelerin bir çok nörodejeneratif hastalıkta aktif hale geçtiği bildirilmiştir. Ancak, aktif mikrogliaların hastalıkların sürecine nasıl katkı sağladığı tam bilinmemektedir (Allen ve Barres, 2009).

1.1.1.3. Shwann Hücreleri

PSS'de yer alan glia hücreleri tıpkı oligodendrositler gibi nöron aksonlarının myelinizasyonundan sorumludur. Sinaps oluşumunu da indüklediği belirtilen bu hücreler fagositik aktivite gösterirler. PSS'de yer alan diğer bir önemli hücre tipi de satellit hücreleridir (Allen ve Barres, 2009).

1.1.1.3.1. Satellit Hücreleri

Bu hücreler, sensör, simpatik ve parasimpatik gangliada nöronların etrafında yer alan, nöronlara destek olan ve kimyasal çevrenin düzenlenmesinde rol alan küçük hücrelerdir. Satellit hücreler birbirlerine, astrositler gibi oluklu bağlantılarla bağlıdırlar. Bu hücreler, beyin hasarına ve inflamasyona duyarlıdırlar, ağrı gibi patolojik durumlara katılırlar (Verkhatsky ve Butt, 2007).

1.1.2. Glia Hücreler ve Hastalıklar

Beyin hücre popülasyonunun büyük bir kısmını glial hücreler oluşturduğu için bu hücrelerin beyin ile ilgili her türlü hastalığın (glioma, travmatik beyin hasarı, felç, omurilik hasarı, epilepsi, alzheimer, parkinson, down sendromu, otizm, vb.) patogenezinde yer alması beklenen bir durumdur (Sofroniew ve Vinters, 2010). Glia hücrelerinin beyinle ilgili hastalıklarda merkezi rol oynadığı ancak onların bu tam olarak aydınlatılmamış rollerinin ihmal edildiği de belirtmektedir (Barres, 2008). Glialar bir çok nöronal hastalığın gelişimine yardımcı olabildiği gibi engel de olabilir. Omurilik hasarı sonrasında astrositler glial bağ doku oluşturarak aksonların yeniden rejenerasyonunu engellerler. Nörodejeneratif hastalıklardan biri olan amiyotrofik lateral sklerozda astrositler motor nöronları öldüren toksik bir molekül salgırlar. Otoimmün hastalıklarda hedef hücreler oligodendrositlerdir ve bu nedenle bu tür hastalıklarda myelinizasyon kaybı temel etken faktördür. Ayrıca, klinik depresyonda da myelinizasyon kaybının saptandığı bildirilmiştir. Astrositlerin

neden olduğu en sık hastalıkların başında “glioma” olarak adlandırılan beyin tümörleri gelmektedir (Allen ve Barres, 2009; Sofroniew ve Vinters, 2010).

1.2. Beyin Tümörleri

Beyin tümörleri tüm kanserlerin %1,5’inden ve kansere bağlı ölümlerin %2’sinden sorumludur. Araştırmalar, yıllar içinde santral sinir sistemi tümörlerinin sıklığında hızlı bir artış olduğunu göstermektedir (Blumenthal ve Schulman, 2005; Lee ve ark., 2010). Böyle bir sonucun ortaya çıkmasında, kansere neden olan faktörlerin artmasının yanısıra (Blumenthal ve Schulman, 2005) beyin tümörlerinin tanısını kolaylaştıracak gelişmelerin (bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans gibi) yaygınlaşmasının rol oynayabileceği belirtilmiştir (Loiseau ve ark., 2009; Lee ve ark., 2010). Beyin tümörlerinin oluşumuna neden olan etken veya etkenler tam olarak belirlenememiştir. Ancak diğer kanserlerde olduğu gibi bazı çevresel faktörler var olsa da beyin tümörleri için radyasyon en önemli faktör olarak gösterilmiştir (Prasad ve Haas-Kogan, 2009; Loiseau ve ark., 2009). Ayrıca, son yıllarda cep telefonu kullanımının beyin tümörlerinin artışına katkı sağladığı sonucuna varılmıştır (Khurana ve ark., 2009).

İntrakranial tümör çeşidi oldukça fazladır ve herkes tarafından kabul görmüş bir sınıflandırma gerçekleştirmek zordur. Günümüzde sınıflandırma genel olarak patolojiye göre yapılmaktadır (**Çizelge 1.1**) (Louis ve ark., 2007; Tatter, 2010). Santral sinir sistemi tümörleri yirmili yaşlardan 70 yaşına kadar giderek artan bir sıklık gösterir ve sonrasında azalır. Hemen hemen tüm yaş gruplarında erkeklerde kadınlara göre biraz daha fazla görüldüğü saptanmıştır (Sarkar ve ark., 2009).

Çizelge 1.1. MSS tümörlerinin genel sınıflandırılması (Louis ve ark., 2007; Tatter, 2010)

MSS Tümörleri	
Astrositik Tümörler	1- Astrositom (Derece I) 2- Anaplastik Astrositom (Derece II) 3- Glioblastoma Multiforme (Derece III) 4- Piloitik Astrositom (Derece I)
Oligodendroglial Tümörler	1- Oligodendroglioma (Derece II) 2- Anaplastik Dendrogloma (Derece III)
Ependimal Tümörler	1- Ependimoma (Derece II) 2- Anaplastik Ependimoma (Derece III) 3- Miksopapillar Ependimoma (Derece III) 4- Subependimoma (Derece I)
Karışık Gliomlar	1- Karışık oligoastroitom (Derece II) 2- Anaplastik oligoastroitom (Derece III) 3- Diğerleri (Ependimo-astroitom, vb.)
Nöroepitelyal belirsiz kökenli tümörler	1- Polar spongioblastoma (Derece IV) 2- Astroblastoma (Derece IV) 3- Gliomatosis serebri (Derece IV)
Koroid Pleksus Tümörler	1- Koroid pleksus papilloma 2- Koroid pleksus karsinoma
Nöronal ve karışık nöronal tümörler	1- Gangliositoma 2- Serebellum displastik gangliostomasi 3- Ganglioglioma 4- Anaplastik ganglioglioma 5- Desmoplastik infantile ganglioglioma 6- Merkezi nörositoma 7- Disembriyoplastik nöroepitelyal tumor 8- Olfaktor nöroblastoma
Pineal Parankim tümörler	1- Pineositoma 2- Pineoblastoma 3- Karışık pineositoma/pineoblastoma
Embriyonal tümörler	1- Medullaepitelyoma 2- Multipotent başkalaşmış primitive nöroektodermal tümörler 3- Nöroblastoma 4- Retinoblastoma 5- Ependimoblastoma
Diğer MSS tümörleri	1- Sellar bölge tümörleri 2- Hematopöietik tümörler 3- Germ hücre tümörleri, vb.

İntrakranial tümörler tüm primer MSS tümörlerinin %85-90'ini oluşturur (Levin ve ark., 2001). Tümörler primer veya sekonder beyin tümörü olarak sınıflandırılır. Primer intrakranial tümörler kafa içerisinde bulunan glial dokudan, nöronlardan, meninkslerden, damarlardan veya endokrin hücrelerden kaynaklanabilir. Yetişkinlerde saptanan en yaygın primer beyin tümörü gliom'lardır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün morfolojik özelliklerine göre yaptığı son sınıflandırmasında gliomlar destekleyici glial dokudan köken alan nöroepitelyal tümörler olup astrositik,

oligodendroglial, oligoastroitik ve ependimomlar olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır (Çizelge 1.2) (Sarkar ve ark., 2009).

Çizelge 1.2. Glioma sınıflandırılması (Sarkar ve ark., 2009)

Glioma Tipi	Derece	İsim	Beyin tümörleri içindeki sıklığı	Yaş	Cinsiyet (E:K)
Astrositik Tümörler	I	Pilositik astrositom	% 5-6	≤20	1:1
		Subependimal dev hücreli astrositom	<% 1	2-20	Eşit
	II	Diffüz infiltrate Astrositom	%10-15	30-40	1,18:1
	III	Anaplastik Astrositom	%10-15	45-50	1,1:1
IV	Glioblastoma Multiforme	%12-15	45-75	1,26:1	
Oligodendroglial Tümörler	II	Oligodendroglioma	%2.5	40-45	1,1:1
	III	Anaplastik Oligodendroglioma	%1.2	45-50	1,1:1
Oligoastroitik Tümörler	II	Oligoastroitoma	%1.8	35-45	1,3:1
	III	Anaplastik Oligoastroitoma	%1	40-45	1,15:1
Ependimal Tümörler	I	Subependimoma	%0.7	50-60	2,3:1
		Miksopapiller Ependimoma	%0.3	20-35	2,2:1
	II	Ependimoma	%4.7	<16, 30-40	1:1
	III	Anaplastik Ependimoma	%1	<16	1:1

Astrositomlar tüm glial tümörlerin %80-85'ini oluştururlar (Weil, 2006). Bu sisteme göre astrositomlar histopatolojik görünümüne göre 4 dereceye ayrılmaktadır (Kleihues ve ark., 1993). Derece artışıyla damarlanma, mitoz özellikleri ile karakterize büyüme potansiyelinde artış ve prognoz bakımından giderek kötüleşme söz konusudur. Derece 1 astrositomlar, iyi farklılaşmış gliomlardır ve bu terim pilositik astrositomlar, subependimal dev hücreli astrositomlar, pleomorfik ksantoastroitomlar için kullanılır. Derece 2 astrositomlar, diffüz astrositomlar olarak ta adlandırılırlar. Anaplastik astrositomlar (AA) derece 3 düzeyindeki astrositik tümörler olup malin astrositom veya yüksek dereceli astrositom olarak ta bilinirler. Glioblastoma Multiforme (GBM) derece 4 astrositom olup, en malin astrositik tümördür (Kleihues ve ark., 2007). Bu tümörlerin görülme yaşı ve sıklığı birbirlerinden farklıdır. Son 15-20 yılda primer beyin tümörlerinin görülme oranının arttığı belirtilmiştir (Blumenthal ve Schulman, 2005). Tüm primer beyin tümörlerinin yaklaşık olarak %38'ini anaplastik astrositomlar ve GBM oluşturur (Levin ve ark.,

2001). MSS tümörleri içinde, 15 yaşına kadar görülen primer tümörlerin yaklaşık %40-45'ni, erişkin yaş grubunda ise %50-60'nı astrositer kökenli tümörler oluşturmaktadır (Giles ve Gonzales, 2001). Bu tez çalışmasında GBM tanısı almış hastalara ait örnekler ve GBM hücre dizileri kullanılmıştır.

1.2.1. Glioblastoma Multiforme

GBM erişkinlerde görülen en sık (ortalama her yüzbinde 5 olgu) ve en malin beyin tümörü olup (Rosell ve ark., 2008), tüm intrakranial tümörlerin %12-15'ini ve tüm astrositik tümörlerin %50-60'ını oluşturur (Levin ve ark., 2001; Kleihues ve ark., 2007; Sathornsumetee S ve Rich, 2008). GBM, nekroz ve vasküler proliferasyon özelliklerine göre derece IV astrositom olarak tanımlanmıştır. Her yaşta görülebilir, ancak olgular en sık 45-75 yaş arasındadır. Çocukluk yaşlarında görülmeleri nadirdir. Erkek/kadın oranı 1,5/1 civarındadır (Iacob ve Dinca., 2009).

GBM gelişimine neden olan risk faktörü veya faktörleri radyasyon haricinde tam olarak belli değildir. Ancak genel olarak GBM etkenleri arasında sigara, elektromanyetik dalgalar, alerji, viral enfeksiyon (Krex ve ark., 2007) ve genetik yatkınlık gösterilmektedir (Blumenthal ve Schulman, 2005). Ayrıca, ailesel bir takım hastalıkların (nörofibromatozis, tüberoz skleroz, Turkot sendromu, Li-Fraumeni sendromu) GBM'le birliktelik gösterdiği belirtilmiştir (Blumenthal ve Schulman, 2005; Adamson ve ark., 2009).

GBM primer (de novo) ve sekonder olarak iki gruba ayrılır. GBM'lerin %90'ı primer GBM, %10'u ise sekonder GBM olarak tanımlanır. Primer GBM'ler glial öncü hücrelerden direkt gelişen ve ilk histopatolojik incelemede glioblastoma tanısı konulan tümörlerdir. Hızlı geliştikleri için ilk 3 ay içinde klinik belirti verirler. Primer GBM'lerin öncesinde düşük dereceli (derece II ve III) gliom öyküsü yoktur ancak sekonder GBM'ler düşük dereceli gliomlardan sekonder olarak gelişir. Bu nedenle primer GBM'ler (60 yaş) sekondere göre (30-40 yaş) yaşlı insanlarda daha fazla görülmektedir (Durmaz ve Vural, 2007). Düşük dereceli astrositomların

glioblastoma dönüşmesi için geçmesi gereken süre ortalama 4–5 yıldır (Krakstad ve Chekenya, 2010). Primer ve sekonder GBM, morfolojik olarak ayrıt edilemez, her ikisi de hasta yaşı dikkate alınmadığında kötü prognoza sahiptir (Sarkar ve ark., 2009).

GBM, başlıca serebral hemisferlerde yerleşim gösteren infiltran tümörlerdir (Kleihues ve ark., 2007; DeAngelis, 2001). En sık tuttuğu lokalizasyon frontal, en az tuttuğu lokalizasyon ise oksipital lob'dur. Glioblastomalar makroskopik incelemede çevre normal dokudan iyi sınırlarla ayrılmasına rağmen mikroskopik olarak incelendiğinde kitleden uzakta normal doku içine infiltrasyon göstermektedir (Louis ve ark., 2007). Yüksek derecede invaziv tümör olduklarından tümörün çevresindeki normal beyin dokusunda ödeme ve ekspansiyona neden olurlar (Rosell ve ark., 2008).

Glioblastoma multiforme'nin neden olduğu semptom ve belirtilerin çoğu hızlı büyümekte olan tümöre, çevresinde yaptığı ödeme, obstrüksiyona ve artmış kafa içi basıncına bağlıdır. En yaygın belirtileri baş ağrısı, bulantı kusma, epileptik nöbetler, nöromotor fonksiyon kaybı ve mental değişikliklerdir. Tutulan tümör lokalizasyonuna bağlı fokal bulgular da oluşabilir (Krakstad ve Chekenya, 2010). GBM, tedavisi güç kanserlerden biridir, yüksek morbidite ve mortalite özelliklerine sahiptir. GBM'in küratif tedavisi yoktur (Rosell ve ark., 2008). Hastaların yaşam süresi, en gelişmiş tedavi uygulamalarına rağmen ortalama 14.6 aydır (Krakstad ve Chekenya, 2010). Hastaların %10'luk bir kısmının 2 yıllık yaşam süresine ulaşabildiği bilinmektedir. Bugün uygulanan standart tedavi biçimleri cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir (Adamson ve ark., 2009; Omay ve Vogelbaum, 2009). Bu tedavi biçimleri tek başlarına yeterli değildir. Bu nedenle üç tedavi yaklaşımının da uygulanması tercih edilmektedir. GBM güncel tedavi modeli, mümkün olan en geniş cerrahi rezeksiyon sonrasında adjuvant radyoterapi ve uygun olan hastalarda kemoterapi uygulamasıdır (Rosell ve ark., 2008).

1.2.1.1. GBM'in Genetik Özellikleri

Tüm kanserlerde olduğu gibi GBM dokusuna ait tümör hücrelerinde de yaşam sinyallerinin aktivasyonunda artış, anjiyogenez, kontrolsüz çoğalma, doku invazyonu yapabilme ve apoptoza direnç gelişimi görülmektedir. GBM'in genetik yapısı heterojendir. Aynı tümör dokusunda ve farklı hastalara ait tümör örneklerinde genetik yapının değiştiği ve bu yüzden hastalığın "multiform" olarak isimlendirildiği bildirilmektedir (Adamson ve ark., 2009; Krakstad ve Chekenya, 2010). Primer ve sekonder GBM dokuları arasında klinik ve sitogenetik farklılık vardır (Sathornsumetee ve Rich, 2008).

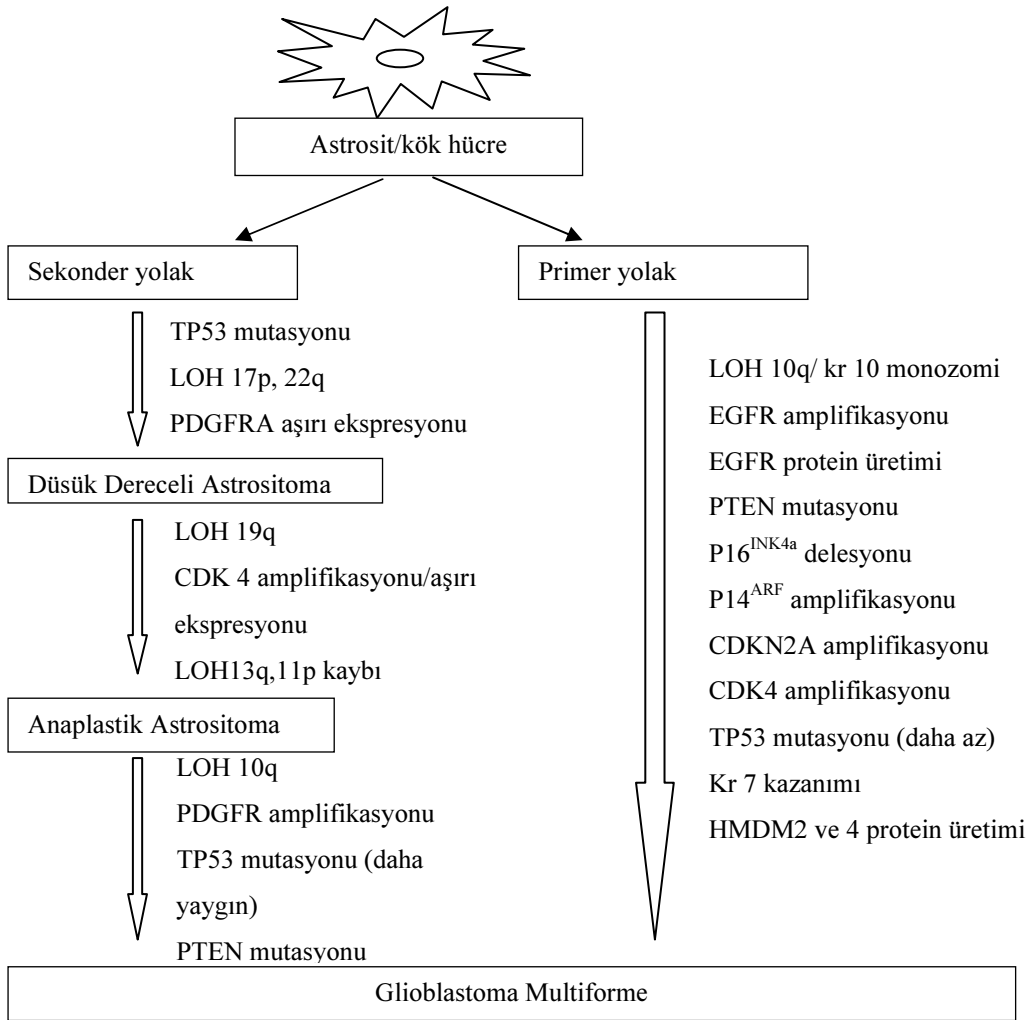
Sekonder GBM'de platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü A (PDGFRA), PDGFRA ligandı ve tümör baskılayıcı protein 53 (TP53,) genlerinde çeşitli genetik değişiklikler saptanmıştır. Ayrıca, p16^{INK4A}, retinoblastom yatkınlık lokusu protein 1 (pRB1,) genlerinde mutasyonlar, siklin bağımlı kinaz 4/6 (CDK) ve insan double minute 2 (HDM2) genlerinin amplifikasyonu, kromozom 10 delesyonlar sekonder GBM'de saptanmış genetik değişikliklerdir (Sathornsumetee ve Rich, 2008; Sarkar ve ark., 2009). Son yıllarda, oksidatif strese karşı korunmada yer alan izositrat dehidrogenaz 1 (IDH1) geninde de mutasyonların var olduğu belirtilmektedir (Krakstad ve Chekenya, 2010).

Primer GBM'de ise epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2 (CDKN2A) genlerindeki mutasyonlar ve kromozom 10q23'te heterozigosite kaybı en sık saptanan genetik değişikliklerdir. Kromozom 10q23'te meydana gelen heterozigosite kaybı (LOH) olguların %60-80'inde meydana gelmektedir ve bu bölgede bir tümör baskılayıcı gen olan fosfat ve tensin homolog (PTEN) geni bulunmaktadır (Krakstad ve Chekenya, 2010).

Primer GBM için EGFR amplifikasyonu, sekonder GBM içinse TP53 mutasyonu karakteristik genetik değişikliklerdir (Sathornsumetee ve Rich, 2008). Parsons ve ark. (2008), GBM olgularında yaptıkları genom analizinde en sık değişen genleri TP53 (%40), EGFR (%37) ve PTEN (%30) olarak bildirmiştir (Parsons ve ark.,

2008). Ancak bu genetik değişikliklerin GBM'in tedavisi için hiçbir prognostik değerinin olmadığı da bilinmektedir. Kromozom 10 kaybı, tümör baskılayıcı PTEN gen delesyonu, primer ve sekonder GBM'de saptanan ortak genetik değişikliklerdir. Ancak bu sınıflandırmanın kesin sınırları yoktur. Bu nedenle, her iki tip GBM'de de TP53 mutasyonu ve CDK4 amplifikasyonu gibi genetik değişikliklere rastlanabilir (Sathornsumetee ve Rich, 2008; Sarkar C ve ark., 2009). Düşük dereceli beyin tümörlerinden GBM'e kadar olan genetik değişiklikler Şekil 1.3'de özetlenmiştir.

GBM hücrelerinde saptanan ve canlılığı tetikleyen en önemli yolak fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K) yolağıdır. Çeşitli tirozin kinaz reseptörlerinin (EGFR, PDGFR gibi) büyüme faktörleriyle aktivasyonu sonucu PI3K/Protein Kinaze B (PKB, AKT) yolağı aktifleşir ve nükleer faktör κ B (NF κ B) aracılığıyla yaşamı ve proliferasyonu düzenleyen genlerin aktivasyonu sağlanır. PTEN bu yolağı bloke edebilir ancak GBM'de saptanan PTEN mutasyonunun bu yolağı inaktive etmediği belirtilmektedir. Tirozin kinazların aktivasyonu sonucu tetiklenen diğer bir yol ise Ras onkogeni aracılığıyla mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) yolağıdır. Bu yolağın aktivasyonu da, glia hücresinde yaşam ve büyümeyi kontrol eden genlerin ekspresyonunu sağlayan transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu tetikler. GBM'de bu sinyallerin aktivasyonuna neden olan tirozin kinaz reseptörlerinde mutasyon meydana gelmesi sinyal yolaklarının kontrolsüz aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu yolağın başında yer alan kinazları inhibe etmek için inhibitörlerin ve monoklonal antikorların kullanılması GBM'de alternatif bir tedavi yöntemidir. Bu yüzden, EGFR inhibitörleri (erlotinib, gefitinib) ve Akt inhibitörleri (perifosine) ile ilgili çalışmalarla, yaşam sinyallerinin diğer üyeleri için inhibitör kullanımını geliştirme çalışmaları devam etmektedir (Kraakstad ve Chekenya, 2010).



Şekil 1.3. Primer ve seonder GBM gelişmesinde meydana gelen genetik değişiklikler (Sathornsumetee ve Rich, 2008; Sarkar ve ark., 2009)

Sitogenetik yapı bakımından GBM oldukça karışıktır. Sayısal ve yapısal kromozomal anomaliler sık görülmektedir. Translokasyonlardan t(15;19) ve t(10;19), kayıplardan 9p, 10p, 10q, 13q, 17p ve 19q bölgelerindeki kayıplar sık saptanan kromozomal anomalilerdir. GBM’de genel olarak kromozomal kayıpların, kromozomal kazanımlardan daha fazla olduğu belirtilmektedir (Durmaz ve Vural, 2007).

GBM’de meydana gelen moleküler genetik değişikliklerle klinik uygulamalar arasında ilişki kurarak alternatif tedavi yolları geliştirme çalışmaları büyük bir hızla devam etmektedir (Khasraw ve Lasmann, 2010). Bu bağlamda bir çok aday genetik

değişiklikler saptanmıştır. Kaspaz 8 ve Wnt sinyal yolağı antagonistlerinden Dickkopf-1 (DKK-1) genlerinin metilasyonu, akciğer kanseri β -katenin geni (BLU), EGFR ve PTEN genlerindeki mutasyonlar, insülin büyüme faktörü bağlanma proteini (IGFRBP), nörofilin-1 ve endoplazmik retikulum stres sinyalinde yer alan glikoz düzenleyici protein 78 (GRP78) genlerinin aşırı ekspresyonları bunlardan bazılarıdır (Rosell ve ark., 2008). GBM'de meydana gelen ve tedaviyle ilişkilendirilen en önemli genetik değişiklik O⁶-Metilguanin- DNA-Metiltransferaz (MGMT) isimli tamir enziminin metilasyonudur. Tüm GBM'lerin ortalama %45'inde ve primer GBM'lerin ise %36'sında MGMT metilasyonu saptanmıştır (Nakamura ve ark., 2001). GBM tedavisinde MGMT metilasyonunun tedavinin başarı seyrini doğrudan etkilediği pek çok çalışmada bildirilmiştir. Bu yüzden MGMT metilasyonu GBM tedavisinde belirteç olarak gösterilmektedir (Hegi ve ark., 2005; Rosell ve ark., 2008).

1.2.1.2. GBM Tedavisi

1.2.1.2.1. GBM Tedavisinde Cerrahi

GBM cerrahisinin amacı, nörolojik harabiyete neden olmadan tümörün çıkartılmasıdır (Levin ve ark., 2001). Cerrahi, tümörün boyutu ve lokalizasyonuna göre kısmi veya total rezeksiyon şeklinde yapılmaktadır (Sathornsumetee ve Rich, 2008). Cerrahinin genişliği sağ kalımı arttıran ve adjuvan tedavi sonuçlarını etkileyen önemli bir prognostik faktördür (Omay ve Vogelbaum, 2009). Ancak, GBM'in infiltratif yapısı nedeniyle tümörün tamamının çıkartılması hemen hemen imkansızdır (Kim ve Glantz, 2006). Geniş ve başarılı bir cerrahi sonrasında bile alınamayan mikroskobik bir tümör kalıntısı GBM'in nüksüne neden olmaktadır. Total cerrahi sonrası arta kalan tümör hücrelerinin çoğalmasını önlemek veya kısmi cerrahi sonrası geride kalan makroskobik tümör parçasının etkinliğini ortadan kaldırmak için radyoterapi ve kemoterapi uygulanmaktadır. Ancak, bu 3 farklı tedavi yönteminin uygulanmasına rağmen tümör hastalarda tekrar gelişmekte ve bu hastalara ikinci bir cerrahi müdahale yapılmaktadır (Sathornsumetee ve Rich, 2008).

1.2.1.2.2. GBM Tedavisinde Radyoterapi

GBM hastalarında radyoterapi uygulamasının nörolojik yaşam kalitesine ve sağkalıma katkı sağladığı gösterilmiştir (Omay ve Vogelbaum, 2009). Ancak uygulama biçiminde birtakım farklılıklar bulunmaktadır. Radyoterapi ya tüm beyin ışınlanması ya da kısmi beyin ışınlanması şeklinde yapılmaktadır. Her iki uygulama biçiminden hangisinin üstün olduğu konusu tartışmalıdır. Radyoterapide rastlanılan en sık problem radyoterapi dozunun belirlenmesidir. Güncel radyoterapi, toplam 60 Gray (Gy)'lik dozun tümör yatağına 6 haftada düzenli periyodlarla verilmesi şeklindedir (Smith ve ark., 2008). Ancak, uygulamada ciddi farklılıklar vardır. Ortalama 7 Gy x 4 veya 2.5 Gy x 20 parçalar halinde düzenlenen radyasyonunun, lokal veya tüm beyne farklı sürelerde uygulandığı rapor edilmiştir (Clarke ve ark., 2008).

1.2.1.2.3. GBM Tedavisinde Kemoterapi

GBM'in infiltratif yapısı nedeniyle tümörün tamamının cerrahiyle alınabilmesi hemen hemen imkansızdır. Bu nedenle, primer GBM olgularında, cerrahi sonrası sırasıyla veya aynı anda radyoterapi ve kemoterapi uygulaması standart tedavi modelidir (Kim ve Glantz, 2006). Yüksek dereceli beyin tümörlerinde kemoradyoterapinin yalnızca radyoterapi uygulamasına göre sağ kalım oranını %10 arttırdığı saptanmıştır (Sathornsumetee ve Rich, 2008). Kemoterapinin sağ kalım üzerine etkisini gösteren araştırmalara ait sonuçların değerlendirildiği meta analiz çalışmalarında kemoterapinin sağ kalımı arttırdığı kesinlik kazanmıştır (Kim ve Glantz, 2006). Bu nedenle GBM olgularında kemoterapi uygulaması, tedavideki başarı oranının artırılmasında önemli bir basamaktır (Stupp ve ark., 2007). Kemoterapötik maddenin seçimi, dozu, uygulama süresi ve hastanın genetik yapısı kemoterapi sürecini doğrudan etkileyen unsurlardır (Hegi ve ark., 2008).

Beyin tümörlerinin kemoterapötik ajanlarla tedavisinde karşılaşılan sorunların başında kan beyin bariyeri gelmektedir (Stupp ve ark., 2007). Kemoterapötiklerin

diffüzyonu yavaştır ve bu nedenle kan beyin bariyeri bozulmuş olsa bile MSS içerisinde yeterli doku konsantrasyonuna ulaşamazlar. Beyin tümörlerinde kullanılacak kemoterapötiklerin kan beyin bariyerini hızlı ve kolay geçebilmesi gerekmektedir. *In vitro* araştırmalar, kemoterapötiklerin glioma hücrelerinde radyasyonun etkisini arttırdığı yönünde bulgular sunmaktadır. Bu nedenle kemoterapötiklerin radyoterapi ile eş zamanlı uygulanması gerektiği bildirilmektedir (Stupp ve ark., 2005). Ancak bu noktada, kan beyin bariyerini rahat geçebilen, toksisitesi düşük, yan etkisi az kemoterapötiklerin geliştirilmesi gerekmektedir.

GBM tedavisinde alkaloidlerden vinkristin, antimetabolitlerden hidroksiüre, 6-tioguanin, 5-florourasil ve alkilasyon ajanları kullanılmaktadır. (Kim ve Glantz, 2006; Marchesi ve ark., 2007). En sık kullanılan kemoterapötikler alkilasyon ajanlarıdır. Genel kanser tedavilerinde de 30 yıldır kullanılan alkilasyon ajanlarının son yıllarda, GBM tedavisinde özellikle tercih edildikleri görülmektedir (Blumenthal ve Schulman, 2005; Adamson ve ark., 2009). Alkilasyon ajanları, Azotlu Hardallar (Siklofosfamid, Klorambusil, Melfalan, Meklerotamin), Etileniminler (Tiotepa, Altretamin), Nitrozoüreler (Karmustin, Lomustin, Semustin, Fotemustin), Alkilsulfonatlar (Busulfan), Trizan ve Hidrazin türevleri (Dakarbazin, Prokarbazin, Temozolomid) olmak üzere 5 gruba ayrılır.

Triazin bileşikleri olarak adlandırılanlar GBM’de sıkça kullanılan kemoterapötiklerdir (Kim ve Glantz, 2006). Adjuvant olarak genellikle Prokarbazin ya da Karmustin monoterapisi veya PCV (Prokarbazin, Lomustin ve Vinkristin) kombinasyonu kullanılmaktadır (Kim ve Glantz, 2006; Kaina ve ark., 2010). GBM tedavisinde, Dakarbazin ve Karmustin’in yanısıra son yıllarda hastaların büyük çoğunluğunda Temozolomid (TMZ) kullanılmaktadır (Marchesi ve ark., 2007; Kaina ve ark., 2010).

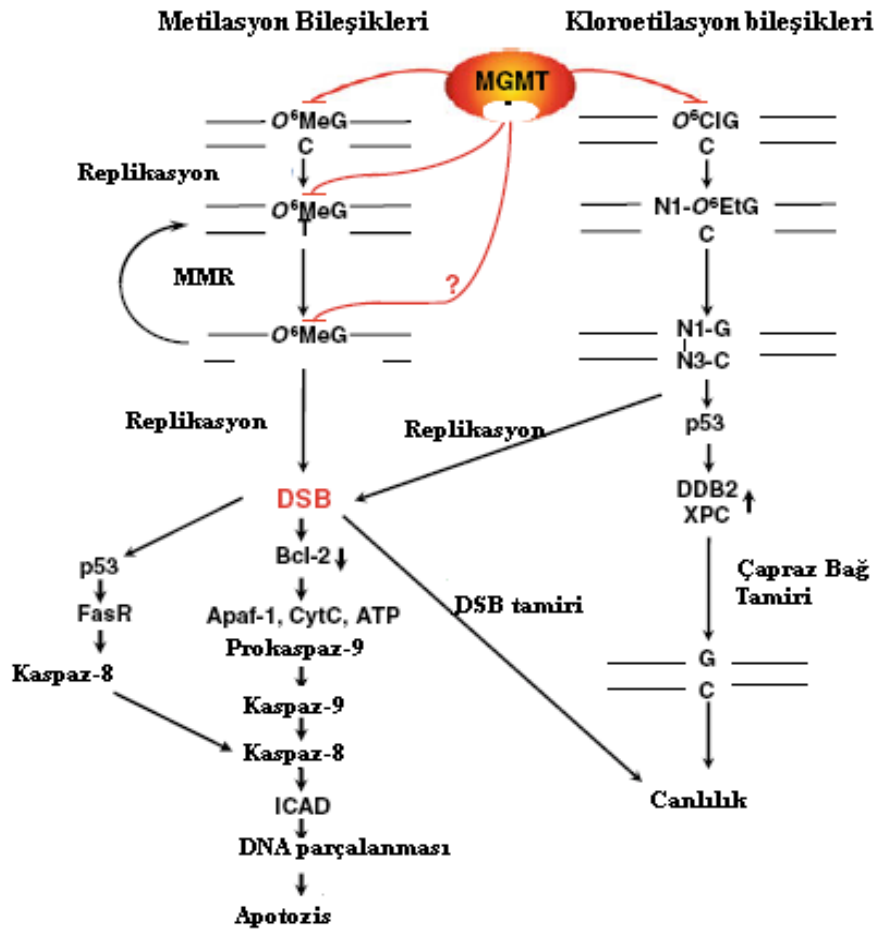
1.3. Alkilasyon Ajanlarının Sitotoksik Etkisi

Alkilleyiciler, hücredeki nükleofilik gruplara kovalent bağ ile bağlanırlar. Bu grup kemoterapötikler deoksiribo nükleik asit (DNA) bazlarına çeşitli alkil grupları [metil (CH₃), etil (C₂H₅), propil (C₃H₇)] ekleyerek sitotoksik etkilerini gösterirler. Bunlar DNA üzerinde gösterdikleri fonksiyon açısından, kloroetilasyon ajanları ve metilasyon ajanları olarak iki gruba ayrılır. Etilasyon ajanları DNA bazları üzerine etil grubu, metilasyon ajanları da metil grubu ekleyerek etkilerini gösterirler. Her iki grubun, ağırlıklı olarak guaninin 6.pozisyonuna etil veya metil eklentileri oluşturarak hücreyi apoptoza yönlendirdikleri saptanmıştır (Kaina ve ark., 2010). Etilasyon ajanları grubunda Karmustin, Lomustin, Nimustin ve Fotemustin yer alırken, Prokarbazin, Dakarbazin, Streptozotosin ve Temozolomid metilasyon ajanları grubunda yer almaktadır (Kaina ve ark., 2007).

Alkilasyon ajanlarının oluşturdukları baz eklentilerinin stabiliteyi birbirlerinden farklıdır. N³-metiladenin (N³MeA), N³-metilguanin (N³MeG) kolaylıkla hidroliz edilirken N⁷-metilguanin (N⁷MeG) daha uzun süre stabil kalabilir (Kaina ve ark., 2007). O⁶-metilguanin (O⁶MeG) diğerlerine göre çok daha stabil bir eklentidir. Alkilasyon ajanları en sık N⁷MeG (%80-85) ve N³MeA (%8-18) eklentileri meydana getirir ancak bunların toksik etkileri kolaylıkla ortadan kaldırılabilir. O⁶MeG, diğerlerine göre daha az oranda (%≤8) meydana gelen eklenti tipi olmasına rağmen mutajenitesi ve toksisitesi en güçlü olanıdır. Diğer bir mutajenik lezyon O⁴-metiltimin (O⁴MeT) ise en az (%<0.4) saptanan DNA eklentisidir (Kaina ve ark., 2007; Marchesi ve ark., 2007). Kloroetilasyon ajanları içinse toksisitenin atfedildiği lezyon O⁶-kloroetilguanin (O⁶-CIG) eklentisidir (Kaina ve ark., 2010).

Alkilasyon ajanlarının hücrelerde oluşturdukları toksik etki çoğunlukla apoptotik hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır (Şekil 1.4) (Kaina ve ark., 2010). Diğer kemoterapötik tedavilerde olduğu gibi alkilasyon ajanlarının kullanımında da karşılaşılan en büyük problem hastaların ilacın terapötik etkisine karşı direnç göstermesidir. Direnç tedavi başlangıcında var olabildiği gibi kemoterapötiklerin kullanım sürecinde de gelişebilir. Alkilasyon bileşiklerinin hedef hücrelerde oluşturdukları biyolojik etkilerin ve bu moleküllere karşı gelişen biyolojik direncin

oluşumunda DNA tamir yollarının önemli rolleri vardır. DNA tamir sistemleri genel olarak, çok hücreli organizmaların genom bütünlüğünün korunmasından sorumludur. Bunlar, çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanlarla indüklenen DNA hasarlarını nötralize etmektedir. Metilasyon ajanlarının kullanımı sonucu hücre DNA'sında oluşan O⁶-MeG eklentisi, O⁶-alkilguanin-DNA-alkiltransferaz (MGMT, O⁶-metilguanin-DNA-metiltransferaz) isimli bir enzim tarafından tamir edilerek metilasyon kaldırılır. MGMT tarafından bu eklenti tamir edilmezse, O⁶-MeG hücrenin ilk replikasyonu sonunda karşısına tamamlayıcı baz olarak timini alır. Oluşan yanlış baz çifti yanlış eşleşme tamir mekanizması (MMR) tarafından tamir edilmeye çalışılır. MMR sisteminin tamir edemediği yanlış eşleşmiş bazlar replikasyon sonunda hücrede çift zincir DNA kırıklarının oluşmasına ve son olarak apoptoz yolağının tetiklenmesine yol açar. Kloroetilasyon ajanlarının hedef hücre DNA'sında oluşturduğu O⁶-ClG eklentisi MGMT tarafından tamir edilmezse yine apoptotik yolak aktive olabilir. MGMT, O⁶-ClG'de yer alan etilenyumu (CH₂-CH₂-Cl) kendi üzerine alarak alkilasyonun etkisini ortadan kaldırabilir. Kararlı bir molekül olmayan O⁶-ClG eklentisi tamir edilmediği zaman molekül içi bir düzenlemeyle N1-O⁶-etanoguanine (N1-O⁶-G) dönüşür. MGMT burada da devreye girerek N1-O⁶-G yapısındaki CH₂-CH₂ yapısını kendi üzerine transfer ederek normal guaninin oluşmasını sağlar. MGMT N1-O⁶-G'i tamir edemez ise, N1-guanin-N3-sitozin çapraz bağı oluşabilir. Bu yapı, bir replikasyon sonunda çift zincir DNA kırıklarının oluşmasına ve apoptozun tetiklenmesine yol açabilir. Ayrıca, bu çapraz bağ, p53 aktivasyonu aracılığı ile aktive olan tamir enzimlerince onarılarak normal yaşam siklusunun devamlılığı sağlanabilir (Kaina ve ark., 2010).



Şekil 1.4. Alkilasyon ajanlarının sitotoksik etkisi (Kaina ve ark., 2010).

Yukarıda bahsedilen her iki yolakta da MGMT tamir enziminin önemli olduğu görülmektedir. Yapılan birçok çalışma MGMT enziminin, alkilasyon ajanlarına karşı gelişen dirençte en önemli faktör olduğunu belirtmektedir (Bredel, 2001; Kaina ve ark., 2007; Mitra, 2007; Watson ve ark., 2009). Bunun yanı sıra yanlış eşleşme ve baz çıkarım yoluyla tamir sistemleri de alkilasyon ajanlarına karşı gelişen dirençte rol almaktadır (Marchesi ve ark., 2007).

1.3.1 Alkilasyon Ajanlarına Karşı Dirençte Rol Alan Tamir Enzimleri

1.3.1.1 MGMT

Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde sentezlen (Leclere ve ark., 1998) MGMT (Atase, AGT, AGAT), 207 amino asitten oluşan (24 kDa), enzim benzeri küçük bir proteindir. MGMT proteinin yarı ömrü 24 saatten fazladır ve nispeten stabil bir proteindir (Kaina ve ark., 2010). MGMT proteini ribozomlarda sentezlendikten sonra sitoplazmadan çekirdeğe gelir. MGMT, hücrel genomu alkilleyici ajanların mutajenik etkilerinden koruyan en önemli DNA tamir proteinidir (Kaina ve ark., 2007). Alkilleyiciler tarafından oluşturulan O⁶ DNA eklentileri ve özellikle guaninin O⁶ pozisyonundan alkilasyonu, transiyon mutasyonlarının oluşmasına ve kanserin indüklenmesine neden olur. MGMT molekülü, sitotoksik alkilleyici bileşiklere maruz kalan hücrelerde alkil eklentilerini kendi üzerindeki sistein amino asidine transfer ederek alkilasyonun mutajenik etkisini ortadan kaldırır. Böylece, MGMT, monofonksiyonel alkilleyici ajanların sebep olduğu DNA hasarını tamir ederek bu moleküllere karşı gelişen direnç mekanizmalarından birini oluşturmaktadır (Marchesi ve ark., 2007). Bu tamir mekanizması sağlıklı hücreleri alkilasyon ajanlarının sitotoksik etkilerinden korurken kanser hücrelerinde de alkilasyon ajanlarının tedavi etkilerine karşı direnç gelişmesine neden olur. Bu çelişki MGMT enzimini daha da önemli kılmaktadır. MGMT düzeyi yüksek olan tümör hücrelerinin alkilasyon ajanlarından TMZ'ye dirençli olduğu saptanmıştır (Agarwala ve Kirkwood, 2000). MGMT düzeyi düşük olan hücrelerde ise TMZ duyarlılığının yüksek olduğu belirtilmiştir (Khan ve Middleton, 2007). Konduri ve ark., (2009) MGMT'nin sadece bir tamir enzimi olmadığı hücrenin yaşam yollarında da önemli rollerinin olabileceğini bildirmektedir.

1.3.1.1.1. MGMT Ekspresyonu ve Düzenlenmesi

Dokulara göre farklılık gösterse de MGMT yapısal olarak tüm hücrelerde eksprese edilmektedir. Ancak, tümör dokularında ekspresyonu yüksektir. MGMT aktivitesinin

kolon, pankreas ve akciğer tümör dokularında yüksek, beyin tümör dokularında düşük olduğu saptanmıştır. Ancak tekrar eden GBM'de ise MGMT aktivitesinin arttığı bildirilmektedir (Kaina ve ark., 2010). Beyin tümörlerinde tedavi etkinliğinin tahmin edilmesinde MGMT ekspresyonunun etkin bir belirteç olduğu ısrarla vurgulanmaktadır (Hegi ve ark., 2008; Preusser, 2009; Wick ve ark., 2009). MGMT ekspresyonunun kişiler arasında ortalama 7,6 kat değişkenlik gösterdiği ve aynı kişiden farklı zamanlarda alınan örneklerde bile 1,4-3,5 kat farklı MGMT ekspresyonu saptandığı belirtilmektedir (Kaina ve ark., 2010).

MGMT geni 10q26'da lokalizedir, ortalama 145 kilobaz (kb) büyüklüğünde, 5 ekzon ve 1 intron içermektedir. Bununla birlikte, MGMT geninde bir kaç varyant allel tanımlanmıştır. MGMT promotor bölgesi CpG açısından zengindir, TATA ve CAAT kutularından yoksundur, 10 tane Sp1 transkripsiyon faktör bağlanma bölgesi ve 2 adet glikokortikoid yanıt elementine (GREs) sahiptir. GRE varlığı, glikokortikoidler tarafından kontrol edilebilen olası bir MGMT transkripsiyon kontrolüne işaret etmektedir. (Biswas ve ark., 1999; Horiguchi ve ark., 2010).

MGMT gen transkripsiyonu çeşitli düzenleyici mekanizmalarla kontrol edilir. MGMT geni promotor metilasyonunun en önemli gen susturma mekanizması olduğu bilinmektedir (Verbeek ve ark., 2008). MGMT ekspresyonundaki azalmanın MGMT pomotorundaki hipermetile CpG adacıklarıyla ilişkili olduğu saptanmıştır (Esteller ve ark., 1999; Danam ve ark., 1999; Karayan-Tapon ve ark., 2010).

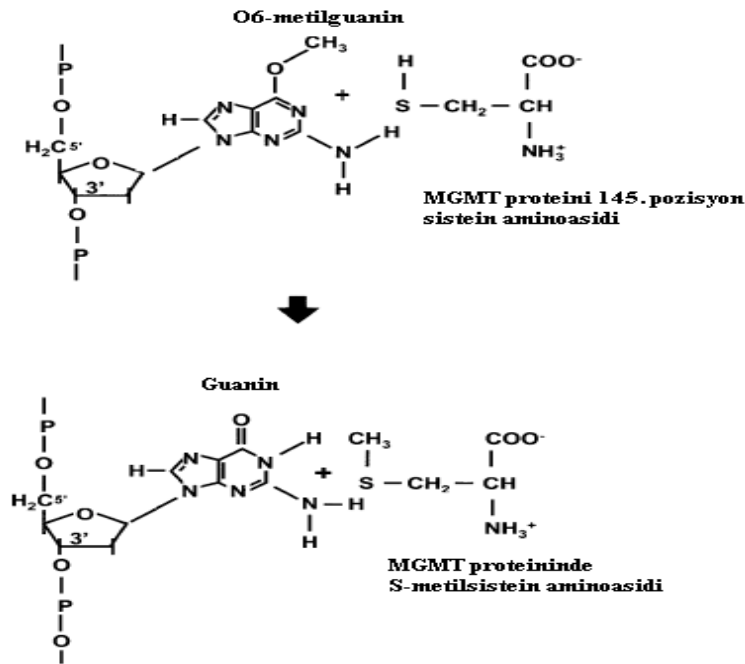
MGMT ekspresyonunun düzenlenmesinde rol aldığı belirtilen bir diğer mekanizmanın, DNA hasarı sonucunda aktiveşen TP53 yolağı olduğu bildirilmektedir (Srivenugopal ve ark., 2001). Ancak, TP53 ve MGMT ekspresyonu ilişkisini araştıran çalışmaların sonuçları arasında farklılıklar vardır (Grombacher ve ark., 1998; Rolhion ve ark., 1999; Osanai ve ark., 2005; Bocangel ve ark., 2009; Blough ve ark., 2010).

1.3.1.1.2. MGMT Tamir Mekanizması

MGMT tüm bazlardaki alkil eklentilerini kaldırmasına rağmen en aktif guanin bazındaki alkil eklentilerini kaldırmaktadır. Mutajenik ve sitotoksik etki açısından guanin eklentileri diğerlerine göre daha etkilidir. MGMT'nin bu fonksiyonu aslında bir oto-inaktivasyon reaksiyonudur. Ayrıca serbest bazlar da MGMT için birer substrattır ve bunlarda MGMT'yi inaktive edebilmektedir (Kaina ve ark., 2010). MGMT'nin DNA'da tamir edilecek bölgeyi nasıl tespit ettiği tam olarak bilinmemektedir. Genel olarak, alkil eklentisinin DNA'da yapısal bir değişikliğe yol açtığı ve bunun da tanınmaya yardımcı olduğu belirtilmektedir (Tubbs ve ark., 2009). Ayrıca, bu konuya ilişkin sunulan bazı öneriler vardır. Bunlardan ilki, MGMT'nin DNA boyunca hareket ettiği ve yapısal olarak dışa doğru çıkıntı yapmış O⁶-meG'yi saptadığı yönündedir. Diğer bir öneri de MGMT'nin Watson-Crick modeli dışında kalan ve stabil olmayan baz çiftlerini tanıdığıdır. Bu tamir mekanizmasında, MGMT'nin dizi spesifik bağlanma için heliks-turn-heliks yapısıyla DNA'nın majör oluşuyla etkileşime geçtiği belirtilmektedir. Bu etkileşimin ardından MGMT DNA'nın minör oluşuna bağlanmakta ve alkilasyon alanındaki alkil grubu, MGMT proteinin aktif bölgesinin 145. pozisyonunda yer alan sistein aminoasidi üzerine taşınmaktadır (Şekil 1.5) (Marchesi ve ark., 2007; Tubbs ve ark., 2007). MGMT proteinin 145. pozisyonunda ki sistein amino asidinin bulunduğu bölge evrimsel açıdan korunmuş bir bölgedir. MGMT'nin O⁶-meG ile etkileşiminin ardından oluşan alkilenen formu tekrar tamir enzimi olarak fonksiyon göremez. Çünkü, alkilenen MGMT ubikuitinlenir ve ardından ubikuitin/proteozomal sistem aracılığıyla parçalanır. MGMT proteini, kendisinin parçalanmasıyla sonuçlanan fonksiyonu nedeniyle "intihar eden" enzim olarak tanımlanır (Tubbs ve ark., 2007).

Ubikuitinasyonun nedeni bilinmemektedir. Ancak alkilenmiş MGMT'nin diğer O⁶-meG eklentileriyle etkileşime geçmesini önlemek için ubikuitinasyona uğradığı belirtilmektedir. Ayrıca alkilenmiş inaktive MGMT'nin diğer genlerin transkripsiyonel inaktivasyonuna neden olabileceği de bildirilmiştir (Tubbs ve ark., 2007). Hücre içerisinde, MGMT aracılı tamirin devamı için yeni MGMT proteinleri sentezlenir. MGMT'nin aktivitesi substrattaki yapısal değişikliklere ve MGMT

miktarına bağlıdır. Hücre ne kadar çok MGMT sentezlerse tamir oranı o düzeyde fazla olur. MGMT tamir hızı alkil grubunun çeşidine göre değişmektedir. Moleküler büyüklüğü nedeniyle metil (CH₃) eklentilerini etil (C₂H₅) ve propil (C₃H₇) eklentilerine göre daha hızlı tamir eder (Kaina ve ark, 2007). Bu tamir mekanizmasında, MGMT'nin 145. pozisyonunda yer alan sistein amino asidi dışındaki amino asitlerin de tamirin başarısı için gerekli olduğu bildirilmektedir. MGMT proteinindeki arjinin amino asidinin (128. pozisyon) konformasyonel değişiklik için belirleyici olduğu belirtilmektedir. Arjininde meydana gelen mutasyonun MGMT'nin O⁶-meG tamir kapasitesini büyük ölçüde azalttığı saptanmıştır (Kanugula ve ark., 1995). Bunların dışında, proteinin 114. pozisyondaki tirozin ve 165. pozisyondaki lizinin önemli yapısal bir role sahip oldukları ve 172. pozisyondaki glutamin ve 137. pozisyondaki asparajinin alkil grubunun yerini değiştirmek için nükleofil gibi rol oynadığı belirtilmektedir (Tubbs ve ark., 2007).



Şekil 1.5. MGMT inaktivasyon mekanizması (Marchesi ve ark., 2007)

MGMT yukarıda da belirtilen bir takım özellikleri nedeniyle diğer tamir enzimlerinden farklıdır. Bu özellikleri a) MGMT'nin sitokiyometrik bir tamir sürecini kontrol etmesi, b) alkil lezyonunlarını hem tanıması hem de kendi üzerine

transfer etmesi, c) tamir sonrası inaktive olması şeklinde özetleyebiliriz (Tubbs ve ark., 2007).

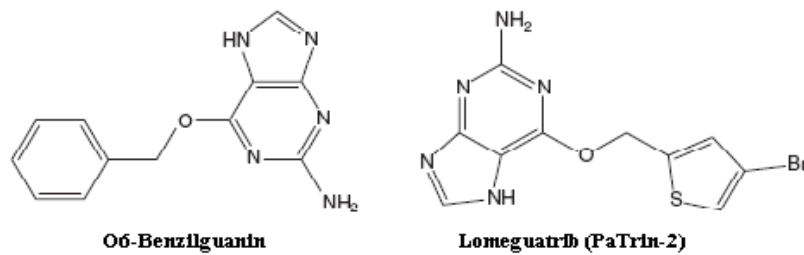
Yapılan *in vivo* ve *in vitro* birçok çalışmayla, MGMT aktivasyonuna sahip hücrelerin O⁶ alkilasyon ajanlarının sitotoksik etkilerine karşı dirençli olduğu gösterilmiştir. Ayrıca metilasyon sonucunda MGMT geni metile olan hücre veya bu tür hücrelere sahip hastaların alkilasyon ajanlarına karşı daha duyarlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Kaina ve ark., 2010). MGMT metilasyonunun, tümörigenez sürecinin başlangıcında ve sıklıkla kolon, baş ve boyun, beyin ve akciğer kanserlerinde meydana geldiği rapor edilmiştir (Esteller ve ark., 1999). Araştırmalar, MGMT ekspresyonunun alkilasyon ajanlarına karşı gelişen dirençte en önemli faktör olduğunu göstermektedir (Kaina ve ark., 2010). O⁶ alkilasyon ajanlarının terapötik etkinliğinin artırılması için MGMT aktivasyonunun veya ekspresyonunun inhibe edilmesi önemli bir anti kanser tedavi yaklaşımıdır. Bu tedavi yaklaşımı çerçevesinde, MGMT inaktivasyonu için farklı alkilasyon ajanlarının birlikte kullanılması (Dolan ve Pegg, 1997), Ribonükleik asit (RNA) interferans (RNAi), viral proteinlerin uygulanması ve MGMT inhibitörlerinin geliştirilmesi stratejileri üzerinde çalışılan önemli konulardır. Alkilasyon ajanları kombine kullanıldığında, MGMT aktivitesinin azaldığı ancak toksisitenin arttığı ve bu durumun tümör cevabına herhangi bir katkı sağlamadığı belirtilmektedir (Verbeek ve ark., 2008). Alternatif stratejiler içerisinde en uygulanabilir ve üzerinde en yoğun çalışılan MGMT inhibitörlerinin geliştirilmesidir (Verbeek ve ark., 2008).

1.3.1.2. MGMT İnhibitörleri

Tümör hücrelerinde, alkilasyon ajanlarına karşı gelişen hücresel dirençten yüksek MGMT aktivitesinin sorumlu olabileceğine ilişkin çalışmalar ortaya çıktıkça MGMT aktivitesini azaltabilecek yeni moleküllerin oluşturulmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. O⁶ alkilasyonunun sitotoksik etkisini arttırmak için MGMT'yi inhibe etme fikri 25 yıl önce düşünülmüş ve bu yaklaşım ilk olarak farklı alkilasyon ajanlarının birlikte kullanımıyla denenmiştir. Bu çalışmalarda ilkin metilasyon ajanı

ardından da kloroetilasyon ajanı verilerek DNA'da çapraz bağların artırılması hedeflenmiştir. Bir çalışmada, ilk verilen alkilasyon ajanının (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) DNA'da O⁶MeG oluştuğu ve böylelikle MGMT'yi inaktive ettiği, ikinci alkilasyon ajanı (Karmustin) verildiğinde ise DNA'da daha fazla çapraz bağ oluştuğu belirtilmiştir (Kaina ve ark., 2010). Bu uygulamaya benzer diğer bir çalışmada, tedavi başarısında artış sağlanmadığı belirtilmiştir (Dolan ve Pegg, 1997). Bu uygulamalardaki en önemli problem doza bağlı toksisite artışıdır. Ayrıca bu uygulamalar sonunda bazı hastalarda sekonder lösemi geliştiği ve dolayısıyla bu tip kombine kemoterapötik uygulamaların mutajenik ve karsinojenik olabileceği vurgulanmıştır (Dolan ve Pegg, 1997).

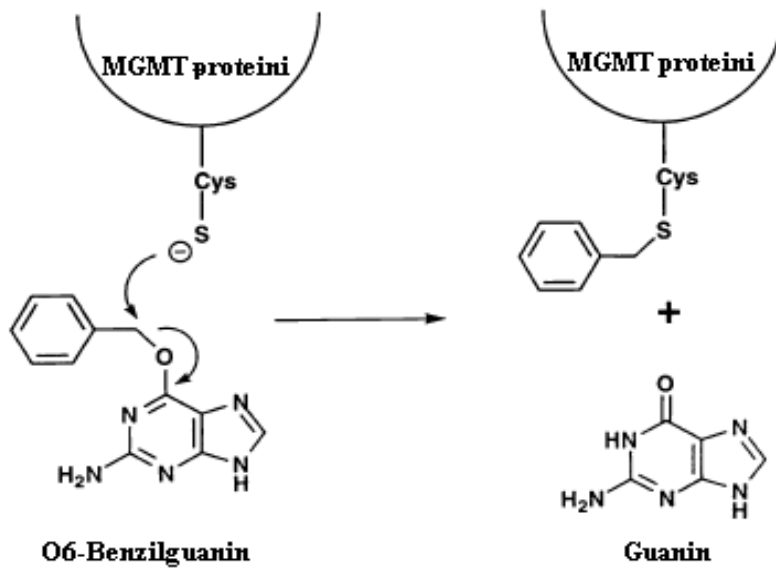
MGMT'yi inhibe etmek için çok fazla O⁶ guanin kökenli bileşikler üretilmiş ve bunlar bir çok çalışmada denenmiştir. Araştırmalarda MGMT inhibitörleri, tümör modellerine veya tümör hücrelerine alkilasyon ajanlarından önce verilmektedir. Alkilasyon ajanlarından önce MGMT inhibisyonu yapılarak alkilasyon ajanlarının sitotoksisitesinin artırılması amaçlanmaktadır. Günümüzde klinik için kullanıma uygun iki adet MGMT inhibitörü vardır. Bunlar, O⁶-Benzilguanin (O⁶-BG) ve O⁶-(4-bromotenil) guanin (O⁶-BTG/Lomeguatrib/PaTrin-2)'dir (Şekil 1.6) (Khan ve Middleton, 2007). O⁶-BG en yaygın kullanıma sahip eski bir bileşik iken Lomeguatrib çok yeni bir bileşiktir (Tubbs ve ark., 2007).



Şekil 1.6. MGMT inhibitörleri (Khan ve Middleton, 2007)

1.3.1.2.1. O⁶-Benzilguanin

MGMT inhibitörlerinden, hem *in vivo* ve hem de *in vitro* olarak en çok denenmiş olanı O⁶-BG'dir (Verbeek ve ark., 2008). O⁶-BG'nin *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda MGMT inaktivasyonunu başarıyla gerçekleştirdiği ve alkilasyon ajanlarının terapötik etkisini arttırdığı saptanmıştır (Rhines ve ark., 2000; Friedman ve ark., 2002; Kokkinakis ve ark., 2003; Schold ve ark., 2004; Wagner ve ark., 2007). O⁶-BG inhibitörü, neredeyse hiç toksik değildir (Marchesi ve ark., 2007) ve kan beyin bariyerini kolaylıkla geçebilir (Verbeek ve ark., 2008). Optimal MGMT inhibisyonu için O⁶-BG'nin damar içi dozu 120 mg/m²'dir (Khan ve Middleton, 2007). Benzil grubunun akseptörü olarak davranan O⁶-BG, MGMT'nin aktif alanına bağlanarak guaninin sitokiyometri miktarında salınımla birlikte S-benzilsistein oluşmasına neden olur (Şekil 1.7) (Dolan ve Pegg, 1997). O⁶-BG yapısında yer alan benzil grubunun elektron yükü nedeniyle alkil gruplarından çok daha kolay MGMT proteininin sistein bölgesine bağlanır.



Şekil 1.7. O⁶-BG'nin aktivasyon mekanizması (Dolan ve Pegg, 1997).

O⁶-BG'nin tümör ksenograflarında 12 saate kadar MGMT inhibisyonu yaptığı ve tek başına verilen alkilasyon ajanlarına göre tümör gelişimini anlamlı derecede inhibe ettiği saptanmıştır (Kaina ve ark., 2010). O⁶-BG ile ilgili yapılan ilk hücre

kültürü çalışmalarında, O⁶-BG hücrelere 2 dakika veya 2 saat kadar uygulanmıştır. O⁶-BG'nin uygulama süresiyle ilgili bir çalışmada 2 ve 16 saat boyunca O⁶-BG uygulanan hücrelere alkilasyon ajanı verildiğinde 16 saatlik uygulamanın sitotoksik etkiyi çok daha fazla arttırdığı saptanmıştır (Dolan ve Pegg, 1997).

1.3.1.2.2. Lomeguatrib

Mcelhinney ve ark. (1998) tarafından geliştirilen MGMT inhibitörü Lomeguatrib'in (O⁶-[4-Bromothienyl]guanine, 4-BTG, PaTrin-2) O⁶-BG'ye göre hematolojik toksisitesi daha düşük (Middleton ve ark., 2000; Marchesi ve ark., 2007; Curtin, 2007) ve MGMT inhibisyon kabiliyeti 10 kat daha fazladır (Khan ve Middleton, 2007). Lomeguatrib oral olarak alınabilen bir moleküldür (Verbeek ve ark., 2008). Optimal MGMT inhibisyonu için Lomeguatrib'in damar içi dozu 10 mg/m²/gün oral doz ise 40 mg/gün'dür (Khan ve Middleton, 2007). Bu iki inhibitörün fonksiyonu birbirine çok benzemektedir. Burada da bromotenil grub MGMT'nin aktif bölgesine geri dönüşsüz transfer olur. İnaktifleşen MGMT ubiquitinasyon yolağının aktivasyonu ile proteolize uğrar. Lomeguatrib ile ilgili ilk çalışma 2000 yılına aittir (Middleton ve ark., 2000) ve son yıllarda bu inhibitörlerle ilgili çalışmaların sayısında hızlı bir artış gözlenmektedir. Bunun temelinde Lomeguatrib'in hematolojik toksisitesinin diğer inhibitörlere göre düşük, inhibisyon gücünün daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır (Barvauks ve ark., 2004).

Tümörlerin alkilleyicilerle tedavilerinde kemoterapötik madde olarak TMZ'nin kullanımının artması ve Lomeguatrib'in MGMT'yi inhibe eden en etkili inhibitör olması, etkin bir kanser tedavisi için bu iki molekülün birlikte kullanılmasını gündeme getirmiştir. Son yıllarda, bu konuda yapılan araştırma ve klinik denemelerin sayısında hızlı bir artış olduğu görülmektedir. (Clemons ve ark. 2005; Ranson ve ark., 2007; Caporaso ve ark., 2007; Khan ve ark., 2008; Watson ve ark., 2009; Kefford ve ark., 2009). Bu tez çalışmasında da kemoterapötik ilaç olarak TMZ ve MGMT inhibitörü olarak Lomeguatrib kullanılmıştır. Lomeguatrib'in, over karsinoma hücre dizilerinde MGMT aktivitesini büyük oranda düşürdüğü ve bu

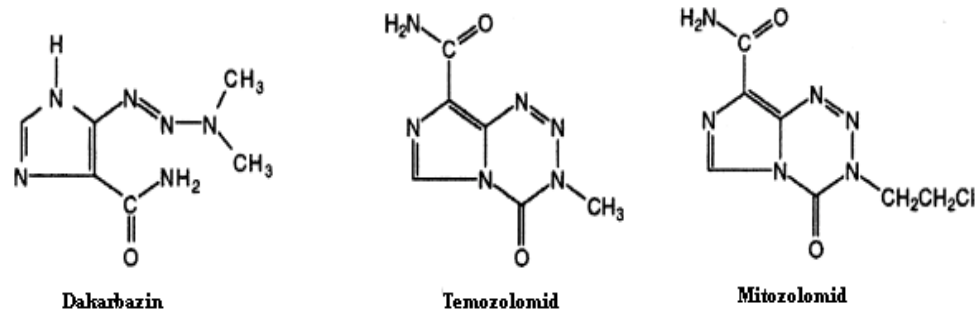
hücrelerin TMZ duyarlılığını ciddi anlamda arttırdığı saptanmıştır. Turriziani ve ark.'ları (2006) tarafından yapılan *in vitro* çalışmada, Lomeguatrib'in, TMZ'in insan lösemi hücrelerindeki sitotoksik etkisini arttırabileceği gösterilmiştir. Lomeguatrib'in alkilasyon ajanlarının özellikle TMZ'in sitotoksik etkisini arttırdığı, tümör gelişimini geciktirdiği (Middleton ve ark., 2002) ve O⁶-BG'den daha etkili olduğu (Middleton ve ark., 2000) yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ranson ve ark. (2006), solid tümörlerin tedavisinde kullanılan alkilasyon ajanlarının terapötik doz değerlerinin Lomeguatrib ile birlikte kullanıldıklarında daha da azaldığını ancak terapötik başarının değişmediğini göstermişlerdir. Lomeguatrib'in bu anti tümör etkisi, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla ovaryum (Barvauks ve ark., 2004), akut lösemi (Caporaso ve ark., 2007), melanom (Ranson ve ark., 2007) ve meme kanserlerinde (Clemons ve ark., 2005) gösterilmiştir.

MGMT inhibitörlerinin, solid tümörlerin klinik tedavisinde O⁶-G alkilleyici moleküllerle birlikte kullanılmasındaki ana problem kemik iliği toksisitesidir. Alkilasyon ajanlarının MGMT inhibitörleriyle birlikte kullanıldığında toksisitenin arttığı saptanmıştır. Etilasyon ajanlarından karmustinin O⁶-BG ile birlikte kullanıldığında standart karmustin dozunun %20'siyle, TMZ ile kullanıldığında ise O⁶-BG'nin standart TMZ dozunun %50'si ile birlikte kullanılması gerektiği belirtilmiştir. Lomeguatrib'le birlikte TMZ kullanıldığında ise standart TMZ dozunun %60-75'inin kullanılabilmesi önerilmektedir (Khan ve Middleton, 2007).

1.4. Temozolomid

TMZ, 1984 yılında Stevens ve arkadaşları tarafından Aston Üniversitesi'nde (İngiltere) sentezlenmiştir. TMZ ticari olarak Schering-Plough tarafından Temodal ismiyle üretilmektedir (Agarwala ve Kirkwood, 2000). TMZ, alkilasyon ajanlarının Triazin bileşikleri veya imidazotetrazinonlar olarak adlandırılan grubunda yer almaktadır. Mitozolomid ve Dakarbazin [DTIC, 5-(3,3-dimethyltriazeno)imidazol-4-carboxamide] bileşikleri de bu grup içerisinde yer alır (Şekil 1.8) (Marchesi ve ark., 2007).

TMZ, 8-carbamoyl-3-methylimidazo[5,1-*d*]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H), imidotetrazin sınıfının monofonksiyonel alkilleyici bir ajanıdır. TMZ, mitozolomid'in 3-metil analogudur. Triazin'ler yapı ve fonksiyon açısından birbirlerine benzer. TMZ, kimyasal olarak metilimidazotetrazinon olarak sınıflandırılır ve temel yapısını 3 nitrojen atomu içeren imidazol halkası oluşturmaktadır. Moleküllerin fiziksel, kimyasal ve anti tümör etkileri komşu 3 nitrojen atomunun fonksiyonuyla ilişkilidir (Şekil 1) (Marchesi ve ark., 2007). TMZ, ağırlıklı olarak metastatik melanom ve beyin tümörlerinin klinik tedavisinde kullanılmaktadır (Agarwala ve Kirkwood, 2000). Son zamanlarda, dirençli akut lösemide ümit verici sonuçlar alındığı rapor edilmiştir (Seiter ve ark., 2002).



Şekil 1.8. Triazin'lerin genel yapısı (Marchesi ve ark., 2007)

1.4.1. TMZ Aktivasyonu

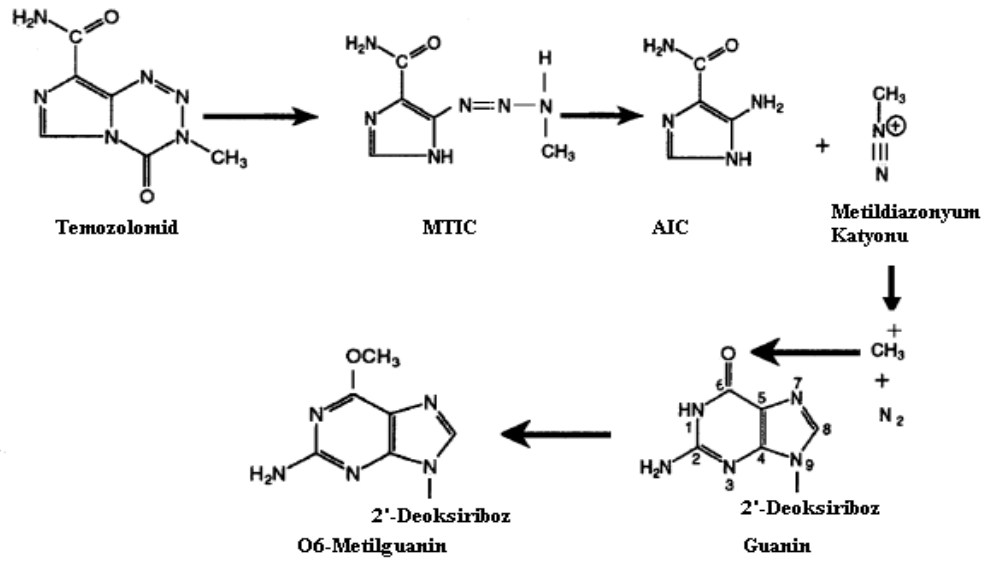
TMZ, fizyolojik pH'taki sıvı solüsyonlarda enzimatik olmayan reaksiyonla kendiliğinden aktif hale gelir. TMZ, bağırsak yüzeyine tutunduktan sonra metil-triazin-imidazol-karboksamid (MTIC)'e hidrolize olur. MTIC'in yarı ömrü kısadır ve hızlıca 5-aminoimidazole-4-karboksamid [AIC, (pürin sentezinde yer alan ara bir madde)] ve metildiazonyum katyonuna indirgenir. Bu dönüşüm süreci geri dönüşümsüz ve pH bağımlıdır. TMZ, sıvı tamponda çözüldüğünde, pH<4'te stabil oluyor fakat pH>7 olduğunda hızlıca MTIC'e hidrolize oluyor. Diğer yandan, alkali pH'ta stabil olan MTIC pH<7 olduğunda hızlıca AIC'ye dönüşür. TMZ'nin sıvı solüsyonda, sitokrom P450'ye ihtiyaç duymadan kendiliğinden aktive olması, bu

bileşimin bölgesel terapi için kullanılabilmesine işaret etmektedir (Marchesi ve ark., 2007).

TMZ'nin lipofilik karakterde ve düşük molekül ağırlığına sahip olması (Agarwala ve Kirkwood, 2000) nedeniyle kan beyin bariyerini kolayca geçebilmesi ve çok iyi tolere edilebilmesi, TMZ'yi diğer alkilasyon ajanlarına karşı avantajlı kılar. Bu avantajlı farmokokinetik özellikler, TMZ'nin primitif veya metastatik beyin tümörlerinin tedavilerinde tercih edilmesinin yolunu açar (Marchesi ve ark., 2007). Ayrıca TMZ, diğer alkilasyon ajanları gibi DNA ile çapraz bağ yapmaz ve gittikçe artan bir hematolojik toksisitesi yoktur. TMZ'nin yan etkisi, myeloid seri üretiminin orta düzeyde baskılanmasıdır (Agarwala ve Kirkwood, 2000). TMZ, bağırsak yüzeyine tutunabildiği için oral olarak da alınabilen bir ilaçtır (Marchesi ve ark., 2007).

1.4.1.1 TMZ Aktivasyon Mekanizması

TMZ aktivasyonu hücre döngüsünden bağımsız bir süreçtir. Hepatik aktivasyon olmaksızın, fizyolojik pH'ta TMZ, MTIC'e dönüşmektedir. MTIC, AIC ve Metildiazonyum katyonunu oluşturur (Şekil 1.9) (Marchesi ve ark., 2007). Bu maddenin DNA üzerindeki etkisi, DNA'da metil eklentilerinin oluşturulması esasına dayanmaktadır. Metil eklentileri özellikle N⁷-guanin ve O⁶-guaninde meydana gelir. Alkilasyonun %65-80'i guaninin N⁷ pozisyonunda meydana gelir. Bununla birlikte, N⁷-meG, TMZ'nin esas sitotoksik etkisini gösterdiği O⁶-meG (%8)'e göre daha az toksiktir. İlacın gerçek sitotoksik mekanizması net değildir. TMZ, DNA iplikleri ile çapraz bağ olmadan DNA, RNA ve protein sentezini inhibe edebilir. TMZ'nin kristal yapısı ile ilgili çalışmalar, DNA-TMZ etkileşimine ilişkin moleküler bir model kurulmasına olanak sağlar. Moleküler model, TMZ halkasının açılma oranının DNA dizisine özgü olabileceğini gösterir. Ayrıca, TMZ'nin *in vitro* malin glioma modellerinde anjiyogenezi inhibe ettiği ve TMZ'nin anti tümör etkisinin kısmen antianjiyogenik etkisinden dolayı olabileceği bildirilmiş ancak bu durum tam olarak açıklanamamıştır (Marchesi ve ark., 2007).



Şekil 1.9. TMZ'nin aktivasyon mekanizması (Marchesi ve ark., 2007)

1.4.2. Farmakokinetik ve Toksik Etki

TMZ, molekül ağırlığı 196 Dalton (Da) olan küçük bir moleküldür, mide pH'sında stabildir (Agarwala ve Kirkwood, 2000). TMZ, oral kullanımın ardından hızlıca ve tamamen gastrointestinal yoldan absorbe olur (%100 biyokullanılabilirlik) ve plazma tepe konsantrasyonuna ulaşması için gereken zaman (t_{max}) 30-90 dakikadır. Absorbsiyon oranı gıdalar tarafından %9 azaltılır. 200 mg/m²'lik konsantrasyondaki TMZ ilacının ortalama 1,8 saatlik yarı ömrü ve %20 civarında plazma proteinine bağlanımıyla doğrusal bir farmokokinetiğe sahiptir. TMZ'nin oral yolla uygulanması öngörülebilir farmakokinetik parametreler sunar: C_{maks} (plazma tepe konsantrasyonu) ve AUC (plazma konsantrasyonunun altındaki alan, zaman eğrisi) dozla beraber doğrusal olarak artar. Beş gün için günlük 200 mg (miligram)/m²'lik TMZ konsantrasyonunda C_{maks} yaklaşık 13-14 mg/L (litre) ve AUC 33,2 mg saat/L (1. gün) ve 34,5 mg saat/L (5. gün)'dir. TMZ'nin oral dozunu (50-1250 mg/m²) alan hastalarda dağılım hacmi (V_d) 28.3 ile 47.2 L aralığındadır. İlaç kan beyin bariyerini geçtikten sonra serebro spinal sıvıda kalır ve burada plazmatik konsantrasyonun %30-40'ına ulaşabilir. Bu nedenle, TMZ, primitif ve metastatik beyin tümörlerinin tedavisinde kullanılır (Marchesi ve ark., 2007).

TMZ'nin en yaygın yan etkisi yukarıda belirtildiği gibi myeloid seri hücrelerinin üretiminin baskılanmasıdır. TMZ dozuna bağlı nötropeni ve trombositopeni gelişir, bulantı ve kusma sınırlıdır (%10-15), baş ağrısı, yorgunluk, karaciğer toksisitesi ve kabızlık görülmektedir (Agarwala ve Kirkwood, 2000; Marchesi ve ark., 2007).

1.4.3. TMZ'nin Sitotoksik Etkisine Direnç

Alkilasyon ajanlarıyla kıyaslandığında TMZ'nin birçok üstün ve avantajlı özelliklere sahip olduğu görülür. TMZ ile ilgili yukarıda da belirtilen düşük molekül ağırlık, fizyolojik pH'da kendiliğinden çözünebilme ve kan beyin bariyerini kolaylıkla geçebilme TMZ'ye üstünlük kazandıran özelliklerden bazılarıdır. Bu nedenlerdir ki son yıllarda GBM tedavisinde en çok tercih edilen kemoterapötik ilaç TMZ'dir. (Blumenthal ve Schulman, 2005). TMZ kullanımında da karşılaşılan en büyük problem hastaların ilacın terapötik etkisine karşı direnç göstermesidir. TMZ direncinden sorumlu DNA tamir sistemleri MGMT, MMR eşleşme ve baz çıkarım yoluyla tamir (BER)'dir (Marchesi ve ark., 2007). Metillenme sonucunda oluşan replikasyon hatalarında MMR, BER veya nükleotit çıkarım tamir (NER) mekanizmaları aktif hale geçmektedir (Verbeek ve ark., 2008; Kaina ve ark., 2010).

TMZ'nin sitotoksik aktivitesi, O⁶-MeG yapısıyla açıklanır. Bununla birlikte, bu eklenti hedef hücre DNA'sında oluşturulan metil eklentilerin tüm miktarının yaklaşık %8'ini temsil eder. Daha önce de bahsedildiği gibi, metil eklentilerinin % 65-80'i N⁷-guanin içerir ve % 8-12'si N³-adenin içerir (Kaina ve ark., 2007). Ancak, N³-meA'nın, BER tarafından tamir edilmediği zaman oldukça öldürücü olduğu ancak N⁷-meG'nin ise belirgin bir sitotoksik etkisinin saptanmadığı belirtilir (Marchesi ve ark., 2007).

MMR sistemi, DNA polimerazın hata düzeltme aktivitesinden kaçan replikasyon hatalarını düzeltir. MMR sistemi sadece yanlış eşleşmiş bazları değil aynı zamanda eklenme/çıkarma (IDL) hatalarını da tanır ve tamir eder (Shah ve ark., 2010). MMR

sisteminde meydana gelen kusurlar nedeniyle ortaya çıkan DNA tamirindeki işlev kaybının karsinogeneze yol açan mutasyon sıklığının artışıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir. (Hoeijmakers, 2001; Shah ve ark., 2010). MMR sistemindeki hatalar bazı hastalıkların oluşmasına neden olabilmektedir (Watson ve Lynch, 2001; Tuteja ve Tuteja, 2001; Ishikawa ve ark., 2004). MMR sistemi ilk kez E.coli'de tanımlanmıştır. Burada yer alan MutS ve MutL proteinlerinin homologları memelilerde saptanmıştır. Bu nedendir ki memelilerde yer alan MMR proteinleri MutS homoloğu (MSH) ve MutL (MLH) homoloğu olarak adlandırılmıştır. İnsanda MMR sisteminde görevli 4 (toplamda 6) MutS homoloğu (MSH1, MSH2, MSH3 ve MSH6) ve 4 adet MutL homoloğu (MLH1, MLH3, PMS1 ve PMS2) vardır. Bu proteinler kendi aralarında heterodimer kompleksler oluşturarak tamir mekanizmasını gerçekleştirirler (Schofield ve Hsieh, 2003; Kunkel ve Erie, 2005).

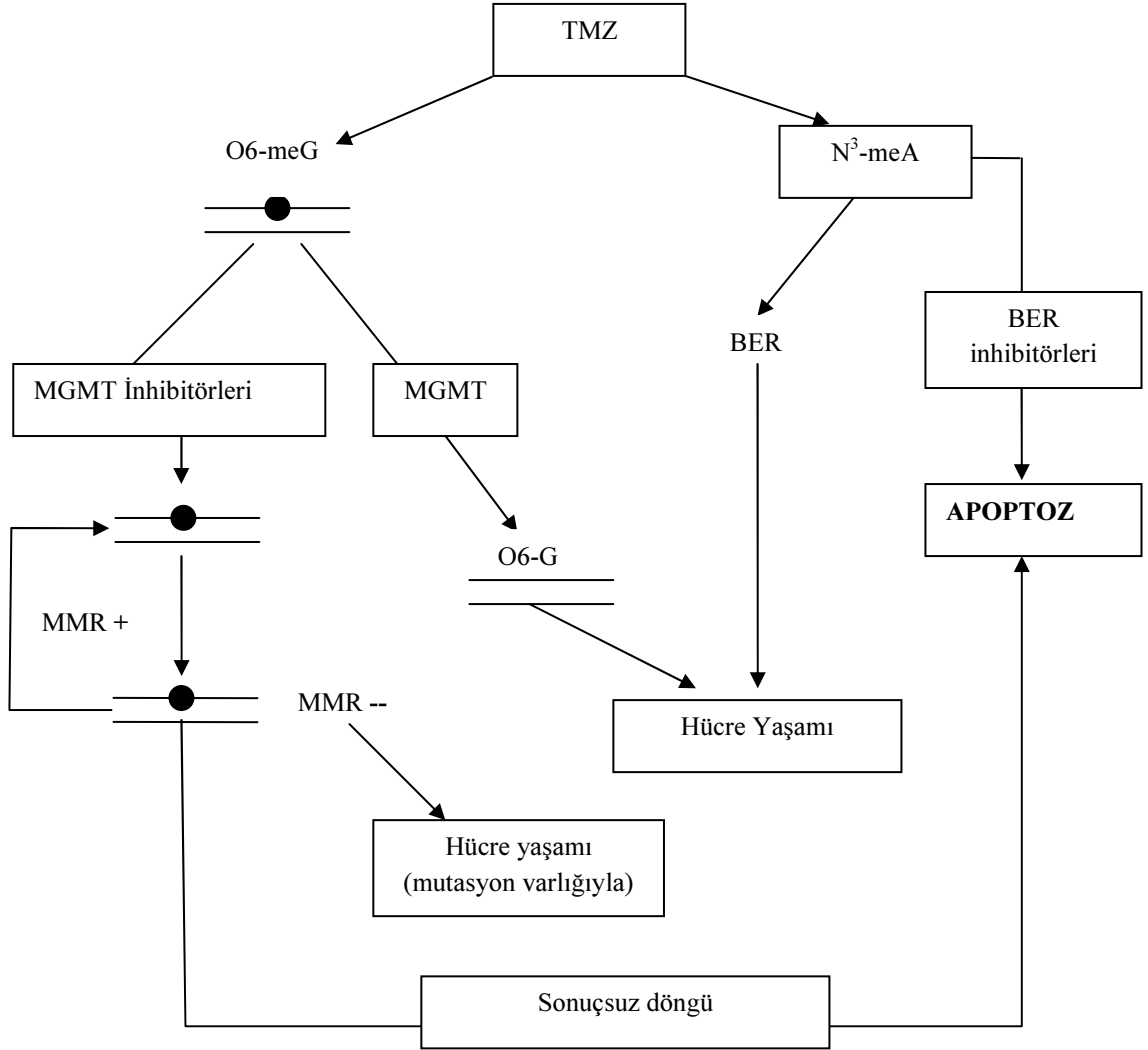
MMR mekanizmasında ekzonükleazlar tarafından kesilen nükleotid dizisi orijinal iplikçiğe değil yeni oluşan DNA iplikçiğine aittir. DNA hasarının yer aldığı tek iplikli DNA zinciri uzaklaştırıldıktan sonra oluşan boşluk doğru DNA dizisiyle doldurulur (Kunkel ve Erie, 2005; Hsieh ve Yamane, 2008).

Hücrelerin MMR fonksiyonu ile TMZ duyarlılığı arasında sıkı bir ilişki vardır (Sarkaria, 2008). Ayrıca, MMR fonksiyonuyla MGMT fonksiyonu arasında da ters bir ilişki vardır (Kaina ve ark., 2010). Araştırmalar, triazin bileşiklerine karşı gelişen dirençte MMR fonksiyon kaybının önemli olduğunu (Caporaso ve ark., 2007) ve MMR'ın, DNA hasarı sonucu oluşan apoptotik yolağın tetiklenmesinden sorumlu olduğunu bildirmektedir (Şekil 1.10) (Marchesi ve ark., 2007).

TMZ'nin MMR sistemi doğru biçimde çalışan malin hücrelerde apoptozu indüklediği fakat MMR sistemi hatalı olan malin hücrelerde ise bunun olmadığı gösterilmiştir. MGMT ve MMR aktivitesi düşük olan tümör hücrelerinin TMZ'ye direnç gösterdiği belirtilmektedir (Caporaso ve ark., 2007). Düşük MGMT aktivitesi gösteren ve aktif bir MMR sistemine sahip tümör hücrelerinde ise TMZ'nin apoptozu yol açtığı bildirilmektedir (Pagani ve ark., 2007). TMZ tarafından indüklenen hücre apoptozunda MMR'in sahip olduğu rolün açıklanmasına ilişkin farklı modeller

önerilmesine rağmen “sonuçsuz döngü modeli” (futile cycling model) en geçerli model olarak görülmektedir (Marchesi ve ark., 2007).

Sonuçsuz döngü modeline göre, MMR sistemi O⁶-meG:T ve O⁶-meG:C yanlış eşleşmelerini tanır. Bununla birlikte, modifiye baz kalıp zincirde olduğundan ve MMR yeni sentezlenen iplikçileri hedef aldığından, bu tamir olayı primidin içeren iplikçiğin degradasyonu ve takibinde O⁶-meG karşısına yeniden C veya T yerleştirilmesi ile sonuçlanır. Bu süreç tekrarlanır ve sonunda yeni sentezlenen DNA zincirinde boşluklar oluşur. Oluşan bu boşluklar devam eden hücre döngüsünün sentez fazında çift zincir DNA kırıklarının oluşmasına neden olur. Hücre bölünmesinin G₂ (Gap2) fazında, DNA hasarı, hücre siklusunun durmasıyla sonuçlanan sinyal yolağını aktive eder. Hücrede bölünme sürecinin durmasını ya apoptoz ya mitotik yıkım ya da senesens benzeri bir durum takip eder (Drablos ve ark., 2004).



Şekil 1.10. TMZ'nin sitotoksik mekanizması (Marchesi ve ark., 2007)

BER tamir sistemi, DNA bazlarının metilasyonu veya oksidasyonu sonucu oluşan lezyonlara ve çeşitli ajanlarca oluşturulan baz modifikasyonlarına karşı hasar kontrolü yapan çok enzimli bir sistemdir. BER tamir sistemi hatalarının tümörigeneze neden olabileceği belirtilmektedir (Sweasy ve ark., 2006).

BER tarafından yönetilen tek nükleotit tamirinde, poly(ADP-riboz) polimerazlar (PARP) önemli rol oynarlar. DNA üzerinde hatalı bazı veya tek zincir kırığını saptayabilen PARP enzimlerini Nikotinamid dinükleotit (NAD⁺)'tan nikotinamid ve ADP-riboz oluşumunu katalizler. Bu ADP-riboz moleküllerinden uzun Poli ADP-riboz (PAR) polimerleri yapılır. PAR molekülleri, kromatin yapısının açılmasını

tetikler. Böylece tek zincir kırığı veya baz çıkarım tamir enzimleri hasar bölgesine kolaylıkla ulaşabilir (Beneke ve Burkle, 2004). Ayrıca PARP enzimlerinin bazı DNA bağlanma proteinlerinin aktivitesini etkilediği ve sonuçta gen transkripsiyonu, hücre siklusu progresyonu, hücre ölümü, kromatin fonksiyonu ve genetik stabilite gibi farklı hücresel süreçlerde önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Bryant ve Helleday, 2004).

TMZ'ye karşı gelişen dirençte sitotoksik olduğu bilinen N3-meA'nın tamiri PARP inhibitörleri kullanılarak engellenebilir. PARP inhibitörleriyle BER mekanizmasının işleyişi durdurularak hücrelerin apoptoza yönlendirilmesi sağlanabilir. Araştırmalar, PARP inhibitörlerinin metilasyon ajanlarının sitotoksik etkisini arttırdığını gösteriyor (Tentori ve ark., 2003; Graziani ve Szabo, 2005; Tentori ve ark., 2010).

1.4.4. TMZ'nin Klinik Kullanımdaki Önemi

Triazin bileşikleri ve özellikle TMZ farmakokinetik ve terapötik özellikleriyle klinik kullanımda ilk akla gelen kemoterapötik grublardan biridir. Bu bileşiklerin tercih edilmesinin bir çok nedeni vardır. Bunlar a) TMZ kolay tolere edilebilen, kendiliğinden fizyolojik şatlarda aktifleşebilen bir ilaçtır, b) klasik kemoterapiye direnç gösteren hematopoitik veya solid tümörlerin bir çoğu triazin'lere duyarlıdır, c) TMZ'ye karşı gelişen dirençte DNA tamir sistemlerine ait genlerin metilasyon veya ekspresyon gibi bir takım genomik bilgileri önemli rol oynar. DNA tamir sistemlerine ait bu bilgilerin öğrenilmesi hastaların ilaca olan duyarlılığı hakkında bir öngörü sunulabilir d) Kanser hücrelerinin bu bileşiklere gösterdikleri hassasiyet DNA tamir enzimlerinin fonksiyonel aktivitesinin ve ekspresyon seviyesinin düzenlenmesiyle büyük ölçüde artırılabilir, e) Triazinler'in tedavi edici etkisi eğer ilaç MGMT inhibitörleri ile birlikte verildiyse önemli ölçüde artırılabilir. MGMT inhibitör kullanımının en önemli yan etkisi myeloid hücrelerinin baskılanmasıdır. Bu durumu mutant MGMT geni ile transfekte olan otolog kemik iliği hücreleriyle yapılacak tansplantasyonla üstesinden gelinebilir (Marchesi F ve ark., 2007).

1.5. Amaç

GBM tedavisinde kemoterapötik ilaç olarak TMZ kullanımını son yıllarda artmaktadır. Ancak hastalarda ya başlangıçta veya sonradan TMZ'ye karşı direnç gelişmektedir. TMZ direncinin önlenmesi amacıyla sunulan yaklaşımlardan en önemlisinin "MGMT inhibitörlerinin geliştirilmesi ve bunların kullanılmasının olduğu" bildirilmiştir (Hermission M ve ark, 2006). Tümör spesifik MGMT inhibitörlerinin kullanılmasıyla diğer stratejilerde karşılaşılan doz ayarlaması ve toksik yan etki gibi sınırlamaların üstesinden gelinebileceği düşünülmektedir (Ranson ve ark., 2006) Lomeguatrib, oral yolla ve TMZ ile kombine alınabilen bir MGMT inhibitörüdür. Bu güne kadar GBM'de lomeguatrib'in MGMT inhibisyonu üzerine etkisi ve lomeguatrib+TMZ kombinasyonunun kullanımına ilişkin her hangi bir veri bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında, primer GBM dokularından elde edilen primer tümör hücrelerinde ve GBM hücre dizilerinde lomeguatrib-TMZ kombinasyonunun MGMT metilasyonu ve ekspresyonu üzerine etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar

2.1.1. Hücre Kültürü

Temozolomide	: Schering-Plough, Dr.George P. Margison (Paterson Institute for Cancer research, UK) tarafından saf laboratuvarımıza gönderildi. TMZ, kullanım öncesi 10 000 μ M konsantrasyona sahip olacak biçimde hazırlandı.
Lomeguatrib	: Sequoia Research Products, UK. No: SRP015661. Lomeguatrib, kullanım öncesi 10 000 μ M konsantrasyonuna sahip olacak biçimde hazırlandı.
Besi yeri	: Hyclone marka, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) / Yüksek Glikoz (+4,00mM L-Glutamin, +4500 mg/L Glukoz, + Sodyum Pirüvat), No: 30243.01
Besiyeri	: Hyclone marka, DMEM / Düşük Glikoz (+4,00 mM L-Glutamin, +1000 mg/L Glukoz, + Sodyum Pirüvat), No: 30021.0
Besi yeri	: Hyclone marka, Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (L-glutaminsiz)
Fötal Dana Serum (FBS)	: Hyclone marka, No: SV20160.03

L-Glutamin	: PAA marka, 200mM (100X), No: M11-004
Penisilin-Streptomisin	: PAA marka, No: P11-010
Petri Kutusu	: Isotherm marka, 90 mm çap, steril
Bistüri	: AE marka, karbon çelik, 11 numara
Tripsin	: Biological Industries marka, No:41-920-5.
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	: Applichem marka, No: 6381-92-6.
Tripsin-EDTA karışım oranı	: %0,25 Tripsin + %0,1 EDTA
Flask (75 cm ²)	: Orange Scientific marka, No: 5520200
Flask (25 cm ²)	: Orange Scientific marka, No: 5520100
Hücre Dondurma tüpleri	: Greiner bio-one marka, 2 ml
Dimetilsülfoksit (DMSO)	: Applichem marka, No: 67-68-5
Fosfat Tuz Tamponu (PBS) (pH: 7,4) (Ca ⁺⁺ ve Mg ⁺⁺ içermeyen)	: 140 mM NaCl (Gerbu marka, Lot no: 210307) 3 mM KCl (Carlo Erba marka, No: 7447-40-7) 3 mM KH ₂ PO ₄ (Carlo Erba marka, No: 7778-77-0) 6.4 mM NaHPO ₄ (Carlo Erba, No: 10028-24-7)

Kullanılan GBM Hücre Dizileri;

Çalışmamızda primer hücre kültürü yanında 4 adet GBM hücre dizisi kullanılmıştır. Primer hücre kültürlerinde yapılan testler ve analizler bu hücrelerde de yapılmıştır. Kullanılan hücre dizileri U-118 MG, U-138 MG, T98G ve U87 MG (U87)'dir. Bu hücrelere ait genel özellikler **Çizelge 2.1**'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan hücre dizilerinin özellikleri

	U-118 MG	U-138 MG	T98G	U87 MG
Organizma	İnsan	İnsan	İnsan	İnsan
Cinsiyet, yaş	Erkek, 50	Erkek, 41	Erkek, 61	Bayan, 44
Doku	Beyin	Beyin	Beyin	Beyin
Morfoloji	Karışık	Poligonal	Fibroblast	Epitel
Yüzey tutunumu	Yapışan Hücreler	Yapışan hücreler	Yapışan Hücreler	Yapışan Hücreler
Tümörijenik	Evet	Hayır	Hayır	
Karyotip	Pentaploide yakın, kr.X 2 kopya, kr.Y yok, kr.10 tek kopya	Hiperdiploid	Hiperpentaploid	Hipodiploid
Besi yeri	RPMI-1640, %10 FBS	DMEM (düşük glikoz)-, %20 FBS	RPMI-1640, %10 FBS	DMEM (düşük glikoz)-, %10 FBS
Besi yeri yenileme süresi	Haftada 2-3 kez	Haftada 2-3 kez	Haftada 2-3 kez	Haftada 2-3 kez
Pasaj metodu	%0,25 Tripsin + %0,1 EDTA	%0,25 Tripsin + %0,1 EDTA	%0,25 Tripsin + %0,1 EDTA	%0,25 Tripsin + %0,1 EDTA
Ayırma oranı	1:3- 1:6	1:4- 1:6	1:3- 1:10	1:2- 1:5
Biyogüvenlik düzeyi	1	1	1	1

Hücreleri çoğaltmak için hazırlanan besiyeri:

Primer kültür hücreleri için,

500 ml DMEM (yüksek glikoz, L- glutaminli) besiyeri, %10 veya %40 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin

Hücre dizileri (U-138 MG ve U-87MG hariç) için, RPMI-1640 %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin, %1 L-glutamin

U-138 MG için, 500 ml DMEM (düşük glikoz, L- glutaminli) besiyeri, %20 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin

U87MG için, 500 ml DMEM (düşük glikoz, L- glutaminli) besiyeri, %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin

Hücre dondurma solüsyonu : %90 FBS ve %10 DMSO

Tranfer pipeti : Citotest marka, 155 mm, Lot no: 090036

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

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

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

Sarstedt marka, No: 62.547.254 (50 ml)

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

2.1.2. İmmünohistokimya

6 veya 24 kuyucuklu plak	: Orange Scientific marka, No: 5530500 Orange Scientific marka, No: 5530300
Metanol	: Merck marka, No: K39481808 903
Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP)	: Pierce marka, poliklonal tavşan antikor, No: PA3-16727
Keçi anti-tavşan IgG (H+L)	
Fluorescein izotiyosiyanat (FITC) işaretli	: Anaspec marka, INC, No: 28176 FITC
Triton-X 100	: Gerbu marka, No: 2000
%0,1 Triton-X 100, PBS içerisinde	: 100 µl Triton-X 100 100 ml PBS
Bloklama solüsyonu	
(6 kuyucuklu plakın her bir kuyucuğu için)	: 50 µl serum (keçi, dana , vb) 1 µl GFAP antikor 450 µl %0,1'lik Triton-X 100
Sekonder antikor solüsyonu	
(6 kuyucuklu plakın her bir kuyucuğu için)	: 5 µl sekonder antikor 495 µl %0,1'lik Triton-X 100
Floresan Mikroskop	: Olympus BX51 (FITC filtreye sahip)
Lam	: Isotherm, 24X32 mm
Formaldehit	: %4'lük
Alimunyom folyo	: Koryoplast ve diğer muhtelif markalar

2.1.3. [3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid] (MTT) Sitotoksitesite Testi

MTT tozu	: Bioworld marka, No: 42000092-2
MTT solüsyonu	: 5 mg toz MTT 1 ml steril PBS içerisinde çözöldü ve filtre edilerek (0,20 µm'lik) kullanıldı.
MTT besiyeri karışımı (96'lık plakta her bir kuyucuk için)	: 10 µl MTT solüsyonu (5 mg/1 ml) 90 µl besi yeri
DMSO	: Applichem marka, No: 67-68-5
96 kuyucuklu plak	: Orange Scientific marka, No: 5530100
Lizis solüsyonu (100 ml için)	: Triton X (1 ml) (Gerbu marka, No: 2000) HCl 0,1 N (10 ml) (Fischer Scientific marka, 12420- 0010) İsopropanol (89 ml) (Merck marka, No: K37727334)

2.1.4. RNA İzolasyonu

Tri-reagent RT	: Molecular Research Center marka, No: RT 111.
BAM (4-bromoanisole)	: Molecular Research Center marka, No: BN 191
İzopropanol	: Merck marka, No: K37727334
Etil Alkol (%75,soğuk)	: Riedel-de Haen marka, No: 64-17-5
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	: Applichem marka, No: 1609-47-8
DEPC'li su	: %0,1 konsantrasyonda. 100 ml steril distile su (dH ₂ O)'ya 0,1 ml DEPC eklendi. Bu solüsyon oda sıcaklığında 1

saat bekletildi, ardından otoklanıp (15 dakika, 100°C) soğutularak kullanıldı.

2.1.4.1. RNA Kantitasyonu

RNA miktarının ölçümü Qubit marka (Invitrogen) mini fluometre yardımıyla yapılmıştır. Bu fluometreye ait Quant-it RNA assay kiti ile ölçüm yapılmıştır. RNA izolasyonunda Eppendorf 5415R marka soğutmalı santrifüj kullanılmıştır.

2.1.5. Komplementer DNA (cDNA) İzolasyonu

cDNA izolasyonu için Finnzymes marka F-470L cDNA sentez kiti kullanılmıştır. Bu izolasyon için kit dışında sarf malzeme olarak 200 µl'lik ependorf tüpler ve steril dH₂O kullanılmıştır.

2.1.6. Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyon kiti	: Maxim Biotech, Inc marka, No: SA-40001, Bdtract genomik DNA izolasyon kiti
Proteinaz K	: 20 mg/ml (Finnzymes, No: F-2025)
RNase A solüsyonu	: 10 mg/ml (Maxim Biotech, Inc marka, No: EXT-R001)

2.1.7. Bisülfid DNA Modifikasyonu

DNA modifikasyonu için Chemicon marka (S7820) CpGenom modifikasyon kiti kullanılmıştır. Kitin ilgili protokolü öncesinde bir takım hazırlıklar yapılması gerekmektedir. Bu hazırlık aşaması aşağıda özetlenmiştir.

NaOH	: Applichem marka, No: 1310-73-2
β -Merkaptoetanol	: Merck marka, No: 444203
NaOH (3M)	: 1 gr NaOH peleti 8,3 ml dH ₂ O'da çözülür.
NaOH (20 mM, %90 etanol içinde) (Her kullanımda taze hazırlanmalı)	: Bu solüsyondan 1ml hazırlamak için, 900 μ l %100 etanol + 93,4 μ l dH ₂ O + 6,6 μ l 3M NaOH
Reaktif I (Işıktan korunmalı ve her kullanımda tekrar hazırlanmalı)	: Reaktif I çözülür. Açmadan önce oda sıcaklığına ısıtınız. Her bir örneği modifiye etmek için 0,227 gr DNA modifikasyon Reagent I tartılıp ve üzerine 0,571ml dH ₂ O eklenir. Vortekle karışmasını sağlayın. Ortalama 20 μ l 3M NaOH kullanılarak pH'ı 5'e getirilir.
Reaktif II	: Açmadan önce oda sıcaklığına kadar ısıtınız. 1 μ l β -Merkaptoetanol 20 ml deiyonize suya eklenir. Modifiye edilecek her bir örnek için bu karışımın 750 μ l'si 1,35 gr DNA modifikasyon II'nin içerisine eklenir ve karışması sağlanır.

2.1.8. Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (MS-PZR)

MS-PZR öncesinde genomik DNA'lar bisülfid modifikasyonuna maruz bırakılmıştır.

Hot Start Taq Tamponu B2 (10X) : Solis marka, Lot no: B2HF0106

Hot Start Taq enzim (5U/μl) : Solis marka, Lot no: HF05164

MgCl₂ (25mM) : Solis marka, Lot no: M1956

deoxynükleotid trifosfat (dNTP) karışımı (10 mM) : Vivantis marka, NP: 2410

MGMT geni metile durum için primerler : M primerler

F: 5' TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC

R: 5' GCACTCTTCCGAAAACGAAACG

MGMT geni metile olmadığı durum için primerler : U primerler

F: 5' TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT

R: 5' AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA

PZR sonrası elde edilen amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesinde Quantum-ST4 100/26MX, Vilber/Courmat jel görüntülme cihazı kullanılmıştır. PZR için Biometra T-1 cihazı kullanılmıştır.

2.1.9. Gerçek Zamanlı PZR (RT-PZR)

RT-PZR için Roche marka Light Cycler kapiller cihazında (LC_2773) Taqman prob kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyon cam kapiller tüplerde gerçekleştirilmiştir.

Kapiller : Roche marka, No: 04929292 001

Reaksiyon tamponu, enzim, dNTP, MgCl₂ karışım halinde Roche tarafından temin edilmiştir.

MGMT Taqman prob (no:23) : Roche marka, No: 04686977001

p53 Taqman prob (no:71) : Roche marka, No: 04688945001

Primerler

MGMT için,

F: 5' GGGTCTGCACGAAATAAAGC

R: 5' CTCCGGACCTCCGAGAAC

P53 için,

F: 5' CTTTCCACGACGGTGACA

R: 5' TCCTCCATGGCAGTGACC

Kontrol primeri (Glikoz 6 fosfatdehidrogenaz, G6PD) için

F: 5'

TCCGGAGAGAAGTCTGAGTCC

R: 5' ATCGCCCTGGAAAAGCTC

2.1.10. Tek Hücre Jel Elektrofrezisi (COMET)

Agaroz, normal erime sıcaklığına sahip	: Pronadisa marka, No: 8012
Agaroz, düşük erime sıcaklığına sahip	: Sigma marka, A0701
Lamel	: Isotherm marka, 24X32 mm
Tris-Borik Asit EDTA (TBE) solüsyonu 1) (pH: 7,5)	: Tris baz (Biobasic marka, No: 77-86-35-3) Borik asit (Amresco marka, No: 10043-35-3) Na ₂ EDTA (Merck marka, No: 324503)
DTT (Dithiothreitol)	: Fermentas, No: R0861
Sodyum Lauril Sarkozinat	: Amresco, No: 137-16-6
Lamların Hazırlanması	: Lamlar %1'lik normal erime sıcaklığına sahip agaroz ile oda sıcaklığında kaplanmıştır. 100 ml PBS içerisinde hazırlanmış %1'lik normal erime sıcaklığına sahip agaroz bir şale içerisine aktarılmıştır. Kullanılacak olan temiz lamlar bu şale içerisine yaklaşık 2 saniye batırılmış ve 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Lizing solüsyonu (soğuk) : NaCl (2.5M/L),
 EDTA (0,1M),
 Tris (0,01M)
 Triton X-100 (%1)
 Sodyum Lauril sarkozinat (%1)
 DTT (% 0,14)

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

2.1.11. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz, normal erime sıcaklığına sahip : Pronase marka, Lot No: 084518PR
 TBE solüsyonu (pH: 7,5) : Tris baz (Biobasic marka, No: 77-86-1)
 Borik asit (Amresco marka, No: 10043-35-3)
 Na₂EDTA (Merck marka, No: 324503)
 Yükleme Tamponu : 1XTBE solüsyonu, 100 ml
 Gliserol (Applichem marka, No:56-81-5)
 Bromfeneol Mavisi (Amresco marka, No: 115-39-9)
 Etidyum Bromür : 10 mg/ml (İnvitrogen marka, No: 15585-011)
 DNA markır : Jena Bioscience marka, No: M-213, 50 baz çifti (bç)'lik
 %1'lik agaroz jel : 1 gr Agaroz, 100 cc 1XTBE (Tris Borik Asit EDTA), 2,5 µl Etidyum bromür

2.1.12. Akım Sitometrisi

RNase : Sigma marka, No: P7003

Propidium Iodide : Sigma marka, No: P4170

Akım sitometrisinde kullanılan PBS, tripsin ve etanol malzemelerine ait bilgiler yukarıda belirtilenlerin aynısıdır.

Steril transfer pipeti, steril mikropipet uçları, 15 ml ve 50 ml'lik tüpler ve 0,5 ve 1,5-2 ml'lik steril ependorf tüpler tüm çalışmalarda ortak olarak kullanılan malzemelerdir.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Primer Hücre Kültürü

- GBM ön tanısı ile ameliyat edilmesi kararlaştırılan hastalara ameliyat öncesi çalışmaya katılabilmeleri konusunda bilgi verilmiştir. Hastalara ameliyat sırasında beyinden çıkarılan doku örneklerinin bir kısmının araştırma amaçlı kullanılabilmesi için etik kurallar çerçevesinde izinlerinin alınması gerektiği söylenmiştir. Çalışmaya katılmak isteyen hastalar etik kurul tarafından onayı alınmış bilgilendirilmiş hasta onam formlarını imzalamışlardır.
- Ameliyat sırasında çıkarılan tümör parçasının tümörijenik hücre popülasyonu içerebileceği ve hücre kültürü yapılabileceği bir patoloğ tarafından saptandıktan sonra ilgili doku materyali içerisinde serum fizyolojik olan steril enjektörler içerisinde en fazla 30 dakika içerisinde hücre kültürü laboratuvarına getirilmiş ve primer kültür protokolü uygulanmaya başlanmıştır. Bazı hastalardan tümör dokusu dışında ameliyat sırasında tümöre ulaşmak için çıkartılan normal doku örnekleri de alınmıştır. Bu durum hakkında da hastalara ameliyat öncesinde bilgilendirme yapılmıştır.

- Hücre kültür laboratuvarına getirilen doku parçaları laminar hava akış kabini içerisinde steril petri kabına aktarılmıştır. Doku üzerine 2-3 ml yüksek glikoz oranına sahip medyum (%10 FBS) eklenmiştir ve bu medyum içerisinde ortalama 1mm^3 hacme kadar kesilerek küçültülmüştür. Bu işlem sırasında damar parçaları ve nekrotik bölgeler çıkarılmış ve kültüre edilecek doku parçalarının bunları içermemesine dikkat edilmiştir. Hücre kültürü işlemi için ayrılan doku parçalarından geriye kalanların bir kısmından kültür işlemi sırasında RNA elde edilmiş bir kısmı da genomik DNA elde edilmesi için sıvı nitrojenle mumaele edilerek -80°C 'ye kaldırılmıştır.
- Doku parçaları, içerisinde 10 ml %10 FBS'li medyum içeren 50 ml'lik tüpe aktarılmıştır. Transfer pipeti kullanılarak tüp içerisinde yapılan karıştırma ve pipetajla dokuların parçalanma işleminin kolaylaştırılması sağlanmıştır.
- Parçalar bu medyum içerisinde 15 dakika bekletilmiştir.
- 15 dakika sonunda parçalar falkon tüpünün alt kısmına çöker. Transfer pipeti yardımıyla üst süpernatant kısım dokulara yaklaşımadan atılmıştır. Tekrar 10 ml'ye kadar ilgili medyum eklenir, transfer pipeti ile karıştırılır ve 15 dakika beklenir. Bu işlem en az 3 kez tekrar edilmiştir.
- Son yıkamadan sonra doku parçalarının üzerine 4 ml %40 FBS içeren medyum (yüksek glikozlu) eklenir ve karıştırılır. Bu karışımın en fazla 1 ml'si 25cm^2 'lik flaslara aktarılır. Her flaskta ortalama 20-25 doku parçası olmalıdır. Flasklar %5 CO_2 'li nemlendirilmiş, 37°C 'lik etüve kaldırılır.
- Hücreler 48 saat her hangi bir müdahale yapılmaksızın etüv içerisinde bekletilmiştir. Bu bekleme işleminin amacı doku parçalarının yüzeye tutunmalarını sağlamaktır. Doku parça sayısının 25'in üzerinde olması doku parçalarının homojen biçimde dağılmasını ve tutunmalarını, medyum miktarının 1 ml'nin üzerinde olması doku parçalarının tutunmalarını engellemektedir.
- Bekleme süresi sonunda inverted mikroskop yardımıyla hücreler incelenir. Tutunan doku parçaları var ise flaskta yer alan medyumun üst kısmı atılır ve 2 ml %40 FBS içeren medyum (yüksek glikozlu) eklenir.
- Bu işlem her 48 saatte bir yenilenir. Doku parçalarında çıkan hücreler çoğalarak flaskın %50-60'ını kapladığı zaman pasaj işlemi yapılır.

Tripsin/EDTA kullanılarak yapılan pasaj işlemi sonrasında ve hücreler %10'luk FBS içeren medyuma (yüksek glikozlu) konur ve bu aşamadan sonra standart hücre kültürü işlemleri uygulanır.

- Birinci pasaj sonrasında hücrelerde immünohistokimyasal yöntemle GFAP antikori ile immün boyama yapıldı. Bu işlem çoğaltılan hücrelerin gerçek glia tümör hücresi olduğunu göstermek amacıyla yapıldı. Bu boya yalnızca glia kökenli hücrelere özgü bir proteini işaretlemektedir.
- İlk 2 pasaj sonrasında hücreler aynı şartlarda 75 cm²'lik flasklara aktarılmış ve sonraki pasajlarda da bu flasklar kullanılmıştır. Deney başlangıcında yer alan kan, epitel ve fibroblastlar pasaj sayısı arttıkça ortamdaki kaybolmuş ve glia kökenli hücreler seçilmiştir.
- Pasajı yapılan hücrelerden bir kısmı hücre dondurma solüsyonu içerisinde dondurulmuştur.

2.2.1.1. Standart Hücre Kültürü

- Primer hücre kültüründe glia hücreleri seçilip çoğalmaya başlayınca kullanılan medyumlarda değişiklik yapılarak standart hücre kültür protokolü uygulanmıştır. Hücre pasajlarının devamında ve immün boyama işlemlerinde standart hücre kültür protokolleri uygulanmıştır.
- Kültür flaskı %70 oranında hücre ile kaplanınca pasaj işlemi yapılmıştır. Bunun için hücrelerin üzerindeki medyum atılarak steril PBS (Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ içermeyen) ile hücreler yıkanmıştır.
- PBS yıkamasından sonra PBS alınarak 25 cm²'lik flaska 0,4 ml, 75 cm²'lik flaska 1 ml Tripsin/EDTA eklenmiş ve 37°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrasında birbirlerinden ve tutundukları yerden kopan hücrelerin üzerine Tripsin/EDTA miktarı kadar medyum eklenmiştir. Hücreler steril serolojik pipet yardımıyla 15 ml'lik tüpe aktarılmıştır.
- Hücreler +4°C, 1200 rpm (revolutions per minute, dakikadaki devir sayısı)'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısım atılmıştır. Hücrelerin bir kısmı dondurulmak üzere ayrılmıştır. Geri kalan kısmın

üzerine serolojik pipet yardımıyla pasaj yapılacak flask sayısına göre kültür medyumunu eklenerek karıştırılmıştır. Karıştırıldıktan sonra hücreler flasklara homojen biçimde dağıtılmıştır.

- Dondurulacak hücre popülasyonunun üzerine dondurma solüsyonu eklenerek karıştırılmış ve sonrasında özel dondurma tüplerine aktarılmıştır. Bu tüpler, buz içerisinde -20°C 'de 1 saat ve -80°C 'de 24 saat tutulduktan sonra likit nitrojen bulunan tanklara aktarılmıştır.

2.2.2. İmmünohistokimya

Hücre kültüründen elde edilen hücrelerin glia kökenli hücreler olduklarını göstermek için immünohistokimya yapılmıştır. Bu amaçla, glia hücrelerine özgü sitoplazmik bir protein olan GFAP'ın varlığı immün boyamayla gösterilmiştir. Bunun için aşağıda yer alan protokol izlenmiştir.

- İmmün boyama yapılacak hücreler tripsine edilerek santrifüj ve Thoma lamında sayım işlemi gerçekleştirilmiştir. Plak olarak 6 veya 24 kuyucuklu plaklar kullanılmıştır.
- Altı kuyucuklu plakın her bir kuyucuğuna yaklaşık 70.000, 24 kuyucuklu plak kullanıldığında ise her bir kuyucuğa 30.000 hücre homojen dağılım gösterecek şekilde ekilmiştir. Homojen dağılım önemlidir ve plaklar etüve konulmadan evvel ışık mikroskopunda gözlenir, aksi durumda yığılmalar pipet yardımıyla giderilir.
- Hücre ekimi yapılan plaklar 37°C 'de, %5 CO_2 'li etüvde bir gece (16/24 saat), bekletilmiştir.
- Bekleme sonunda, plak tabanına yapışan hücrelerin üzerindeki medyum atılıp ve kuyucuklar steril PBS ile 3 defa yıkanmıştır. Bu basamaktan sonraki işlemler oda ısısında, temiz bir laboratuvar ortamında yapılabilir. Steril kabin içerisinde çalışma zorunluluğu yoktur.
- Yıkama işlemi sonunda soğuk metanol kullanılarak fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Her bir kuyucuğuna 1 ml metanol eklenen plak 10 dakika oda ısısında bekletilmiştir.

- Bekleme süresi sonunda hücrelerin üzerindeki metanol atılmış ve hücreler transfer pipeti yardımıyla PBS ile 2 defa yıkanmıştır.
- Son yıkamadan sonra PBS atılarak hücreler PBS içerisinde hazırlanmış %0.1'lik Triton-X 100 ile 5 dakika 37°C permeabilize edilmiştir.
- Bu süre sonunda 37°C'den alınan hücrelerin üzerindeki Triton-X 100, transfer pipeti yardımıyla atılarak özgül olmayan bloklama yapılmıştır. Bu bloklama işleminde 6 kuyucuklu plakın her bir kuyucuğu için toplam 500 µl ve 24 kuyucuklu plakın her bir kuyucuğu için toplam 250 µl hazırlanmıştır.
- Antikor blok solüsyonu eklendikten sonra hücreler 1 saat 37°C'de veya oda ısısında bekletilmiştir. Bu bekleme oda ısısında olursa plak ışık görmemesi için alimünyum folyo ile kapatılmalıdır.
- Bekleme süresinin sonuna doğru FITC işaretli sekonder antikor solüsyonu hazırlanmıştır. Bu sekonder antikor solüsyonu kullanım protokolüne göre seyreltilerek kullanılmıştır. Bizim kullandığımız antikor 1/100 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır. Bu solüsyon 6 kuyucuklu plakın her bir kuyucuğu için toplam 500 µl ve 24 kuyucuklu plakın her bir kuyucuğu için toplam 250 µl olarak hazırlanmıştır. Sekonder solüsyon eklendikten sonra plak 1 saat 37°C veya oda ısısında bekletilmiştir.
- Bekleme süresi sonunda kuyucukların üzerindeki antikor karışımı alınıp 3 defa PBS ile pipetaj yapmadan yıkama yapılmıştır.
- Yıkama sonunda, hazırlanan sekonder antikor solüsyonu hücrelerin üzerinde eklenip plak 45 dakika etüvde veya alimünyum folyoya sarılı biçimde oda ısısında bekletilmiştir.
- Bekleme süresi sonunda sekonder antikor en fazla 2 defa daha kullanmak üzere alimünyum folyoya sarılarak, 1.5 ml'lik yeni bir ependorf tüpüne konmuş ve -20°C'ye kaldırılmıştır.
- Kuyucuklar PBS ile 3 defa yıkandıktan sonra hücreler floresan mikroskop yardımıyla incelenmiştir. Laboratuvarımızda inverted floresan mikroskopunun bulunmaması nedeniyle plak kuyucuklarının içerisinde temiz bir lamel yerleştirilmiş ve hücre ekimi bu lamellerin üzerine yapılmıştır. Boyama sonunda hücrelerin incelenmesi işlemi bir enjektörün iğnesiyle lamellerin mikroskop lamı üzerine ters çevrilmesiyle yapılmıştır.

- İnceleme işlemi sonunda lameller tekrar kuyucuklara yerleştirilmiş ve üzerlerini kaplayacak şekilde PBS eklenerek +4°C'de alimünyum folyoya sarılı biçimde saklanmıştır. Eğer, inverted floresan mikroskopta inceleme yapılacaksa doğrudan plak üzerinden inceleme yapılmış ve hücrelerin üzerine PBS eklenerek +4°C'de saklanmıştır.

2.2.3. MTT ile Sitotoksisite Testi

Lomeguatrib ve TMZ'nin hücreler üzerindeki sitotoksisite düzeylerini (IC50=İnhibitör doz) saptamak amacıyla MTT yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla aşağıda yer alan protokol izlenmiştir.

- Hücre kültüründe elde edilen primer kültür hücrelerinden veya hücre dizilerine ait hücrelerden 96 kuyucuklu plakın her bir kuyucuğuna 15.000 hücre olacak biçimde ve ekim yapılmıştır. Kuyucuklara 100 µl hücre besiyeri karışımı şeklinde ekim yapılmıştır. Plak kuyucuklarına hücrelerin homojen bir biçimde yayılması sağlanmıştır. Bunun için 100 µl'lik pipetle hücre ekimi yapılırken pipet ucu kuyucuk duvarının orta kısmına temas ettirilmiş ve da bir defada hücrelerin kuyucuk içerisine bırakılması sağlanmıştır.
- Bu hücreler 37°C'de, %5 CO₂'li etüvde bir gece (16/24 saat), bekletilmiştir.
- Bekleme süresi sonunda yapışan hücrelerin üzerine farklı konsantrasyonlarda Lomeguatrib ve TMZ eklenmiştir. Hazırlanan ilaç konsantrasyonları 1,10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 µM TMZ, 50 µM Lomeguatrib ve TMZ ile hazırlanan 50 µM Lomegutarib + 1, 10, 25, 50, 250, 500, 1000 µM TMZ'dir. Bunların yanı sıra kontrol amaçlı hiç ilaç verilmeyen kuyucuklar vardır (Şekil 2.1). TMZ ve Lomeguatrib kombinasyonu verilirken TMZ'den 2 saat önce Lomeguatrib verilmiş 2 saat sonra besiyeri değiştirilmeden TMZ eklenmiştir. İlaç eklenen hücreler 48 saat için tekrar etüve kaldırılmıştır. Hazırlanan farklı ilaç konsantrasyonlarının her biri için en az 4 kuyucuk kullanılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri alınarak daha önce hazırlanan

MTT solüsyonu (5 mg/1 ml) toplam besiyeriyle karıştırılıp ve hücrelerin üzerlerine bırakılmıştır. MTT hücre besiyeri karışımı toplamda 100 µl'dir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K	K	K	K	1	1	1	1	10	10	10	10
B	25	25	25	25	50	50	50	50	100	100	100	100
C	250	250	250	250	500	500	500	500	1000	1000	1000	1000
D	50	50	50	50	50+1	50+1	50+1	50+1	50+10	50+10	50+10	50+10
E	50+25	50+25	50+25	50+25	50+100	50+100	50+100	50+100	50+250	50+250	50+250	50+250
F	50+500	50+500	50+500	50+500	50+1000	50+1000	50+1000	50+1000	Negatif kontrol			
G												
H												

Şekil 2.1. MTT testi için 96 kuyucuklu bir plağa ilaçların farklı konsantrasyonlarda ekleme düzeni

- Plak 37°C'de, %5 CO₂'li etüvde 2,5 saat bekletilmiştir.
- Bu süre sonunda plak alınıp kuyucukların üzerindeki MTT hücre besiyeri karışımı atılır ve her bir kuyucuğa 100 µl lizis solüsyonu eklenmiştir.
- Bu aşamada çok uçlu pipet yardımıyla hızlıca bu lizis solüsyonunun kuyucuklarda hücrelerle karışması sağlanır.
- Tüm kuyucuklar pipetajla karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede 530 nm'de ölçüm yapılmıştır.
- **Spektrofotometrik Analiz:** Spektrofotometrede boş ve hücre içeren kuyucuklardan elde edilen veriler GraphPad Prism programında değerlendirilmiş, Lomeguatrib ve TMZ'nin farklı hücrelerdeki sitotoksosite değerleri saptanmıştır.

2.2.4. RNA İzolasyonu

RNA izolasyon işlemi hücre kültürü odasında steril bir ortamda gerçekleştirilmiştir. Bunun için kullanılan ortam son derece temiz, kullanılan tüp ve mikropipet uçları Rnaze açısından steril olmalıdır. Hücre kültüründen elde edilen hücreler 25 cm²'lik flasklara ekildikten sonra MTT sonucunda saptanan konsantrasyonlarda ilaç kombinasyonları uygulanmıştır. Bir örnek için eşit sayıda hücre içeren 4 flask kullanılmıştır. Bunlar, kontrol amaçlı kullanılacak olan ve ilaç konulmayan bir flask, diğeri yalnızca TMZ uygulanmış bir flask, bir diğeri yalnızca Lomeguatrib uygulanmış olan ve son olarak her iki ilacın birlikte kullanıldığı flasktır. İlaç uygulandıktan ve 48 saat bekledikten sonra aşağıdaki protokol izlenerek RNA izolasyonu yapılmıştır.

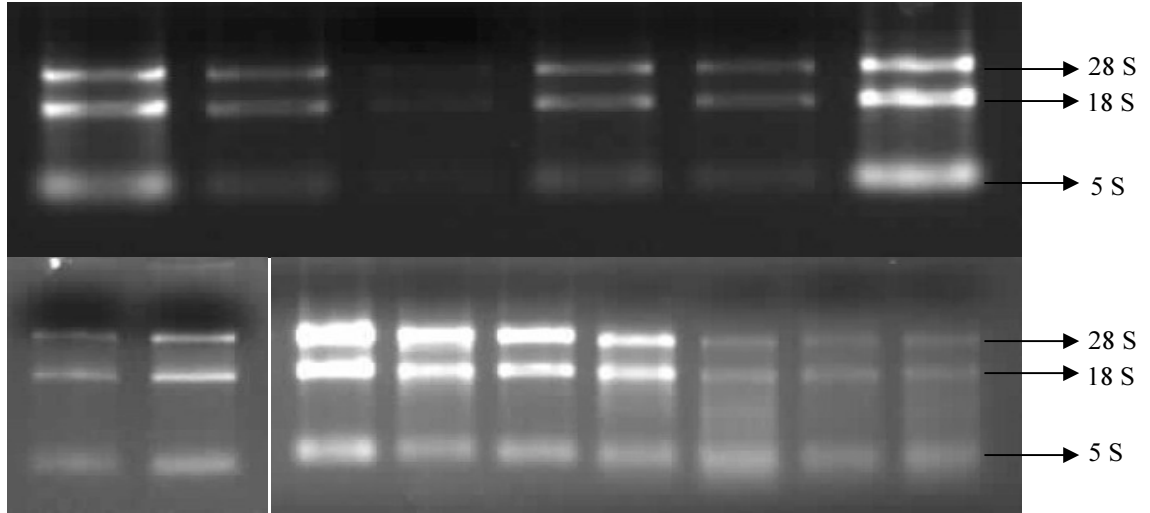
- Hücre kültüründe, 25 cm²'lik flasklarda bulunan ve ilaç uygulandıktan sonra 37°C %5 CO₂'li etüvde bekletilen hücrelerin ilgili süre sonunda üzerlerindeki besi yeri alınmış ve atılmıştır. Flasklar PBS ile yıkanmış ve her bir hücreye 0,4 ml tripsin-EDTA eklenmiştir. Tripsin-EDTA eklenmiş flasklar 5 dakika etüvde bekletilerek birbirlerinden ve yüzeyden ayrılmaları sağlanmıştır.
- Tripsin sonrasında flaskın yüzeyinden ayrılan hücrelere tripsin miktarı kadar besiyeri eklenerek tripsinasyon işlemi durdurulmuştur. Bu hücre besiyeri karışımı 15 ml'lik tüplere alınır ve +4°C'de, 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Bu basamak ve sonrasındaki işlemler aksi belirtilmedikçe buz üstünde devam edilir. Santrifüj sonrasında tüpün üst kısmı pipet yardımıyla atılıp altta kalan hücre lizatının üzerine ticari olarak alınan "Tri Reagent" isimli solüsyondan 1 ml eklenmiş ve mikropipet yardımıyla karışması sağlanmıştır. Bu karışım 2 ml'lik yeni, steril bir ependorf tüpüne aktarılarak buz içerisine gömülü durumda 10 dakika kadar bekletilmiştir.
- Bu süre sonunda, bu tüpün üzerine, ticari olarak satın alınan 4-bromoanisoole solüsyonundan 50 µl eklenmiş ve hızlı bir şekilde, 15 saniye boyunca el yardımıyla kuvvetlice karıştırılmıştır.

- Karıştırma işlemi sonunda +4°C'de, 12000 rölatif santrifüj gücü (rcf, relative centrifugal force)'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve sonunda tüplerde 3 faz oluşmuştur. En üstte kalan berrak fazda RNA, ortada kalan köpük rengindeki kısımda DNA ve en altta kalan kırmızı renkli kısımda ise protein bulunmaktadır.
- Üst berrak kısımdan yaklaşık olarak 500 µl alınıp yeni, steril bir 2 ml'lik ependorf tüpüne aktarılmıştır. Bu işlem sırasında DNA kontaminasyonunu önlemek için DNA olduğu belirtilen kısma yaklaşılmamalıdır.
- RNA'nın yer aldığı yeni ependorf tüpüne 500 µl soğuk izopropanol eklenmiş ve tüp hafifçe alt üst edilerek karıştırılmıştır. Bu karışım 5-10 dakika kadar oda ısısında bekletilmiş ve ortalama 2 dakikada bir tüp alt üste edilerek solüsyonun karışması sağlanmıştır.
- Bekleme sonunda tüp +4°C'de, 12000 rcf'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda tüpün üst kısmı (dip kısmına yaklaşılmadan) yavaşça dökmüştür. Tüpün üzerine 1 ml %75'lik soğuk etanol eklenip alt üst edilerek karıştırılmıştır. Bu aşamada RNA çıplak gözle görülebilir.
- Bu karışım +4°C'de, 6000 rcf'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonunda tüpün üst kısmı dip kısmına yaklaşılmadan yavaşça mikropipet yardımıyla atılır ve tüp laminar kabin içerisinde kurumaya bırakılır.
- Yaklaşık 10 dakika sonunda 50 µl steril, DEPC ile muamele edilmiş distile su eklenerek RNA'nın çözülmesi sağlanmıştır.
- Elde edilen 50 µl hacmindeki RNA'nın 3-5 µl kadarı başka bir temiz 200 µl'lik ependorf tüpüne aktarılmıştır. Bu işlem ana stoğun sürekli dondurma ve çözünme süreçlerine maruz kalmasını önlemek için yapılmaktadır. Ayrılan bu RNA miktarı agaroz jelde RNA kalitesinin değerlendirilmesi için kullanılır. Geri kalan RNA hemen -80°C'ye kaldırılmıştır.

RNA'nın kalitatif değerlendirilmesi:

- Elde edilen RNA'dan ayrılan 3-5 µl RNA etidyum bromür eklenmiş %1'lik agaroz jel de yürütülmüştür.

- Yürütme sonunda 28S, 18S ve 5S RNA görüntüsü net bir biçimde gözlenmiştir. Görüntüde herhangi bir RNA parçalanması gözlenmez ise bu elde edilen RNA'nın kalitesinin iyi olduğuna işaret etmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Farklı zamanlarda hücre kültüründen elde edilen RNA örneklerinin genel görüntüsü

RNA'nın kantitasyonu

- RNA miktarının ölçümü Qubit marka (Invitrogen) mini florometre ile yapılmıştır.
- RNA ölçümü için Quant-it RNA assay kiti ticari olarak satın alınmıştır ve protokolüne göre ölçüm yapılmıştır.
- Kit protokolüne göre 2 adet standart solüsyon hazırlanır. Birinde yalnızca su diğerinde ise florometrenin optimizasyonu için hazırlanmış ve kitle bereber gelen RNA kullanılmaktadır. RNA örneklerinin ölçümünde ise tampon solüsyon, boya ve RNA kullanılmaktadır. Kullanılan boyanın yalnızca RNA örneklerine bağlandığı DNA örneklerine bağlanmadığı dolayısıyla sonucun saf RNA miktarına özgül olduğu belirtilmektedir.
- Bir örnek için 500 µl'lik steril ependorf tüpünde 190 µl tampon solüsyonu ve 1 µl boya solüsyonu karıştırılır. Buna ölçümü yapılacak örnekten 1 veya 5 µl RNA eklenir, hafifçe karıştırılır. Bu arada standart 1 için 190 µl tampon solüsyonu, 1 µl boya ve 10 µl standart 1 solüsyonu karıştırılır. Standart 2 için 190 µl tampon solüsyonu, 1 µl boya ve 10 µl standart 2 solüsyonu

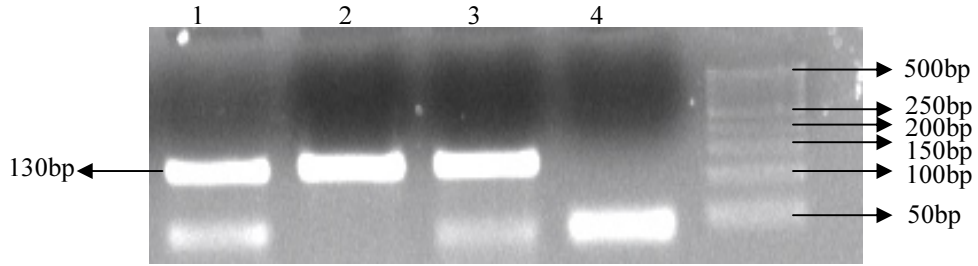
karıştırılır. Örnekler ve standartlar için karışım hazırlandıktan sonra hafif bir vorteks yapılır ve 2 dakika oda ısısında beklenir.

- Bekleme süresi sonunda Qubit marka ölçüm cihazında RNA ölçüm sekmesi açılır. Kalibrasyon için önce standart 1 sonra standart 2 ve sonrasında örnekler ölçülerek kantitasyon yapılmıştır.

2.2.5. cDNA İzolasyonu

RNA elde edilen hücrelerden gerçek zamanlı PZR'de ekspresyon analizi için kullanmak amacıyla cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bunun için Finnzymes marka F-470L cDNA sentez kiti kullanılmıştır. Bu kitin önerdiği protokol uygulanarak ortalama 100 nanogram (ng) RNA'dan cDNA elde edilmiştir.

- 200 µl'lik ependorf tüp içerisine sırasıyla steril dH₂O, hekzamer ve RNA konmuştur. Bu karışım öncü denatürasyon süreci için ısıtıcı blokta 65°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Burada sekonder yapılanma gösterebilen RNA'ların açılması kolaylaştırılmıştır.
- Bu süre sonunda hemen buza konan tüp içerisine tampon solüsyon (2X) ve M-MuLV RNase H⁺ ters transkriptaz enzimi eklenmiştir. Toplam hacim 20 µl olacak biçimde düzenleme yapılmıştır.
- Enzimi eklendikten örneğimizin bulunduğu tüp kuru ısıtıcı blokta sırasıyla 25°C'de 10 dakika, 42°C'de 60 dakika ve son olarak 85°C'de 5 dakika inkübasyona bırakılır. Bu süreç sonunda cDNA'ların elde edilip edilmediği kontrol (house-keeping) primerleriyle kontrol edilmiştir. Burada yapılan klasik PZR'de gerçek zamanlı PZR'de kullanılacak G6PD kontrol primerleri kullanılmıştır (Şekil 2.3). Elde edilen cDNA'lar gerçek zamanlı PZR'de ekspresyon analizi için kullanılmıştır.



Şekil 2.3. cDNA'nın varlığının kontrol edilmesi. Kolon:1, 2, ve 3. G6PD ürünü, Kolon 4: negatif kontrol, Kolon 5: Markır

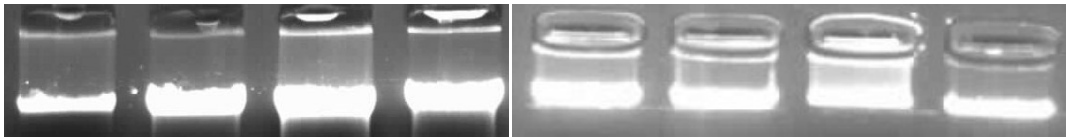
2.2.6. Kültüre Edilen Hücrelerden DNA izolasyonu

Primer kültür hücrelerinden ve hücre dizilerinden metilasyon analizi için genomik DNA elde edilmiştir. Bu amaç için kullanılan kitin ilgili protokolü aşağıdaki gibidir.

- Hücreler tripsine edilerek 15 ml'lik tüplere alınmıştır.
- Bu tüpler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atılmış ve üzerine 1,25 ml BD-1 solüsyonu eklenerek peletin pipetajla karışması sağlanmıştır.
- Bu karışım temiz, steril bir 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılmış ve 12000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak pellet üzerine 600 µl BD-3 solüsyonu eklenmiştir. BD-3 solüsyonu ile hücre karışımı birkaç kez pipetlenir ve tüp alt üst edilerek solüsyonun peletle iyice karışması sağlanır. Pipetleme sonunda tüpler 65°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.
- Bekleme sonunda tüp oda ısısına kadar soğutulup üzerine 10 µl RNase A eklenmiş ve 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda tüp 37°C'den alınarak buz içerisinde 5 dakika bekletilmiş ve sonunda 200 µl BD-4 solüsyonu eklenerek pipet yardımıyla karıştırılmıştır.
- On dakika maksimum hızda santrifüj edilen tüpün süpernatant kısmı dikkatlice toplanmış ve üzerine oda ısısındaki izopropanolden 0,6 ml eklenerek presipitasyon yapılmıştır. DNA presipite olması için tüp 40-50 defa alt üst edilerek karıştırılmıştır. Presipitasyon sonunda 10

dakika maksimum hızda santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılmış ve DNA 1 ml soğuk %70'lik etanol ile yıkanmıştır.

- Beş dakika maksimum hızda santrifüj edilen tüpün süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve elde edilen pelet kurumaya bırakılmıştır. Kurutma sonunda DNA üzerine 0,2 ml steril H₂O veya Tris EDTA (TE) buffer eklenmiştir. Tüp 65°C' de 15-30 dakika bekletilir ve inkübasyon sırasında birkaç kez alt üst edilerek karıştırılır. İnkübasyon sonunda elde edilen DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrede ölçülmüştür.
- Çözülmüş DNA örneğinden 20 µl alınıp quartz tüp içinde dH₂O ile hacmi 2 ml'ye tamamlanır, iyice karıştırılır.
- Spektrofotometrede OD260 ve OD280 değerleri ölçülür. OD260 ve OD280 değerlerinin oranı hesaplanarak DNA'nın saflığı belirlenir. 260:280 oranı DNA'nın saflığının hesaplanmasında alınan temel kriterdir.
- Aşağıdaki formül kullanılarak elde edilen DNA'nın konsantrasyonu belirlenir.
- Konsantrasyon (µg/µl) = OD260 x 0.05 x 100 (sulandırma katsayısı)
- Elde edilen DNA'nın genomik bütünlüğü %1'lik agaroz jelde yürütülerek değerlendirilmiştir.



Şekil 2.4. Farklı zamanlarda hücre kültüründen elde edilen genomik DNA örneklerinin genel görüntüsü

2.2.7. DNA Modifikasyon Protokolü

Genomik DNA'dan metilasyon analizi için öncelikle DNA'nın bisülfid modifikasyona maruz kalması gerekmektedir. Bunun için DNA'nın alkalik pH'ta hafif ısıtılarak tek zincirli formu alması sağlanmaktadır. Reaktif I, bisülfid iyonunun

sodyum tuzunu içermektedir ve kullanıldığında metile olmayan sitozin sülfonasyona uğrar ve hidrotik olarak deamine olur. Bu işlemin ardından DNA, reaktif II (bir tür tuz) varlığında reaktif III (mikropartükül taşıyıcı)'e bağlanır. Etanol (%70) varlığında mikrosantrifüj yapılarak DNA tuzdan temizlenir. Urasile dönüşüm süreci etanol (%90) kullanımı ve alkalın desülfonasyon işlemiyle tamamlanır. Mikropartiküle bağlı DNA tris EDTA solüsyonunda ısıtılarak mikropartiküllerden ayrıştırılır. DNA modifikasyonu için kullanılan kitin ilgili protokolü aşağıda özetlenmiştir.

- Bu işlemde 1,5-2 ml'lik mikrosantrifüj tüpü kullanılmıştır. 100 µl su içerisinde 1 µg DNA (10 ng/µl) olacak şekilde DNA örneğini hazırlanmıştır. Bu örnek 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılmış ve üzerine 7 µl 3 M NaOH eklenerek karıştırılmıştır.
- Bu tüp 50°C'de 10 dakika inkübe edilir.
- İnkübasyon sonrasında 550 µl taze hazırlanmış reaktif I ilave edilmiş ve karıştırılarak 50°C'de 4-16 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda önceden kullanıma hazırlanmış, iyice karıştırılmış 5 µl reaktif III, tüpte bulunan DNA solüsyonunun üzerine eklenir.
- Bunun üzerinde 750 µl reaktif II ekleyip kısa bir süre karıştırılmıştır.
- Tüp oda ısısında 5-10 dakika inkübe edilir.
- İnkübasyonun ardından 5000 rcf'te 10 saniye santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
- Tüpün üzerine 1 ml %70 Etanol eklenip vortekslenir ve 5000 rcf'te 10 saniye santrifüj yapılır.
- Santrifüj sonrası süpernatant atılır. Bu aşama 3 kez tekrarlanmıştır.
- Son 3. yıkamadan sonra süpernatant uzaklaştırılır ardından tüp 13000 rcf'te 2 dakika santrifüj edilir ve kalan süpernatant pipet yardımıyla uzaklaştırılır.
- Tüpün üzerine 50 µl 20 mM NaOH (%90 etanol içerisinde) solüsyonunu eklenir. Tüpteki pelet kısa bir vorteks yapılarak kaldırılır ve oda ısısında 5 dakika inkübe edilir.
- Süre sonunda 5000 rcf'te 10 saniye santrifüj yapılan tüpün süpernatantı pipetle atılarak üzerine 1 ml %90 etanol eklenir.
- Tüp 5000 rcf'te 10 saniye santrifüj edilir ve süpernatantı pipetle atılır.

- Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüp 13000 rcf'te 3 dakika santrifüj edilerek kalan süpernatantın hepsi uzaklaştırılır ve tüp 10-20 dakika oda ısısında kurumaya bırakılır.
- Kuruma sonrası tüp 50-60°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrasında tüp maksimumu hızda 2-3 dakika santrifüj edilir ve süpernatant pipet yardımı ile yeni bir tüpe aktarılır. Modifiye edilmiş örnek süpernatant kısmındadır.
- Modifiye DNA örneği (-15)-(-25)°C arasında 2 ay, -80°C'de 6 ay saklanabilir.

2.2.8. Metilasyon Spesifik PZR (MS-PZR)

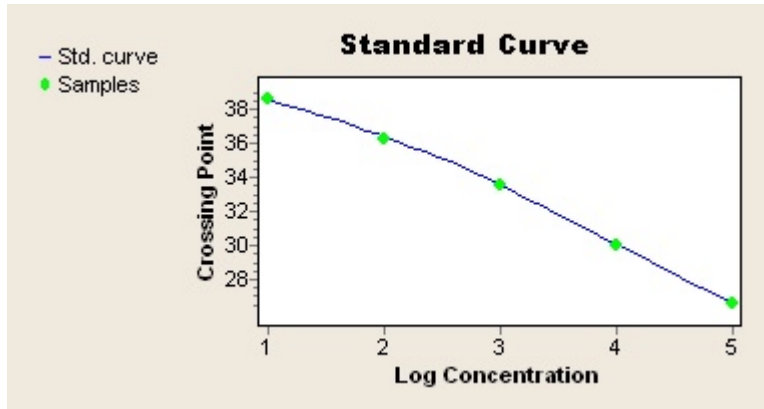
Bisülfid modifikasyona maruz bırakılan genomik DNA'larda MGMT metilasyonunun araştırılması amacıyla MS-PZR yapılmıştır. MS-PZR sonucunda elde edilen PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde (TBE tamponunda) yürütülmüştür. Metilasyon varlığı (M) 80 bp ve metilasyon yokluğu (U) 92 bp'lik ürün varlığıyla tanımlanmıştır. Her iki allelinde metilasyon bulunmama durumu UU genotip, yalnızca bir allelinde metilasyon bulunması UM (hemimetile) genotip olarak tayin edilmiştir.

Çizelge 2.2. MGMT metilasyon analizi için PZR şartları

Reaksiyon karışımı	<i>MGMT</i>	Reaksiyon Döngüsü, 1-95°C 10' denatürasyon 2-95°C 45" 3-57,8°C 45" 4-72°C 45" 5-72°C 5' 40 döngü
M ve U karışımlar ayrı ayrı hazırlanır		
Genomik DNA	3 µl	
Primerler, M veya U (10 pmol/µl)	0,4 µl	
dNTP(10 mM)	0,5 µl	
MgCl ₂ (25mM)	1,5 µl	
Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	0,2 µl	
Tampon (-MgCl ₂ , 10X)	2,5 µl	
Toplam Hacim	25 µl	

2.2.9. RT-PZR

Hücre kültüründe ilaç verildikten sonra RNA ve cDNA sentezi yapılan hücrelerdeki MGMT ve p53 genlerinin ekspresyon düzeylerini analiz etmek amacıyla RT-PZR yöntemi kullanılmıştır. PZR sonrası elde edilen sonuçlar döngü numaralarına göre ve konsantrasyonlarına göre hesaplanmıştır. RT-PZR öncesinde standart bir eğri oluşturulmuştur (Şekil 2.5). PZR'nin etkinlik değeri 1,987'dir. RT-PZR reaksiyon şartları Çizelge 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.5. RT-PZR için oluşturulan standart eğri

Çizelge 2.3. MGMT, p53 ve G6PD için RT-PZR şartları

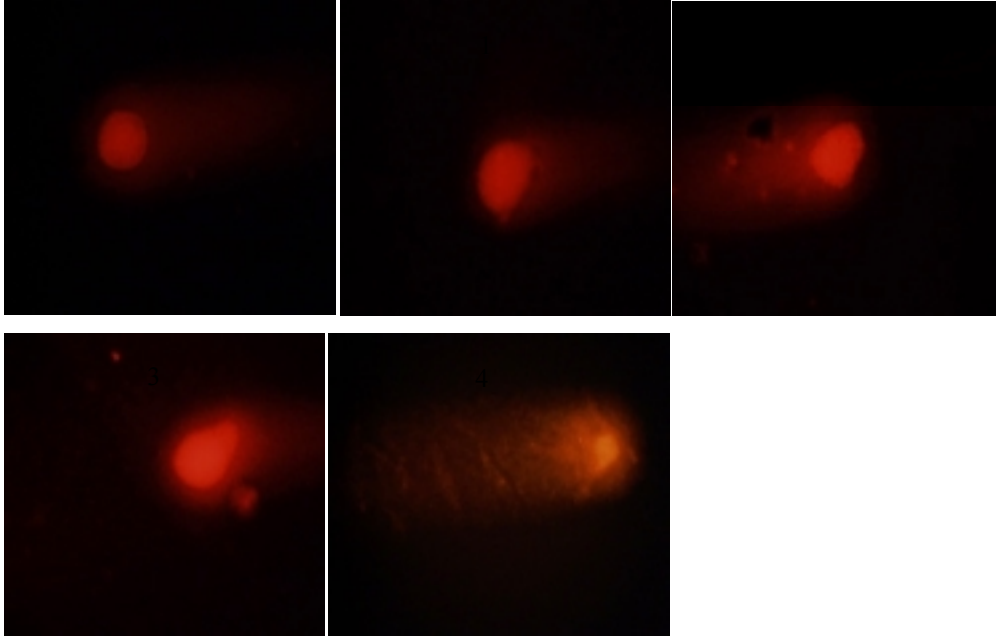
Reaksiyon karışımı	MGMT, p53 ve G6PD	Reaksiyon Döngüsü, 1-95°C 10' denatürasyon 2-95°C 10" 3-60°C 30" 4-72°C 1" 50 döngü
Reaksiyon karışımı (Tampon + dNTP + MgCl ₂ + Enzim)	10,4 µl	
Primerler F ve R	0,2 µl	
Problar (prob 23 veya 71)	0,2 µl	
Cdna	4 µl	
Toplam Hacim	20 µl	

2.2.10. Tek Hücre Jel Elektroforezi (COMET)

Hücelere ilaç verildikten sonra hücrelerde meydana gelen DNA hasarını tespit etmek için COMET (kuyruklu yıldız) testi yapılmıştır. Bu testin başlangıcında hücrelerin hazırlanması süreci hücre kültüründe diğer aşamaları ise loş bir ışıkta

moleküler laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için izlenen protokol aşağıda yer almaktadır.

- COMET yapılacak hücreler tripsine edilerek 15 ml'lik tüplere alınır. Bu tüpler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılır ve hücrelerin üzerine transfer pipeti ile 2 ml PBS eklenir.
- PBS ile karışan hücrelerin 18 µl'si 36 µl %0,75'lik düşük erime sıcaklığına sahip agaroz ile karıştırılıp oda ısısında bekleyen ve normal erime sıcaklığına sahip agaroz ile kaplı lamaların üzerine yayılarak üzerleri ince lameller ile kaplanır.
- Üzeri hücre ve agaroz karışımıyla kaplanan lamalar buz üzerine alınır ve 20 dakika donmaları beklenir. Agaroz lam üzerinde donduktan sonra lameller dikkatlice kaldırılır. Lameller kaldırıldıktan sonra lamalar daha önce hazırlanmış olan ve +4°C'de bekleyen soğuk lizing solüsyonunda 1 saat bekletilir. Bekleme sonunda bu solüsyona 14 µl (20 µg/ml) Proteinaz K eklenir 37°C'lik etüve kaldırılır. Burada da lamalar 2 saat inkübe edilir.
- İki saat sonunda lamalar soğuk TBE nötral solüsyonunda 20 dakika bekletilir ve ardından 25V'ta 20 dakika yürütülür. Yürütme işlemi süresince elektroforez tankının üstüne soğuk aküler ve buz parçaları konarak TBE solüsyonunun ısınması engellenmiştir.
- Elektroforezden alınan lamalar karanlıkta, oda ısısında kurutulduktan sonra her bir lamel 50 µl etidyum bromid (8µg/ml) ile boyanmıştır. Boyanan preparatlar floresan mikroskopta (Olympus BX51) ilgili filterde incelenmiştir. Her bir hücre DNA görüntüsü kuyruk uzunluğu ve kafa bölgesine göre değerlendirilmiş ve hasar miktarına göre 0 (hasarsız), 1 (az hasarlı), 2 (hasarlı), 3 (orta hasarlı), 4 (çok hasarlı) olarak kategorize edilmiştir (Şekil 2.6). Her bir preparat için 250 hücre sayılmıştır.



Şekil 2.6. DNA hasarının COMET ile gösterimi. Hasar değerlendirilmesi, yukarı soldan sağa doğru 0: Hasarsız, 1: Az hasarlı, 2: Orta hasarlı, aşağı soldan sağa 3: Hasarlı, 4: Çok hasarlı.

2.2.11. Agaroz Jel Elektroföresi

MS-PZR sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesinde , cDNA'nın varlığının saptanmasında, DNA ve RNA izolasyonu sonucunda görüntülenmesinde agaroz jel elektroföresi kullanılmıştır. MS-PZR ve cDNA ürün varlığının saptanmasında için %2'lik, DNA ve RNA izolasyon ürünlerinin görüntülenmesinde %1'lik agaroz jel kullanılmıştır.

2.2.12. Akım Sitometrisi

Akım sitometrisinde ilaç verilen hücrelerin hücre döngü düzeyleri ve apoptoz durumları incelenmiştir. Bunun için aşağıdaki protokol izlenmiştir.

- Hücre kültüründe ilaç verilip 48 saat beklenen hücreler tripsine edilir. Tripsine edilen hücreler 15 ml'lik tüplere aktarılır ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.

- Santrifüj sonrası üst kısım atılır ve hücrelerin üzerine 3 ml PBS eklenerek tekrar 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
- Santrifüj sonrası üst süpernatant kısım atılır ve tekrar aynı şekilde PBS'ile yıkama işlemi yapılır.
- İkinci yıkama sonunda hücrelerin üzerine 2 ml PBS eklenir.
- Fiksasyon için vorteks üzerinde alınan tüplerin üzerine toplamda 2 ml soğuk %99'luk alkol hafif vorteks altında damla damla bırakılır.
- Fiksasyon işleminin ardından ortamdaki alkolü uzaklaştırmak için 2 ml daha PBS ilave edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant atıldıktan sonra hücrelerin üzerine 70 µl RNase ve 50 µl Propidium Iodide eklendi, karıştırıldıktan sonra 20 dakika oda ısısında karanlıta inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda hücreler 37 µm'lik nylon mesh'den süzüldü ve akım sitometri cihazında (EPICS XL MCL, Beckman Coulter) 10000 hücre sayılarak hücre döngüsü ve DNA analizi yapıldı.
- G₀/G₁, sentez ve G₂/M fazındaki hücrelerin oranı ile apoptotik hücre oranı iki değişkenli DNA histogramları MCYCLE (Phonex Sys) programı kullanılarak analiz edilmiştir.

2.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistiksel analizler için SPSS 11.5 programı kullanılmıştır. Ölçümle elde edilen değişkenler bakımından bağımsız iki grubun karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi, ikiden fazla grubun karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis varyans analizi kullanılmıştır. Kategorik değişkenler bakımından ilişki ya da gruplar arası farklılık incelemesinde ki-kare testi uygulanmıştır. Tanımlayıcı istatistik olarak nitel değişkenlerde oran, nicel değişkenlerde ise ortanca (minimum-maksimum) verilmiştir. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Primer Hücre Kültüründen Glia Kökenli Hücrelerin Elde Edilmesi

Tez çalışmamız, Ankara 1 no'lu Etik Kurulu'ndan 12/08/2009 tarihinde alınan kurul onayından (karar no:2009/08-3) sonra başlamıştır. Bu tez çalışmasının hasta grubunu klinik ön değerlendirme sonucu GBM şüphesi taşıyan ve bu nedenle ameliyat edilen bireyler oluşturmaktadır. Ameliyat öncesinde, hastalığının ön tanısı hakkında bilgi sahibi olan bireylere çalışma hakkında bilgi verilmiş ve çalışmaya katılmayı kabul eden gönüllü hastalardan ameliyat sırasında doku örneği alınmıştır. Bu kapsamda, 64 hastadan doku örneği alınmış ve bunlardan primer kültür elde edilmeye çalışılmıştır. Ameliyat sonrasında, bu 64 hastadan 36'sının Ankara Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından GBM hastası olduğu rapor edilmiştir. Tümör dokusundan primer kültür süreci başlatılmış ancak GBM hastası olmayan hastalara ait hücre örnekleri çalışmadan çıkartılmıştır. Bir hasta örneğine ait primer kültür hücresinin bu tez kapsamında değerlendirilebilmesi için ortalama sayısının 5. pasaja kadar 6 750 000'e ulaşması gerekmektedir. Planlanan test başına bu hücre popülasyonunun dağılımı ise MTT analizi için 750 000, immünohistokimya için 60 000, RNA izolasyonu için 2 000 000, metilasyon analizi için 2 000 000, akım sitometrisi için 2 000 000 hücre şeklindedir. Tez kapsamında primer kültürü yapılan 36 GBM hastasının 10'unda yapılacak analizler için yeterli sayıya ulaşılmıştır. Hastalarımızın ortalama yaşı $52,7 \pm 12,1$ 'dir ve 6'sı kadın 4'ü erkektir. Hastalarımıza ait genel bilgiler **Çizelge 3.1**'de verilmiştir.

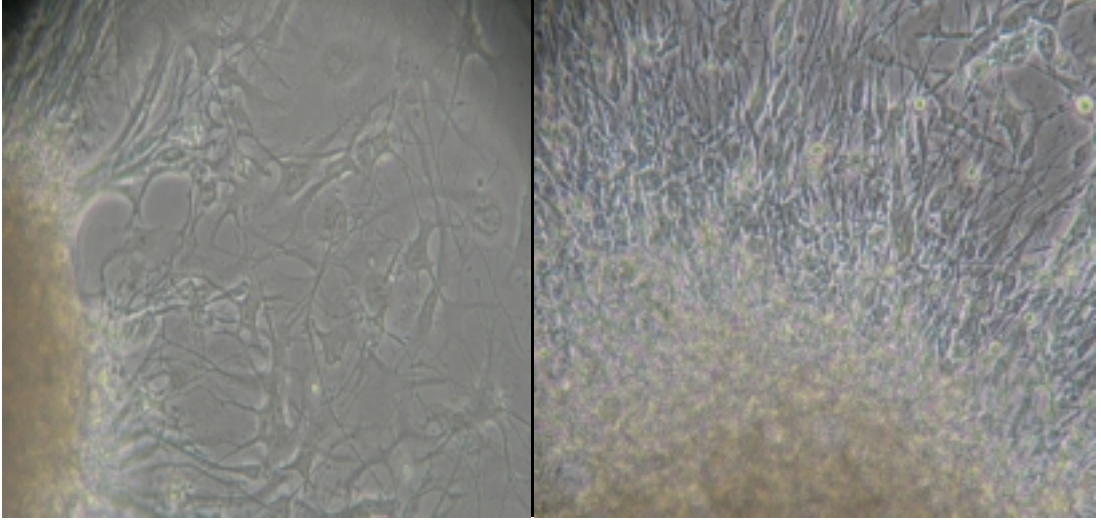
Primer hücre kültürlerinin elde edilme süreleri her hastada farklılık göstermiştir. Doku örneklerinin flaska yerleştirilmesini takiben, doku parçalarının yapışması ve kenar bölgelerinden hücrelerin çoğaldığının gözlenmesi ortalama 6-10 gündür. Çoğalan hücrelerin 25 cm²'lik flask içerisinde %60-70 yoğunluğa ulaşma süresi ortalama 15-30 gündür. Bu aşamadan sonra pasaj yapılmaya başlanmış ve her pasajdaki hücreler azot tankına kaldırılmıştır. Bazı hasta örneklerinde 2-3 bazı örneklerde ise 4 veya 5 pasaja kadar hücre çoğaltılabilmektedir. Ancak bazı hasta

örneklerinde ise 10. pasaj yapıldığında bile aktif olarak çoğalan hücre kültürleri elde edilmiştir. Hücre örneklerimizden 5.pasaja kadar tez için yeterli sayıya ulaşamayanlar çalışmadan çıkartılmıştır. Tez kapsamında yapılan tüm testler 5.pasaj ve altındaki hücrelerden yapılmıştır. GBM doku örneklerinden çoğalan hücre görüntüleri aşağıda verilmiştir.

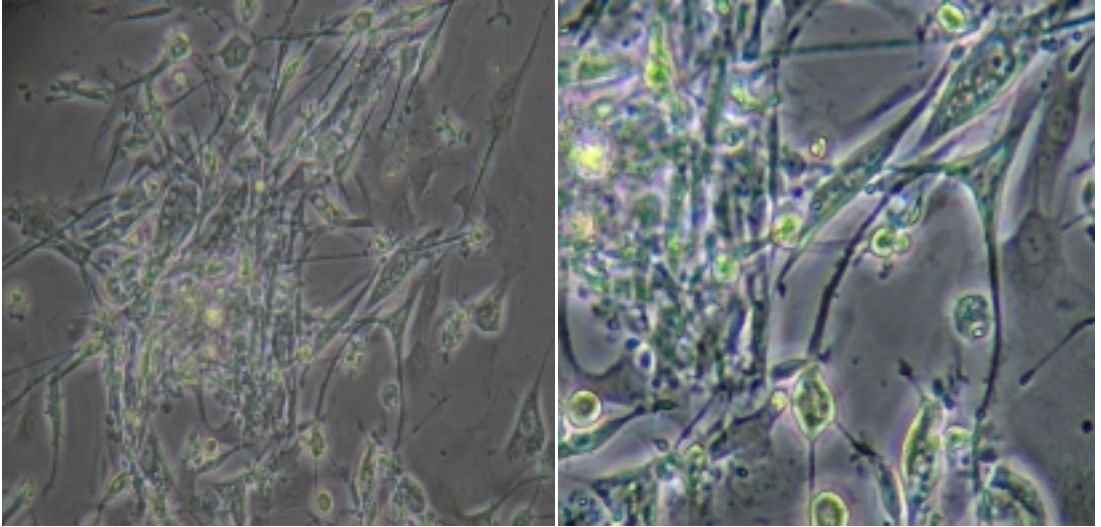
Çizelge 3.1. Primer kültür yapılan hastalara ait genel bilgiler

Hasta Adı	Tanı Tarihi	Yaş	Cinsiyet	Boy/Kilo	Cerrahi Tipi	Derece	Kemoterapötik İlaç*	Kür sayısı	Doz (mg)	Yaşam Evet/Hayır	Hayatta kalma süresi* *
FS	23/06/2009	59	K	157/61	Total	IV	TMZ	6	250-350	Hayır	7 ay
SÇ	30/07/2009	62	E	173/70	Total	IV	İlk 6 ayTMZ, sonrasında TMZ+Avastin	6	150-400	Evet	
ST	09/05/2009	61	E	170/68	Total	IV	TMZ	5	120	Hayır	14 ay
AK	03/07/2009	60	K	152/65	Total	IV	TMZ	2	120	Hayır	4 ay
SD	19/02/2009	25	E	167/75	Total	IV	TMZ			Evet	
NB	02/07/2009	53	K	157/60	Total	IV	TMZ	5	120	Evet	
EK	12/03/2009	57	K	155/83	Total	IV	TMZ	8	100	Hayır	14 ay
HA	27/04/2009	60	K	165/62	Subtotal	IV	-----			Hayır	0 ay
BY	08/06/2010	53	E	176/90	Total	IV	TMZ	4	310-350	Evet	
HK	05/11/2009	37	K	167/54	Total	IV	-----			Evet	

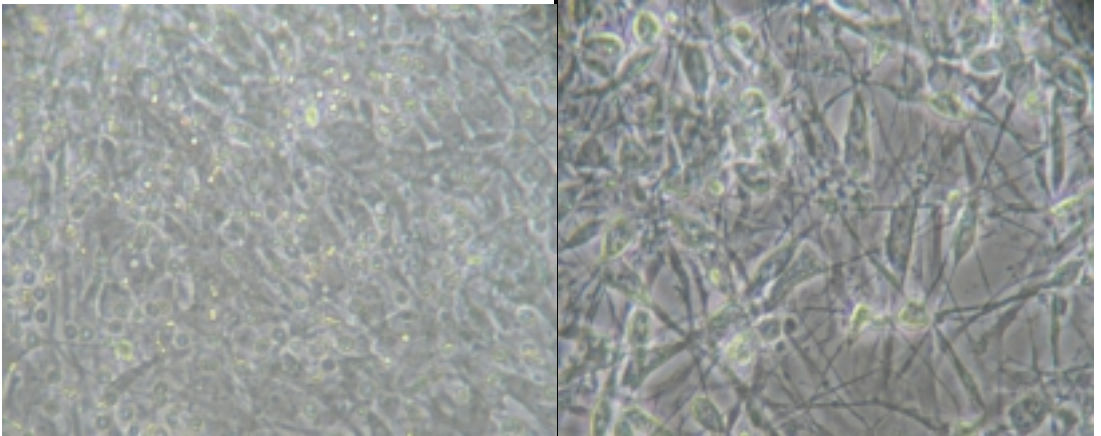
* Tedavi başlangıç tarihinden itibaren



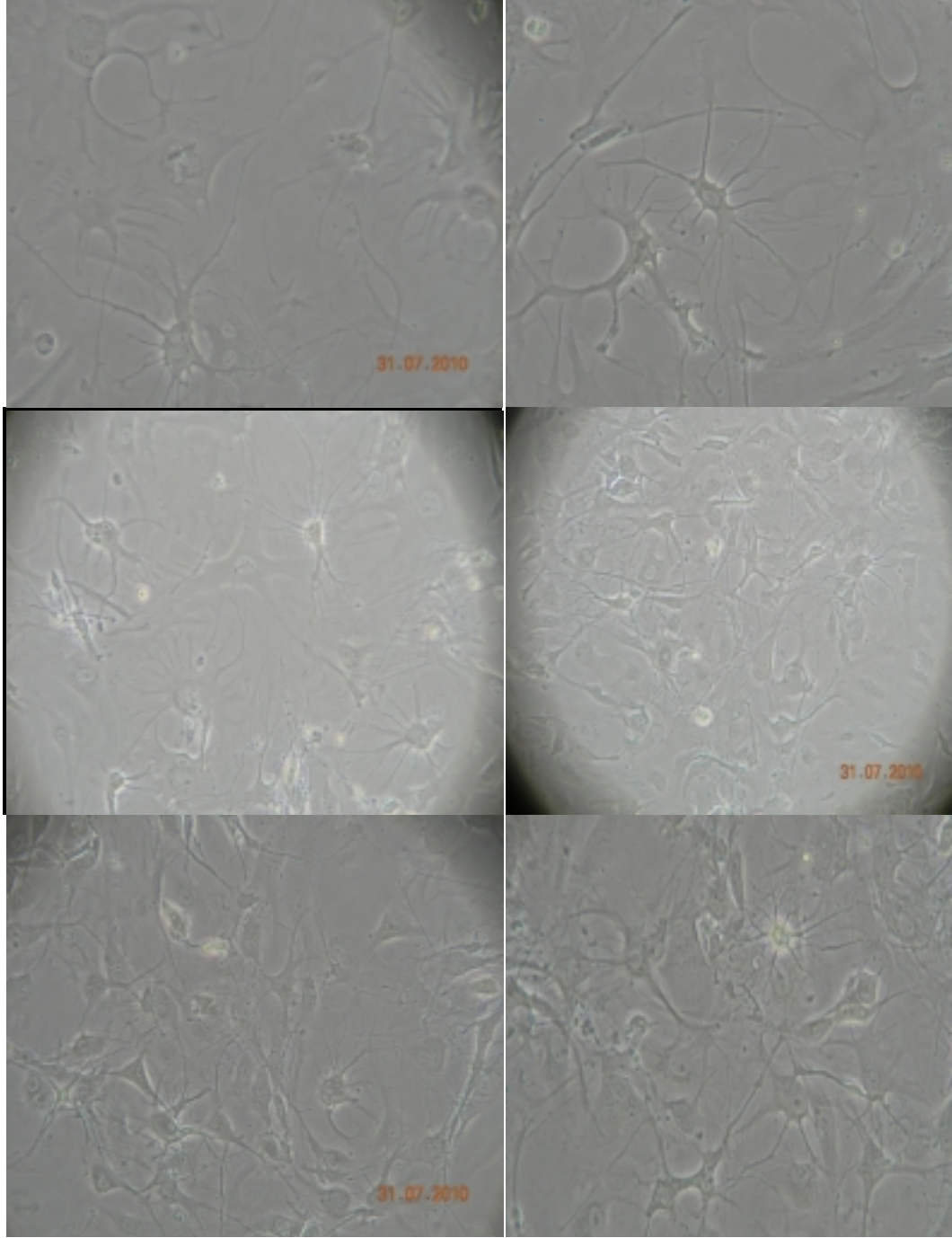
Şekil 3.1. Tümör dokusundan çoğalan hücrelerin görüntüleri



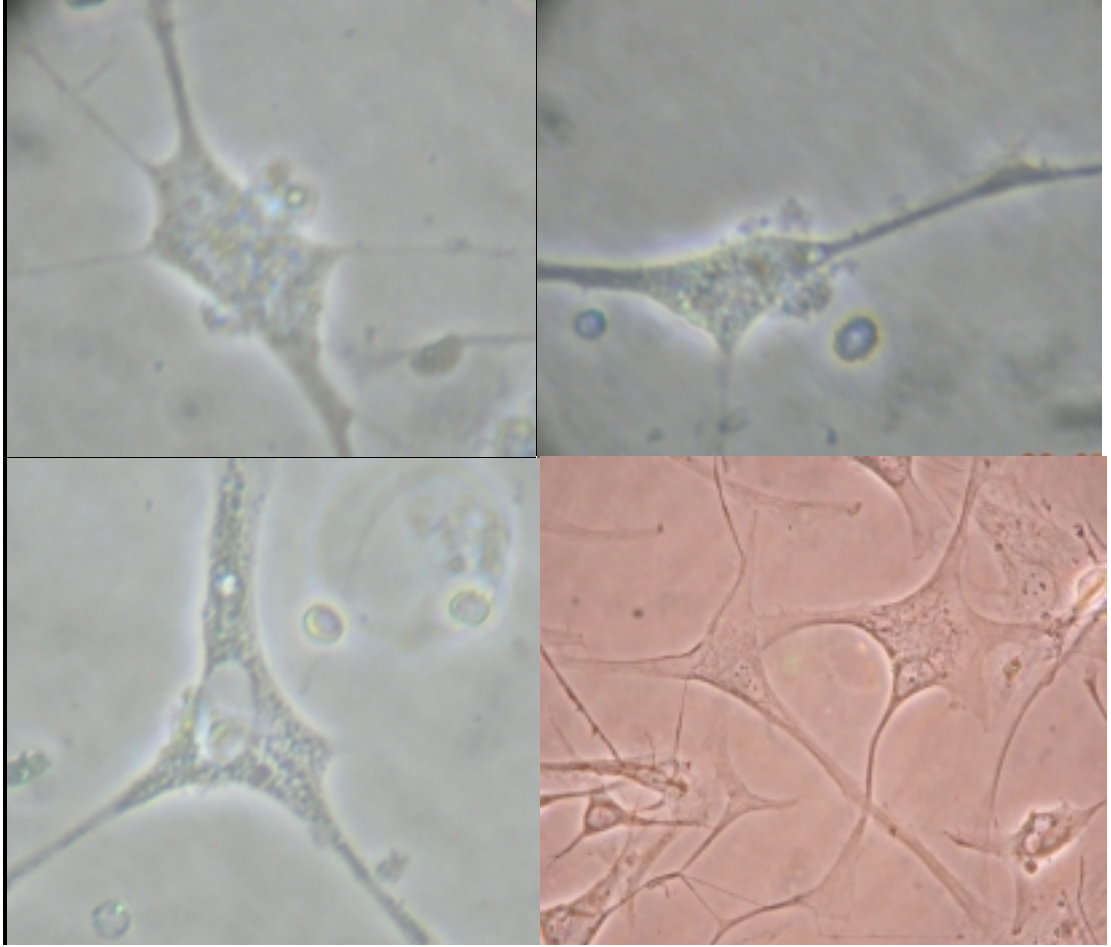
Şekil 3.2. Tümör dokusundan elde edilen hücre topluluğuna ait bir görüntü



Şekil 3.3. Kültür hücrelerinin çoğalmasıyla oluşan yoğun hücre popülasyonuna ait örnek görüntüler



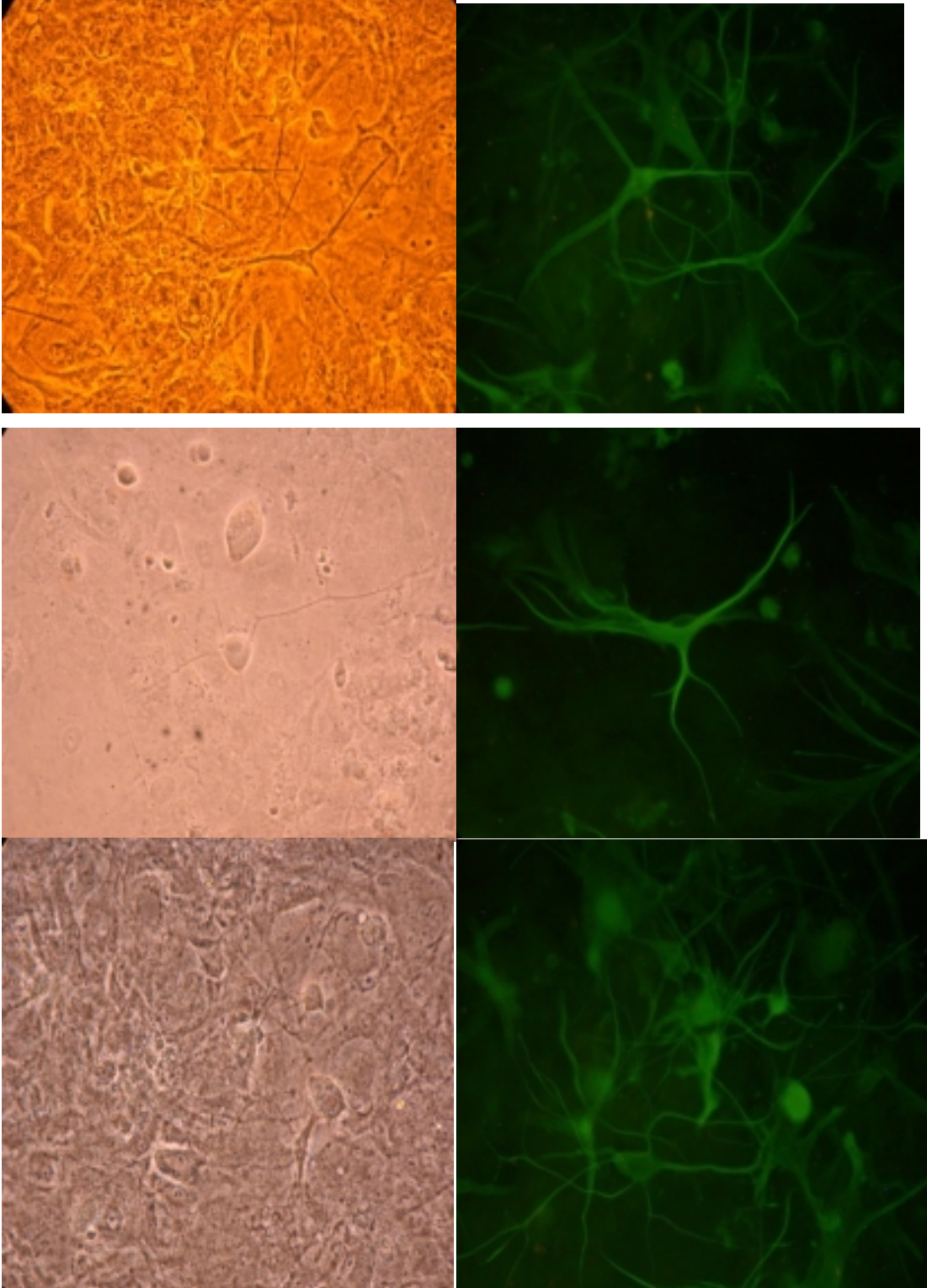
Şekil 3.4. Primer kültürde birbirlerinden farklı tümör dokularından elde edilen astrositlerin görüntüsü-
1



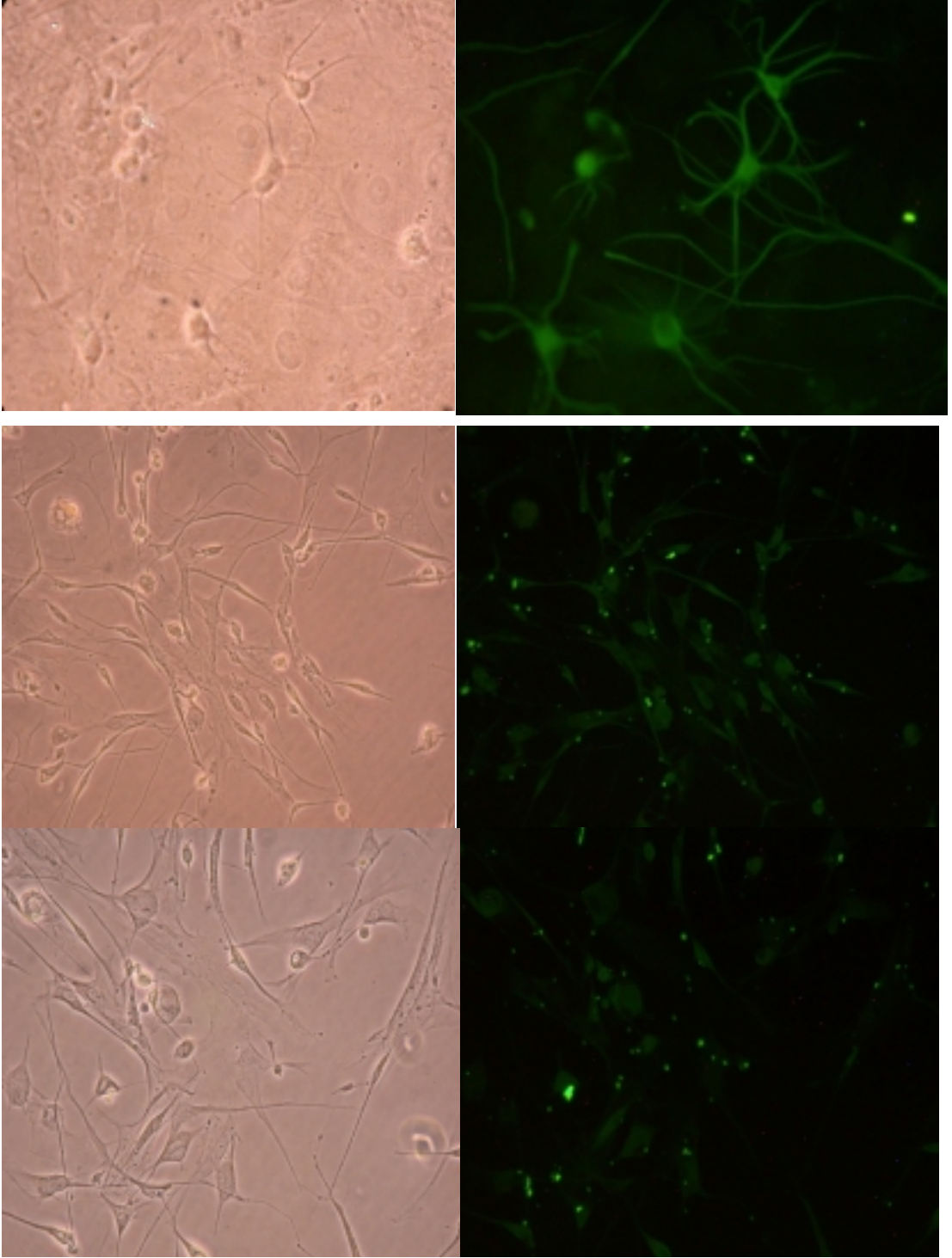
Şekil 3.5. Primer kültürde birbirlerinden farklı tümör dokularından elde edilen astrositlerin görüntüsü-
2

3.2. Primer kültür hücrelerinde GFAP ekspresyonu yapan hücrelerin saptanması

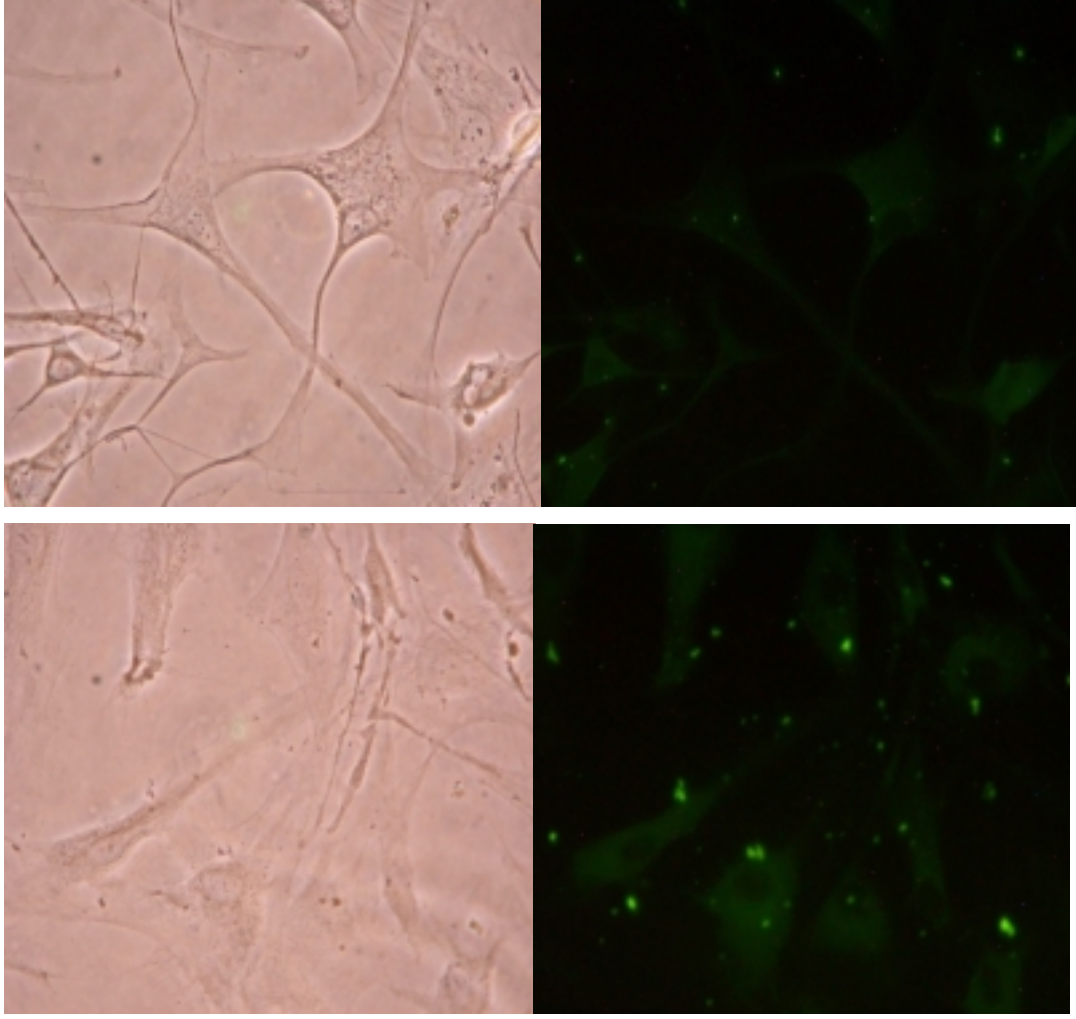
GFAP, glia kökenli hücelere spesifik, sitoplazmik bir proteindir. İmmün boyama yöntemiyle GFAP ekspresyonunun gösterilmesi glia kökenli hücrelerin tanımlanmasında altın standart yöntemdir. Bu nedenle primer kültür çalışmalarımızda immünohistokimya ile GFAP ekspresyonunun varlığı gösterilmiştir. GFAP görüntülenmesine ilişkin normal ve FITC filtre ile filtre edilerek elde edilmiş renkli görüntüler yan yana aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.6. Glia kökenli hücrelerin GFAP ile gösterimi-1 (sol normal sağ aynı hücrenin GFAP ile boyanmış görüntüsü)



Şekil 3.7. Glia kökenli hücrelerin GFAP ile gösterimi-2 (sol normal sağ aynı hücrenin GFAP ile boyanmış görüntüsü)

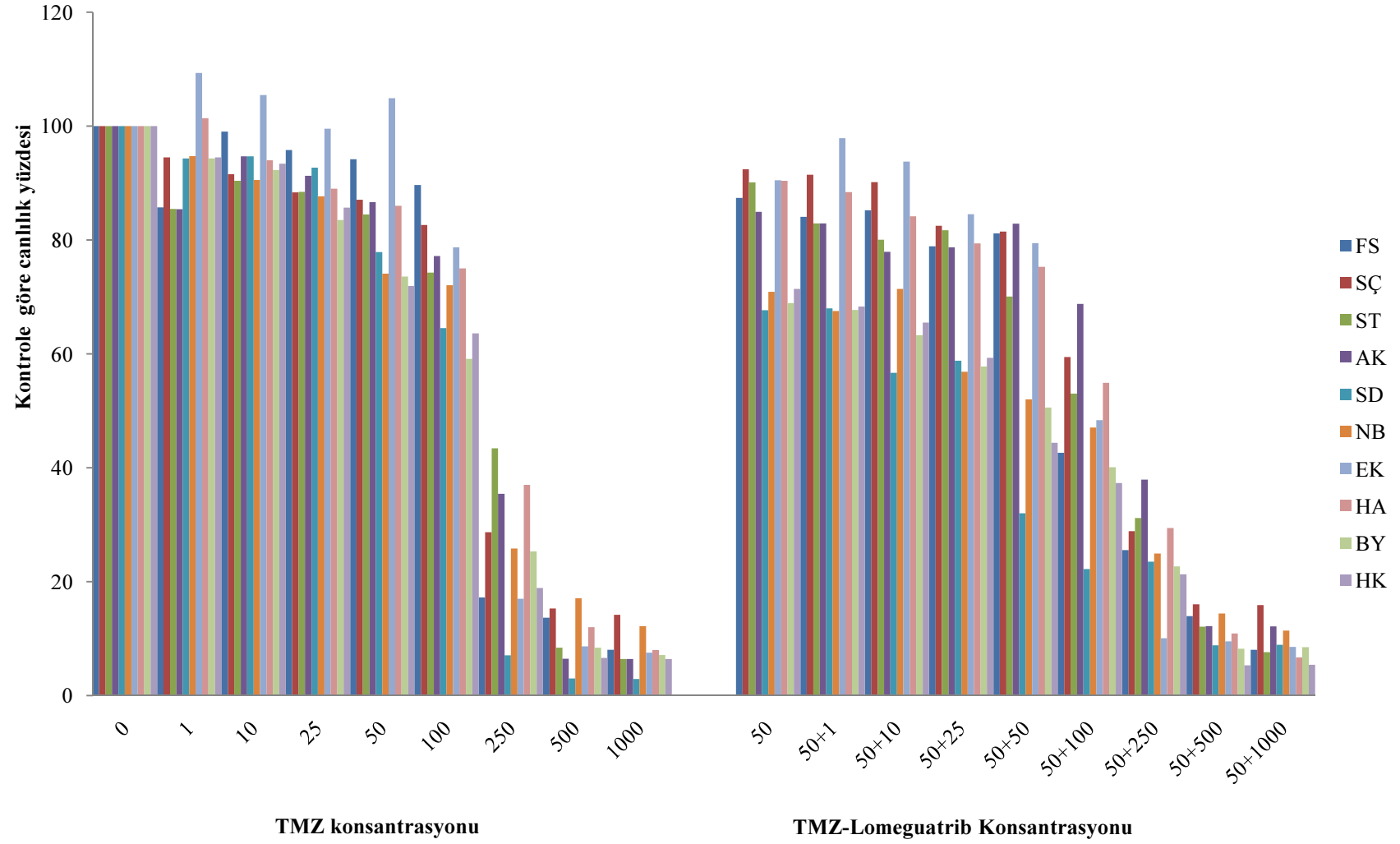


Şekil 3.8. Glia kökenli hücrelerin GFAP ile gösterimi-3 (sol normal sağ aynı hücrenin GFAP ile boyanmış görüntüsü)

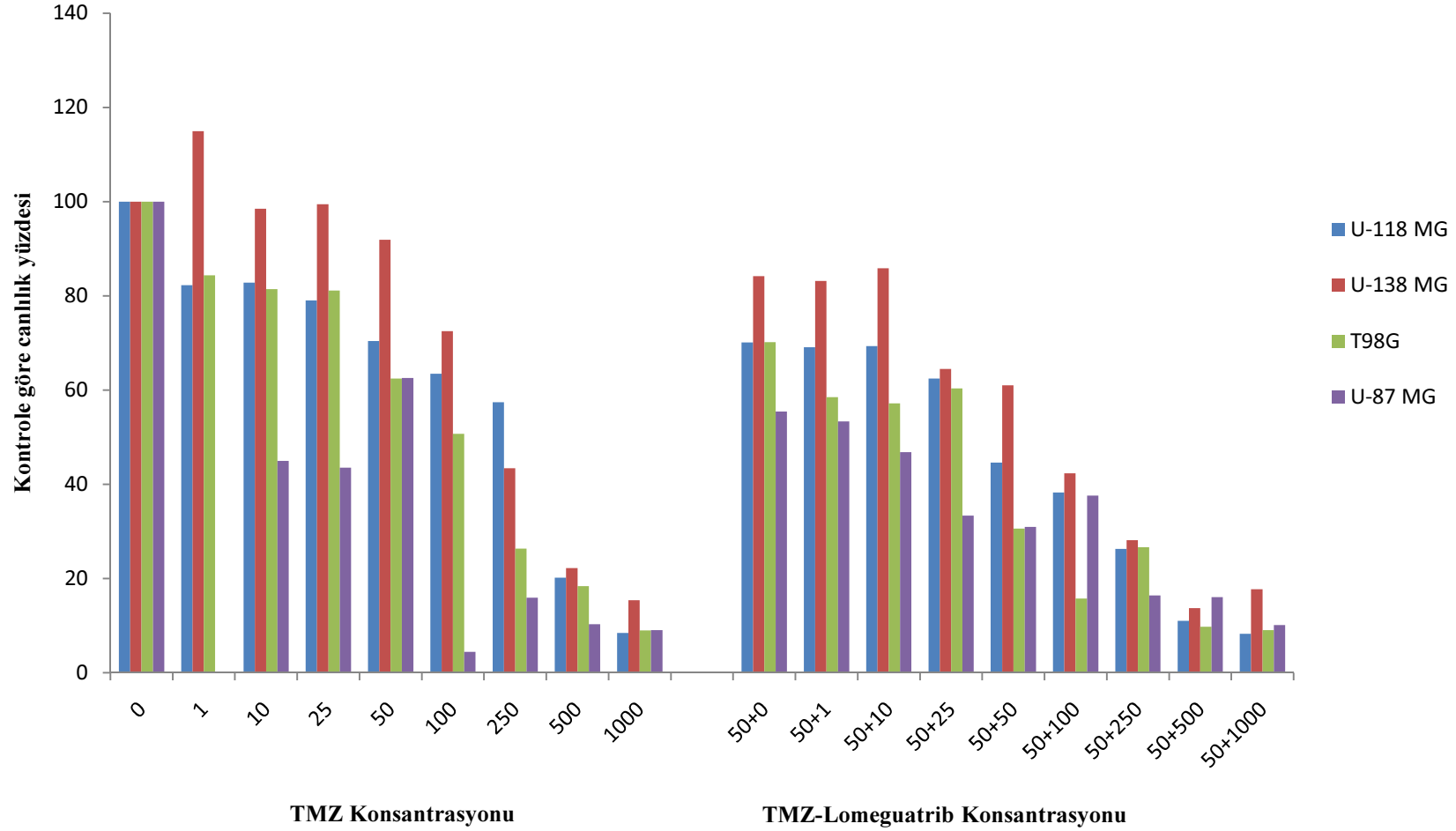
3.3. MTT ile Sitotoksosite Analizi

Lomeguatrib ve TMZ'nin hücreler üzerindeki sitotoksosite düzeylerini saptamak amacıyla yapılan MTT testi sonucunda, primer kültür hücrelerinin ve hücre dizilerinin TMZ ve TMZ + Lomeguatrib kombinasyonuna duyarlılıklarının farklı olduğu saptanmıştır. İlaç uygulaması sonrasında hücrelerin kontrole göre canlılık durumları aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir. Primer kültür hücrelerinde ve hücre dizilerinde TMZ ve TMZ + Lomeguatrib kombinasyonu için elde edilen farklı IC_{50} değerlerinin dağılımına ilişkin istatistiksel analiz **Çizelge 3.4**'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Primer kültür hücrelerinin TMZ ve TMZ+ Lomeguatrip kombinasyonu sonrasında kontrole göre canlılık düzeyleri



Çizelge 3.3. Hücre dizilerinin TMZ ve TMZ + Lomeguatrib kombinasyonu sonrasında kontrole göre canlılık düzeyleri



Çizelge 3.4. Primer kültür hücrelerinde ve hücre dizilerinde TMZ ve TMZ + Lomeguatrib kombinasyonu için elde edilen IC₅₀ değerlerinin dağılımı

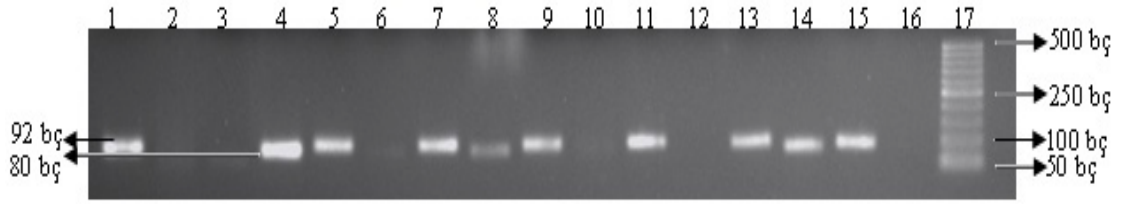
Gruplar	TMZ	TMZ + 50 µM Lomeguatrib
Primer Kültür	147,26±80,34	80,345±40,32
Hücre dizileri	175,1±22,56	30,14±22,56
Primer Kültür + Hücre dizileri	155,21±57,07	68,57±40,20

3.4. MS-PZR

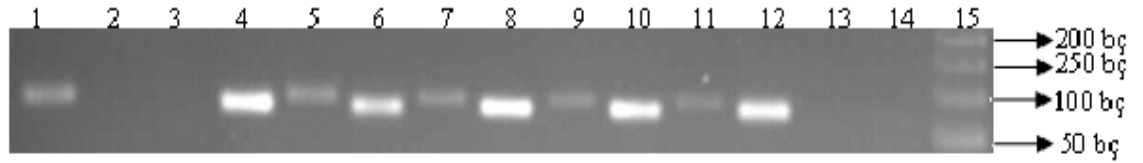
Primer kültürde glia hücresi izole edildikten sonra tüm analizlerin yapılabildiği 10 hastanın 6'sında MGMT geni UU (%60) olarak saptanırken diğer 4'ünde UM (%40) olarak saptanmıştır (Şekil 3.9). Ayrıca bu tez çalışmasında kullanılan 4 adet GBM hücre dizisinin MGMT geni U-118 MG'de UU, U-138 MG'de UM, T98G'de UM ve U-87 MG'de MM olarak saptanmıştır (**Çizelge 3.5**). Ayrıca, primer kültür hücrelerinde ve hücre dizilerinde Lomeguatrib ve TMZ uygulandıktan sonra MGMT metilasyon analizi yapılarak MGMT metilasyon yapılarının değişip değişmediğine bakılmıştır. Bu analizde hücrelerin metilasyon yapılarının değişmediği, ilgili ilaçların yalnız başlarına veya birlikte kullanımının MGMT metilasyon yapısına her hangi bir etkilerinin olmadığı saptanmıştır. Bu analizlere ait görüntüler aşağıda verilmiştir.

Çizelge 3.5. Primer kültür yapılan hastaların ve hücre dizilerinin MGMT metilasyon yapıları

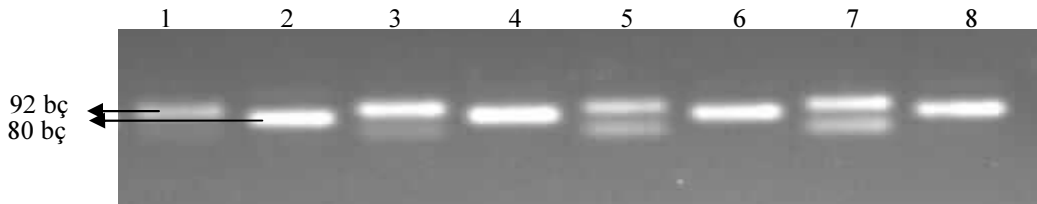
MGMT Metilasyon Genotipi	Hasta	Hücre Dizisi
UU	FS, SÇ, ST, AK, EK, HA	U-118 MG
UM	SD, NB, BY, HK	U-138 MG, T98G
MM		U-87 MG



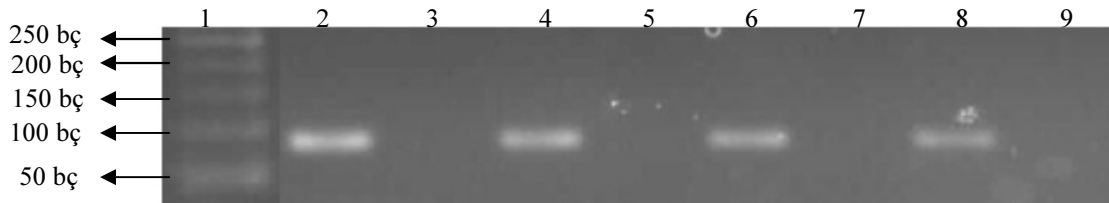
Şekil 3.9. MGMT metilasyonunun agaroz jeldeki görüntüsü. Kolon 1: U kontrol U primer, 2: U kontrol M primer, 3: M kontrol U primer 4: M kontrol M primer 5: FS U primer, 6: FS M primer, 7: BY U primer, 8: BY M primer, 9: SÇ U primer, 10: SÇ U M primer, 11: ST U primer, 12: ST M primer 13: NB U primer, 14: NB M primer, 15: HA U primer, 16: HA M primer, 17: Markır (50 bç'lik).



Şekil 3.10. Lomeguatrib ve TMZ sonrası MGMT metilasyon analizinin (U-138 MG için) jeldeki görüntüsü. Kolon 1: U kontrol U primer, 2: U kontrol M primer, 3: M kontrol U primer 4: M kontrol M primer, 5: U-118 MG Kontrol U primer, 6: U-118 MG Kontrol M primer, 7: U-118 MG TMZ U primer, 8: U-118 MG TMZ M primer, 9: U-118 MG Lomeguatrib U primer, 10: U-118 MG Lomeguatrib M primer, 11: U-118 MG Lomeguatrib + TMZ U primer, 12: U-118 MG Lomeguatrib + TMZ M primer, 13: U primer negatif kontrol, 14: M primer negatif kontrol, 15: Markır (50 bç'lik)



Şekil 3.11. Lomeguatrib ve TMZ sonrası MGMT metilasyon analizinin (T98G için) jeldeki görüntüsü. Kolon 1: T98G Kontrol U primer, 2: T98G Kontrol M primer, 3: T98G TMZ U primer, 4: T98G TMZ M primer, 5: T98G Lomeguatrib U primer, 6: T98G Lomeguatrib M primer, 7: T98G Lomeguatrib + TMZ U primer, 8: Lomeguatrib + TMZ M primer.



Şekil 3.12. Lomeguatrib ve TMZ sonrası MGMT metilasyon analizinin (SÇ için) jeldeki görüntüsü. Kolon 1: Markır (50 bç'lik), 2: SÇ Kontrol U primer, 3: SÇ Kontrol M primer, 4: SÇ TMZ U primer, 5: SÇ TMZ M primer, 6: SÇ Lomeguatrib U primer, 7: SÇ Lomeguatrib M primer, 8: SÇ Lomeguatrib + TMZ U primer, 9: SÇ Lomeguatrib + TMZ M primer.

3.5. MTT IC₅₀ Değerleri ve Metilasyon Yapıları Arasındaki İlişki

MTT ile elde edilen sonuçlar ile primer kültür ve hücre dizilerinin metilasyon yapıları arasındaki ilişki incelendiğinde MGMT geni UU olarak saptanan primer kültür ve hücre dizilerinde ortalama sitotoksik değerin (170,2) MGMT geni UM olarak saptananlara göre (112,3) daha yüksek olduğu saptanmıştır (p=0,032). Benzer bir durum TMZ'nin Lomeguatrib ile kombine verilmesinde de saptanmıştır. MGMT metilasyonu UU olanlarda Lomeguatrib'le kullanılan ortalama TMZ dozu (99,9), UM olanlara göre (38,3) daha yüksektir (p=0,07). Bu sonuçlara ilişkin veriler **Çizelge 3.6**'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. MGMT metilasyon yapılarına göre MTT değerlerinin karşılaştırılması

Primer kültür ve hücre dizileri	UU (n=7)	UM (n=6)	P
TMZ	170,2 (161,2-281,6)	112,3 (103,9-240)	0,032*
Lomeguatrib +TMZ	99,9 (50,0-141,5)	38,3 (23,9-65,0)	0,007*
Primer kültür	UU (n=6)	UM (n=4)	P
TMZ	169,7 (161,2-175,5)	106,5 (103,9-138,5)	0,011*
Lomeguatrib +TMZ	101,4 (90,6-141,5)	38,3 (23,9-50,1)	0,011*

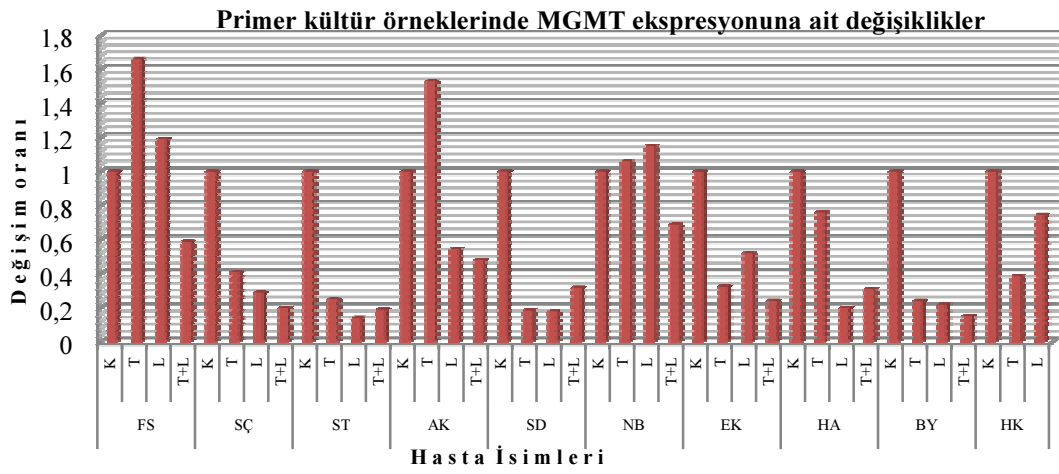
3.6. MGMT ve p53 Ekspresyon Analizi

Primer kültür hücrelerine ve hücre dizilerine ilaç verildikten sonra elde edilen cDNA'larda MGMT ve p53 ekspresyonlarındaki değişiklikler araştırılmıştır. İlaç verilen gruplar ile kontrol grubu arasındaki ekspresyon değişikliğinin ve değişim oranlarının gösterildiği çizelgeler (**Çizelge 3.7; Çizelge 3.8; Çizelge 3.10; Çizelge 3.11**) aşağıda verilmiştir. Çizelgelerde yer alan K harfi "kontrol"ü, T harfi "TMZ"yi, L harfi "Lomeguatrib"i, T+L harfleri "Temozolomid ve Lomeguatrib" kombinasyonunu ifade etmektedir.

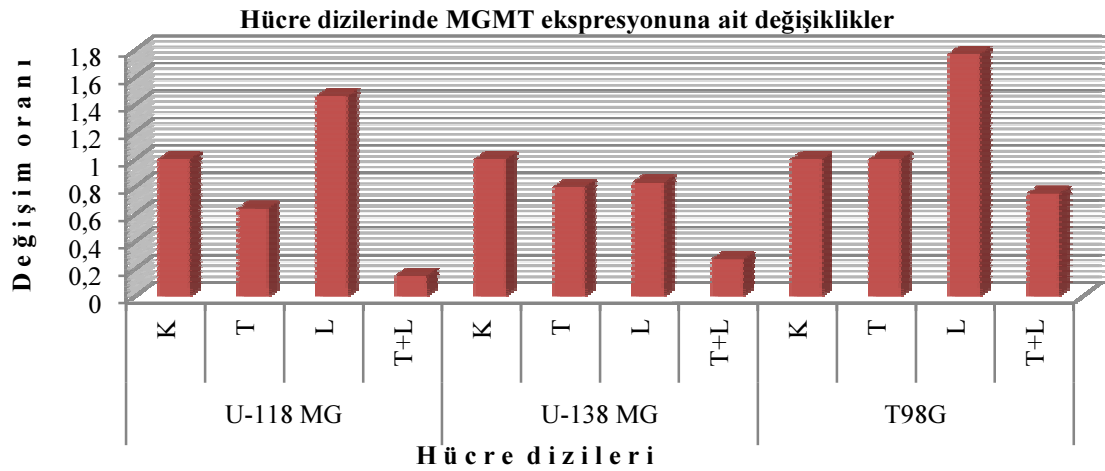
İstatistiksel analizde, tüm örneklerin (primer kültür ve hücre dizileri) K, T, L ve T+L grupları birlikte değerlendirildiğinde, K'ya göre L'de, K'ya göre T'de, K'ya göre T+L'de, L'ye göre T+L'de, T'ye göre T+L'de MGMT ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır (p<0,05). MGMT ekspresyon değişikliği, örneklerin MGMT geninin UU veya UM olması durumuna

göre değerlendirildiğinde ise, UU olan grupta K'ya göre L'de, K'ya göre T+L'de ve T'ye göre T+L'de istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Ancak MGMT geni UM olan grupta MGMT ekspresyon değişikliği açısından K, T, L ve K+L grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (**Çizelge 3.9**).

Çizelge 3.7. Primer kültür hücrelerinde ilaç uygulaması sonrasında MGMT ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler



Çizelge 3.8. Hücre dizilerinde ilaç uygulaması sonrasında MGMT ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler



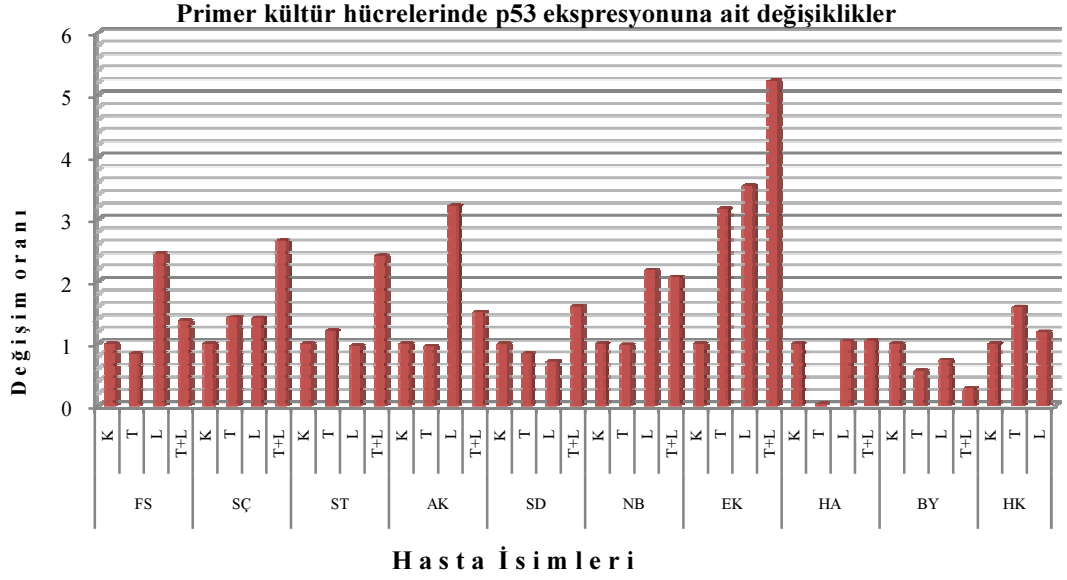
Çizelge 3.9. Gruplar arasında MGMT ekspresyonuna ait değişikliklerin istatistiksel değerlendirilmesi

MGMT Ekspresyonu	Gruplar		Karşılaştırma	p
Primer kültür ve hücre dizileri (N=51)	K (n=13)	1 (1-1)	K-L	<0,05
	L (n=13)	0,54 (0,14-1,77)	K-T	<0,05
	T (n=13)	0,64 (0,19-1,66)	K-T+L	<0,05
	T+L (n=12)	0,29 (0,14-1,77)	L-T	>0,05
			L-T+L	<0,05
			T-T+L	<0,05
MGMT geni UU olan primer kültür ve hücre dizileri (N=28)	K (n=7)	1 (1-1)	K-L	<0,05
	L (n=7)	0,52 (0,14-1,46)	K-T	>0,05
	T (n=7)	0,64 (0,25-1,66)	K-T+L	<0,05
	T+L (n=7)	0,24 (0,15-0,59)	L-T	>0,05
			L-T+L	>0,05
			T-T+L	<0,05
MGMT geni UM olan primer kültür ve hücre dizileri (N=23)	K (n=6)	1 (1-1)	K-L	>0,05
	L (n=6)	0,79 (0,18-1,77)	K-T	>0,05
	T (n=6)	0,59 (0,19-1,06)	K-T+L	>0,05
	T+L (n=5)	0,32 (0,15-0,75)	L-T	>0,05
			L-T+L	>0,05
			T-T+L	>0,05

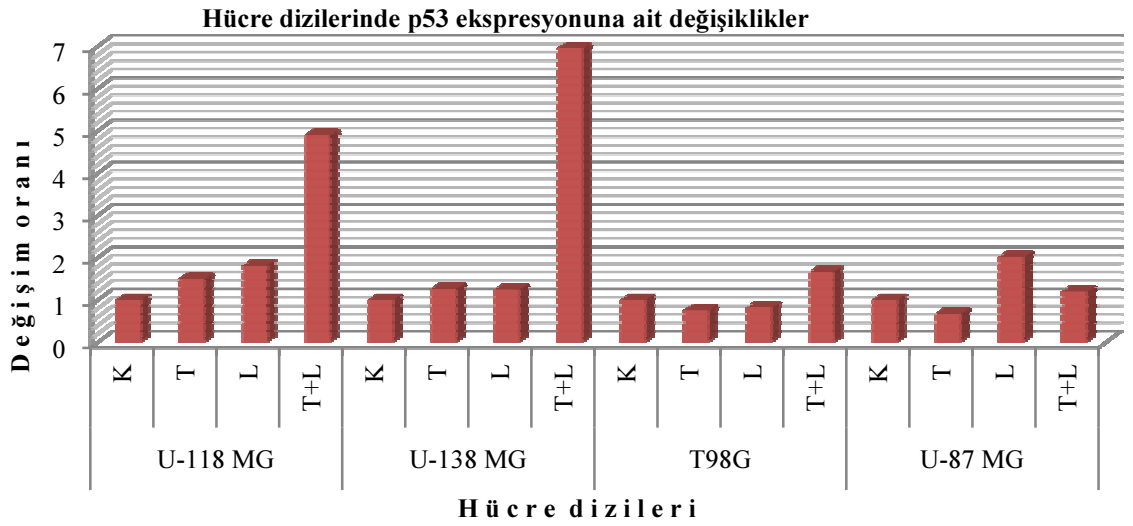
İlaç uygulaması sonrasında, primer kültür ve hücre dizilerinin p53 ekspresyonlarındaki değişiklikler analiz edildiğinde, K'ya göre L'de, K'ya göre T+L'de, L'ye göre T'de ve T'ye göre T+L'de p53 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). P53 ekspresyonu, örneklerin MGMT geninin UU veya UM olması durumuna göre değerlendirildiğinde ise, UU olan grupta K'ya göre L'de, K'ya göre T+L'de ve T'ye göre T+L'de p53 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

Ancak MGMT geni UM olan grupta p53 ekspresyon değişikliği açısından K, T, L ve K+L grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (**izelge 3.12**).

Çizelge 3.10. Primer kültür hücrelerinde ilaç uygulaması sonrasında p53 ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler



Çizelge 3.11. Hücre dizilerinde ilaç uygulaması sonrasında p53 ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler



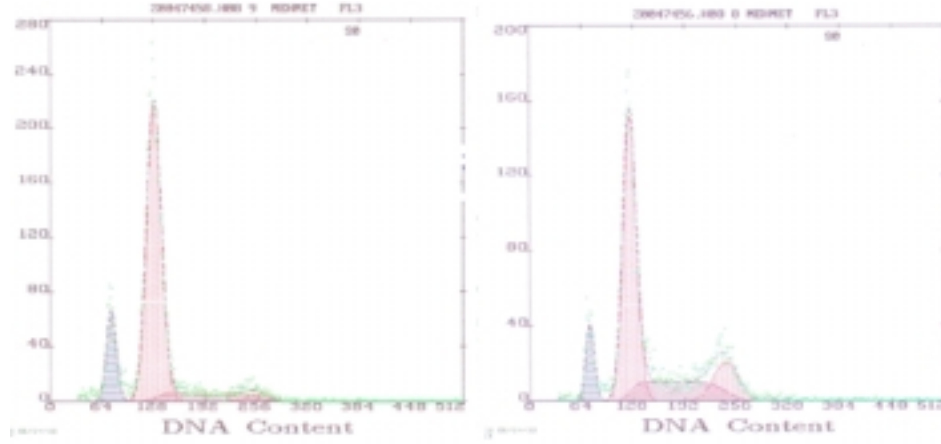
Çizelge 3.12. Gruplar arasında p53 ekspresyonuna ait değişikliklerin istatistiksel değerlendirilmesi

P53 Ekspresyonu	Gruplar		Karşılaştırma	P
Primer kültür ve hücre dizileri (N=55)	K (n=13)	1 (1-1)	K-L	<0,05
	L (n=13)	1,33 (0,72-3,54)	K-T	>0,05
	T (n=13)	0,97 (0,04-3,17)	K-T+L	<0,05
	T+L (n=12)	1,67 (0,29-6,96)	L-T	<0,05
			L-T+L	>0,05
			T-T+L	<0,05
MGMT geni UU olan primer kültür ve hücre dizileri (N=28)	K (n=7)	1 (1-1)	K-L	<0,05
	L (n=7)	1,81 (0,97-3,54)	K-T	>0,05
	T (n=7)	1,21 (0,04-3,17)	K-T+L	<0,05
	T+L (n=7)	2,42 (1,05-5,23)	L-T	>0,05
			L-T+L	>0,05
			T-T+L	<0,05
MGMT geni UM olan primer kültür ve hücre dizileri (N=23)	K (n=6)	1 (1-1)	K-L	>0,05
	L (n=6)	1,01 (0,72-2,18)	K-T	>0,05
	T (n=6)	0,91 (0,57-1,59)	K-T+L	>0,05
	T+L (n=5)	1,67 (0,29-6,96)	L-T	>0,05
			L-T+L	>0,05
			T-T+L	>0,05

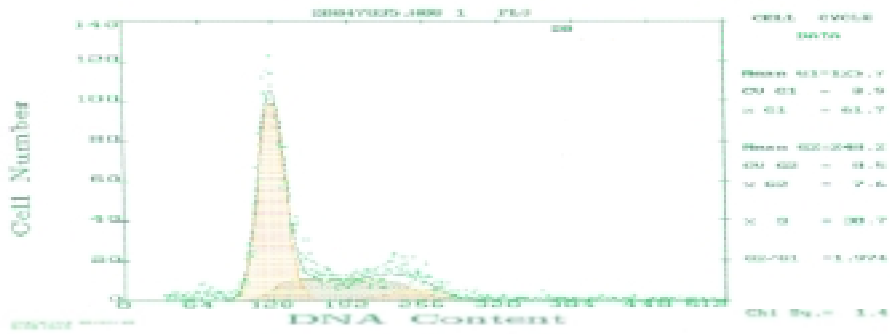
3.7. Akım Sitometri Analizi

Primer kültür hücrelerine ve hücre dizilerine ilaç verildikten sonra gruplar arasında farklı düzeylerde ölümlerin olduğu normal ışık mikroskopunda (inverted) gözlenmiştir. Hücre ölümlerinde apoptozun varlığını ve düzeyini tespit etmek amacıyla akım sitometri analizi yapılmıştır. Ancak tüm primer kültürlerde ve hücre dizilerinde akım sitometri analizi yapılmamıştır. Primer kültürlerden FS, SÇ, AK, NB, isimli hastalara ait hücrelerde ve hücre dizilerinden U-138 MG ve T98G'de akım sitometri analizi yapılmıştır. Akım sitometrisiyle elde edilen grafiklerde

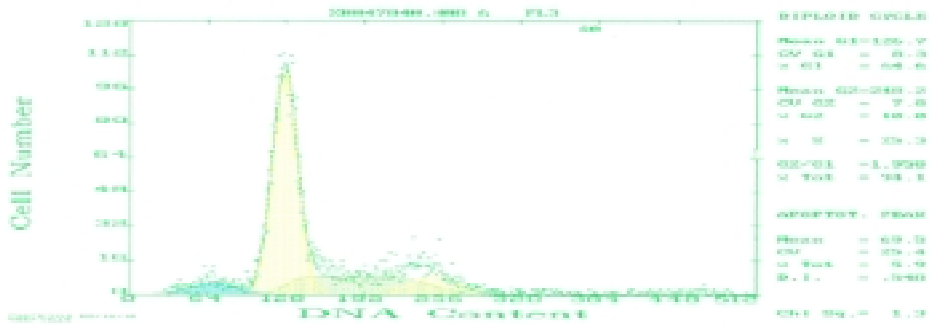
hücrelerin yaşam döngülerine ve apoptotik düzeylerine ait veriler bulunmaktadır. Bu grafiklere ait örnekler aşağıda yer almaktadır (Şekil 3.14; Şekil 3.15; Şekil 3.16; Şekil 3.17; Şekil 3.18).

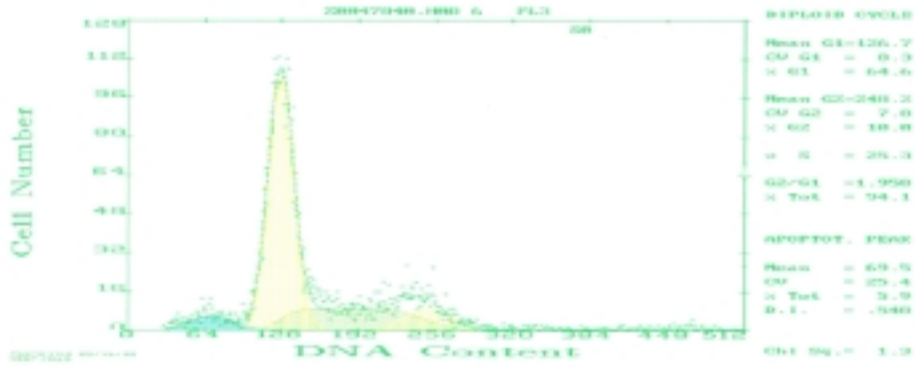


Şekil 3.13. Akım sitometri analizi sonucu elde edilen örnek görüntü

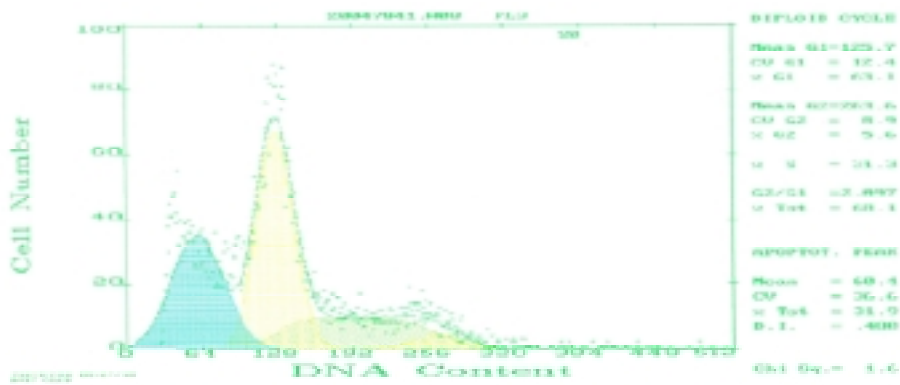


Şekil 3.14. NB isimli hastanın kontrol grubuna ait akım sitometri grafiği





Şekil 3.16. NB isimli hastanın Lomeguatrib grubuna ait akım sitometri grafiği



Şekil 3.17. NB isimli hastanın Temozolomid + Lomeguatrib grubuna ait akım sitometri grafiği

Akım sitometri analizi yapıldıktan sonra elde edilen hücre döngüsü ve apoptoz sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, hücre döngüsü ve apoptoz açısından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 3.13). Ancak her bir örnek kendi içerisinde incelendiğinde ise bazı örneklerin T+L grubundaki apoptotik yüzdenin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Çizelge 3.13’de yer alan K harfi “kontrol”ü, T harfi “TMZ”yi, L harfi Lomeguatrib’i, T+L harfleri “Temozolomid ve Lomeguatrib” kombinasyonunu ifade etmektedir.

Çizelge 3.13. Akım sitometri sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

Akım sitometri analizi	Gruplar		Karşılaştırma	p
G₁ (N=22)	K (n=6)	68,35 (36,80-94,40)	K-L	>0,05
	L (n=6)	70,25 (51-79,30)	K-T	>0,05
	T (n=6)	71,25 (60,60-82)	K-T+L	>0,05
	T+L (n=4)	64,45 (55,80-82,4)	L-T	>0,05
			L-T+L	>0,05
			T-T+L	>0,05
G₂ (N=22)	K (n=6)	9,80 (0-63,20)	K-L	>0,05
	L (n=6)	11,35 (2,60-22,70)	K-T	>0,05
	T (n=6)	11,60 (4,40-16,20)	K-T+L	>0,05
	T+L (n=4)	6,20 (5,40-16,70)	L-T	>0,05
			L-T+L	>0,05
			T-T+L	>0,05
S (N=22)	K (n=6)	15,85 (0-30,70)	K-L	>0,05
	L (n=6)	15,35 (14,40-30,30)	K-T	>0,05
	T (n=6)	19,20 (2,90-25,30)	K-T+L	>0,05
	T+L (n=4)	28,10 (10,80-31,30)	L-T	>0,05
			L-T+L	>0,05
			T-T+L	>0,05
Apoptoz (N=22)	K (n=6)	4,45 (0-34,20)	K-L	>0,05
	L (n=6)	9,80 (1,80-26,30)	K-T	>0,05
	T (n=6)	14,10 (0-32,20)	K-T+L	>0,05
	T+L (n=4)	28,00 (8,40-32,60)	L-T	>0,05
			L-T+L	>0,05
			T-T+L	>0,05

3.8. Tek Hücre Elektroforezi

Yalnızca hücre dizilerinde, ilaç verildikten sonra apoptozu işaret eden DNA fragmentasyonunun varlığı COMET testi ile analiz edilmiştir. Yapılan COMET sonucu elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edildiğinde U-118 MG, U-138 MG ve T98G hücre dizilerinde gruplar arasında DNA fragmentasyonu açısından anlamlı bir fark saptanmıştır. Buna göre U-118 MG hücre dizisinde K'ya göre L'de, K'ya göre T'de ve K'ya göre T+L'de, U-138 MG hücre dizisinde K'ya göre L'de, K'ya göre T'de ve K'ya göre T+L'de ve T'ye göre T+L'de, T98G hücre dizisinde K'ya göre L'de, K'ya göre T'de ve K'ya göre T+L'de, L'ye göre T'de ve T'ye göre T+L'de DNA fragmentasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). U-87 MG'de ise gruplar arasında DNA fragmentasyonu açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Bu sonuçlara ilişkin istatistiksel analiz **Çizelge 3.14**'te verilmiştir. **Çizelge 3.14**'te yer alan K harfi "kontrol"ü, T harfi "TMZ"yi, L harfi Lomeguatrib'i, T+L harfleri "Temozolomid ve Lomeguatrib" kombinasyonunu ifade etmektedir.

Çizelge 3.14. Tek hücre jel elektroforezi sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

COMET		Hasarlılık Yüzdesi	Karşılaştırma	P
138 (N=1009)	K (n=246)	%18,7	K-L	<0,05
	L (n=246)	%53,3	K-T	<0,05
	T (n=246)	%50,4	K-T+L	<0,05
	T+L (n=271)	%61,3	L-T	>0,05
			L-T+L	>0,05
			T-T+L	<0,05
118 (N=931)	K (n=219)	%27,4	K-L	<0,05
	L (n=244)	%37,5	K-T	<0,05
	T (n=248)	%37,3	K-T+L	<0,05
	T+L (n=220)	%45,9	L-T	>0,05
			L-T+L	>0,05
			T-T+L	>0,05
98 (N=1051)	K (n=219)	%7,4	K-L	<0,05
	L (n=244)	%27,9	K-T	<0,05
	T (n=248)	% 19,9	K-T+L	<0,05
	T+L (n=220)	%30,0	L-T	<0,05
			L-T+L	>0,05
			T-T+L	<0,05
87 (N=1027)	K (n=219)	%24,7	K-L	>0,05
	L (n=244)	%32,4	K-T	>0,05
	T (n=248)	%32,7	K-T+L	>0,05
	T+L (n=220)	%26,0	L-T	>0,05
			L-T+L	>0,05
			T-T+L	>0,05

4. TARTIŞMA

4.1. GBM'de Primer Kültür Oluşturma

Kanser günümüzün en öldürücü hastalıklardan biridir ve sıklığı sürekli artış göstermektedir. Bu artışın nedenleri arasında, genel başlıklarıyla çevresel karsinogenik moleküllerin çoğalması, modern teknolojinin getirdiği hizmetlerin yan etkileri ve stres gösterilmektedir (Blumenthal ve Schulman, 2005; Krex ve ark., 2007; Khurana ve ark., 2009). Kanser türleri arasında beyin tümörlerinin ve beyin tümörleri içinde GBM'in önemli bir yeri vardır. Çünkü, GBM'in oluşum nedeni/nedenleri net olarak tanımlanamamıştır, küratif bir tedavisi yoktur ve tanı sonrası ortalama yaşam süresi çok kısadır (Rosell ve ark., 2008; Prasad ve Haas-Kogan, 2009; Losieau ve ark., 2009). GBM'in karakteristik özelliklerinin ortaya konması ile ilgili bir çok araştırma yapılmaktadır. Bu araştırmalar, GBM'in her açıdan (klinik, genetik, tedavi) heterojen bir yapısının olduğunu işaret etmektedir (Adamson ve ark., 2009; Krakstad ve Chekenya, 2010). Dolayısıyla, klinik ve genetik yapısıyla heterojen karakterli bir hastalığın tedavisinde genel bir strateji sunmak GBM için çok doğru bir bilimsel yaklaşım olmayabilir. Bu güne kadar GBM için denenen tedavi şekillerinin hiç biri kesin bir tedavi protokolü olma özelliğini kazanamamıştır. Bunun bir çok önemli nedeni bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi araştırmaların kanser hücre dizilerinde ve fare modellerinde yapılmış olmasıdır. Glioma kanser hücre dizilerinde ve fare modellerinde yapılan araştırmalar sonucunda GBM tedavisi için ümit verici sonuçlar elde edildiği belirtilmektedir. Bu çalışmalarda tedavi için bir çok yaklaşım sunulmasına rağmen bu öneriler hastalarda uygulanamamaktadır (Van Noort, 2006). Çünkü, araştırmaların yapıldığı kanser hücre dizileri elde edilirken hastadan izole edilen hücreleri çoğaltmak için onkogen aktivasyonu ve/veya büyüme faktörleri kullanılmaktadır. Ayrıca, elde edilen hücreler ticari bir amaç için kullanılmakta ve bu nedenler sürekli pasaj yapılarak çoğaltılmaktadır. Hücrelerde onkogen aktivasyonu yapılması veya özel büyüme faktörlerinin kullanımı ve sıkça pasajlanması hücrede genomik yapının değişmesine ve sonunda hücrelerin asıl *in vivo* karakterinden uzaklaşmasına neden olmaktadır. İn

vivo karakterinden uzaklaşan ve farklı bir genomik yapı kazanan hücrelerden elde edilen sonuçlar klinikle bağdaşmamaktadır. Ayrıca bu tür kanser hücrelerini satın alan laboratuvarlar bu hücreleri sürekli kullanmak ve diğer araştırma gruplarıyla paylaşmak için laboratuvarlarda sürekli çoğaltmakta böylece pasaj sayısı artmaktadır. Bu tür yüksek pasaj sayılı hücrelerin kullanıldığı araştırmalardan üretilen veriler *in vivo*yla uyumlu olmayabilmektedir. De Witt Hamer ve ark. (2004), hücre dizilerinin GBM'i yansıtmamasının şüpheli bir durum olarak tanımlamaktadır. Fare ile insanın genomik yapısındaki farklılıklar nedeniyle fareler üzerinde oluşturulan tümörlerden elde edilen sonuçlar da insandaki GBM'i yansıtamamakta ve tedavide kullanılamamaktadır (Van Noort, 2006). Yukarıda bahsedilen nedenlerden dolayı GBM tedavisinde kişinin tümör dokusundan elde edilen primer hücrelerin kullanılarak araştırmalar yapılması önerilmektedir (Van Noort, 2006). Primer kanser hücreleriyle yapılan araştırma çalışmalarının kanserin hastaya özgü *in vivo* karakterini yansıttığı belirtilmektedir (De Witt Hamer ve ark., 2004). Bu tez çalışmasında GBM tanısı alan hastalardan alınan tümör dokusundan primer kanser hücreleri elde edilmiş ve hastaya özgü bu hücreler üzerinde ilgili araştırmalar yapılmıştır. Bu nedenle, elde ettiğimiz hastaya özgü sonuçlarımızın *in vivo* karakteri en yakından yansıtan sonuçlar olduğunu düşünmekteyiz.

Literatürde, beyin tümörlerinden primer kültür elde etme yöntemiyle ilgili tanımlanmış bir çok yöntem bulunmaktadır (Bakir ve ark., 1998; Zhang L ve ark., 2005; Veselska ve ark., 2006; Fael Al-Mayhany ve ark., 2009; Quin ve ark., 2010). Tez çalışmamızda, aynı hastaya ait doku örneklerinde bu yöntemlerin bir çoğu denenmiştir. Bu denemeler sonunda, tezin gereç ve yöntem başlığı altında belirtilen yöntemin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu yöntemde primer kültür süreci dokuların ameliyathaneden kültür laboratuvarımıza getirilmesiyle başlamış, bekleme yapılmayarak dokunun tazeliği korunmuştur. Ayrıca, hücrelere nazikçe davranılmış ve onların farklılaşmalarına, *in vivo* karakterlerinden uzaklaşmalarına neden olabilecek solüsyonların kullanılmasından kaçınılmıştır. Literatürde yer alan bazı makalelerde dokulardan hücrelerin ayırımı için tripsin-EDTA kullanıldığı belirtilmektedir (Kabadere ve ark., 2004; Van Noort, 2006; Quin ve ark., 2010). Tez çalışmamızın yöntem belirleme aşamasında, aynı dokudan tripsin-EDTA kullanarak

ve kullanmayarak yaptığımız kültür çalışmasında, tripsin-EDTA kullanıldığında hücre üremesinin ya olmadığı veya geciktiği ayrıca hücrelerin flask tabanına yapışma sürelerinin uzadığı gözlenmiştir. Ayrıca, tripsin-EDTA'nın hücre reseptörlerini parçalama olasılığının bulunması nedeniyle kullanılmamıştır. Literatürde ayrıca primer kültür oluşturmada bir takım sitokinlerin, özel büyüme faktörlerinin ve kollajenazın kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır (Pedeboscq ve ark., 2007; Quin ve ark., 2010;). Bu çalışmada sitokin veya özel büyüme faktörü eklenmemiştir. Çünkü bu moleküllerin hücrelerin genomik yapılarında bir takım genlerin ekspresyonlarının değişmesine neden olduğu zaten bilinmektedir. Tez çalışmasında primer kültürlerin *in vivo* özelliklerinden uzaklaşmasını istemediğimiz için bu faktörler kullanılmamıştır. Primer kültürlerde kollajenaz dokuların parçalanmasını kolaylaştırmak ve hücrelerin daha iyi ayrılmasını sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Kullanılan kollajenaz tip 1a epitel, karaciğer, akciğer ve adrenal primer hücre izolasyonları için önerilen bir üründür ve beyin dokusu için önerilen bir kollajenaz kompleksi yoktur. Bu tez çalışmasındaki yöntemimizde dokuların ayrılmasında ve hücrelerin izolasyonunda uygulanan kesme ve yıkama işlemlerindeki pipetleme işlemleri dokuların kolaylıkla ayrılmasını sağladığı için dışarıdan bir enzim kompleksiyle inkübe edilmesine veya santrifügasyona gerek duyulmamıştır. Van Noort (2006), primer kültür yönteminde teknolojik unsurların en aza indirilmiş olması gerektiğini belirtmektedir. Ayrıca, glial kültürde önemli bir diğer nokta, primer kültürde mikroglia bulunmasıdır. Glial primer kültürde elde edilen hücreler dondurup çözüldüğünde mikroglialar ürememektedir (Van Noort, 2006). Bu tez çalışmasında elde edilen tüm primer kültürler her pasajda dondurulup tekrar çözülmüştür. Çalışmalarımız bu tekrar çözülen primer kültürlerde yapılmıştır. Ayrıca, mikroglialar çoğalmak için granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF)'e ihtiyaç duymaktadır. Bizim yöntemimizde zaten GM-CSF kullanılmamıştır. Bu özellikleriyle yöntemimizin kolay, etkili ve dışarıdan hücrelerin yapısını etkileyebilecek moleküller eklenmediği için *in vivo*yü yansıtan bir yöntem olduğunu ve tüm primer kültür araştırmalarımızın pasaj sayısı 5 ve altındaki hücrelerden yapıldığı için de sonuçlarımızın *in vivo* ile özdeş veya benzer sonuçlar olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca literatürde bizim yöntemimizle uyumlu bir çok çalışma bulunmaktadır (Di Tomaso ve ark., 2000; Bouterf ve ark. 2000; Wang ve ark., 2007;

Gaitonde ve ark., 2008; Hagemann ve ark., 2010). Yukarıda belirtilen hangi yöntem uygulanırsa uygulansın, elde edilen hücrelerde immün boyamayla GFAP ekspresyon varlığının gösterilmesi gerekmektedir. Bu doğrulama yöntemi hücrelerin glia kökenli olduklarını göstermede altın standart yöntemdir (Bakir ve ark., 1998; Di Tomaso ve ark., 2000; Pedeboscq ve ark., 2007). Bu tez çalışmasında da GBM primer hücre kültürlerinde immün boyamayla GFAP varlığı da gösterilmiştir.

4.2. MGMT Metilasyonu ve TMZ Direnci

TMZ, son yıllarda GBM tedavisinde sıkça kullanılan alkilleyici bir ajandır. Bu kemoterapötik ajan DNA'da bazların metillenmesinde rol almaktadır. En sık metillenen bazlar N⁷MeG (%80-85) ve N³MeA (%8-18)'dir. Ancak bunların toksik etkileri tamir enzimlerince kolaylıkla ortadan kaldırılabilir. O⁶MeG, diğerlerine göre daha az oranda (%≤8) meydana gelen eklenti tipi olmasına rağmen mutajenitesi ve toksisitesi en güçlü olanıdır (Kaina ve ark., 2007; Marchesi ve ark., 2007). MGMT bu eklentide yer alan metil molekülünü kaldırarak TMZ'nin toksik etkisine karşı direnç gelişmesine neden olmaktadır. Bu direncin üstesinden gelebilmek için kullanılan TMZ'nin dozu arttırılmaktadır (Stupp ve ark., 2007). Ancak bu durumda da TMZ'nin yan etkileri (myeloid seri hücrelerinin baskılanması, nötropeni, trombositopeni) artmaktadır (Agarwala ve Kirkwood, 2000). Bu direnç MGMT geninin yüksek düzeyde eksprese olduğu durumlarda yaşanmaktadır (Hermisson ve ark., 2006; Kitange ve ark., 2009). MGMT geninin DNA sitozin metiltransferazlarla metilasyonu (Verbeek ve ark., 2008) sonucunda ekspresyonu azalmaktadır (Paz ve ark. 2004; Roos ve ark., 2007; Hegi ve ark., 2008). GBM hastalarında MGMT metilasyon oranı ~%30-50 civarındadır (Esteller ve ark., 2000; Hegi ve ark., 2008; Kitange ve ark., 2009). MGMT ekspresyon miktarının metilasyon yolu ile azalması sonucunda hücrenin TMZ duyarlılığının arttığına ve MGMT metilasyonunun GBM'de TMZ direncinin belirlenmesinde prognostik bir faktör olabileceğine ilişkin bir çok yayın bulunmaktadır (Esteller ve ark., 1999; Paz ve ark., 2004; Hegi ve ark., 2008; Dunn ve ark., 2009; Karayan-Tapon ve ark., 2010; van Niftrik ve ark., 2010).

Esteller ve ark. (1999) tarafından, beyin tümörü hastalarına ait tümör dokularının değerlendirildiği çalışmada, MS-PZR metodu ile 166 beyin tümörünün %33'ünde ve 140 gliomanın da %38'inde MGMT metilasyonu saptandığı bildirilmektedir. Esteller ve ark. (1999), MGMT metilasyonunun beyin tümörlerinde klinik seyir açısından önemli rol oynadığı belirtilmiştir.

Paz ve ark.'nın (2004) 92 glioma hastasında yaptıkları çalışmada MGMT metilasyonun (%30,4) klinik cevapla doğrudan ilişkili olduğu ve primer glioma hastalarının TMZ ile tedavisinde, klinik cevabın öngörülmesinde MGMT metilasyonunun önemli olduğu vurgulanmıştır.

Hegi ve ark. (2008) tarafından yapılan araştırmada, 40 GBM hastasının %30'unda MGMT metilasyonu saptanmış ve MGMT metilasyonunun GBM hastalarında, hastalık seyrinin klinik takibinde ve TMZ dozunun belirlenmesinde en önemli belirteç olduğu belirtilmektedir.

Dunn ve ark. (2009), 109 GBM tümör örneğinin %53'ünde MGMT metilasyonu saptadıklarını ve MGMT metilasyonunun hastaların yaşam sürelerinin ve TMZ'ye olan dirençlerinin belirlenmesinde önemli rol oynadığını belirtmektedir. Metilasyon taşıyan GBM hastalarının yaşam sürelerinin uzun ve hastalığın kötüleşme sürecinin olmadığı veya geç başladığı bildirilmiştir.

Karayan-Tapon ve ark. (2010), 81 GBM hastasından alınan tümör örneklerinde MGMT metilasyonunu %67 oranında saptadıklarını ve MGMT metilasyonunun GBM hastalarının TMZ ile tedavisinde en etkin belirteç olduğunu belirtmektedir.

Van Nifterik ve ark.'nın (2010) GBM hücre dizilerinde yaptıkları MGMT metilasyon ve MGMT protein miktarı analizi sonucunda, MGMT metilasyonu ve protein miktarının GBM hücre dizilerinin TMZ duyarlılığını etkilediği bildirilmektedir.

GBM'in heterojen genetik yapısı içerisinde bir takım genetik faktörlerin (p53 mutasyonu veya EGFR amplifikasyonu gibi), hastaların yaşam süresi ve tedavisinde

kemoterapötik direncin belirlenmesinde aday belirteçler olabileceği belirtilse de, MGMT, yaşamın ve tedavinin nasıl olacağını öngörülmesi üzerine bu güne kadar belirlenen en önemli belirteçtir. Bu tez çalışmasında da değerlendirilen 10 hastanın 4'ünde (%40) MGMT metilasyonu saptanmıştır. Ayrıca, MGMT promotor metilasyonu taşımayan hastalardan elde edilen MTT IC₅₀ değerlerinin metilasyon taşıyanlara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Tez çalışmamız sonucunda, primer kültürden elde edilen glial hücrelerde ve GBM hücre dizilerinde MGMT metilasyonunun TMZ duyarlılığında önemli olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlarımız literatürle uyum göstermektedir (Hermission ve ark., 2006; Yoshino ve ark., 2010; van Nifterik ve ark., 2010).

Ayrıca, bu tez çalışmasında, primer hücre kültürlerinde ve GBM hücre dizilerinde Lomeguatrib ve TMZ birlikte kullanılmış ve Lomeguatrib TMZ kombinasyonunun bu hücrelerdeki sitotoksik etkileri MTT ile tespit edilmiştir. MTT sonucunda, primer hücre kültürlerinde, TMZ'nin 50 µM Lomeguatrib'le birlikte kullanıldığında yalnız kullanımdaki standart dozun %65-12, hücre dizilerinde ise %72-82 arasında değişen oranlarda daha az kullanılabilmesi saptanmıştır. Khan ve ark. (2008), bizim sonuçlarımızla uygun olarak Lomeguatrib'le birlikte TMZ kullanıldığında standart TMZ dozunun %60-75'inin kullanılabilmesini önermektedir (Khan ve ark., 2008). Bu öneri, Khan ve ark. (2008)'nin metastatik kolorektal kanserli hastalarda yaptıkları faz II çalışmasında elde ettikleri sonuçlara göre belirlenmiştir. Khan ve ark.'nın (2008) çalışmasında, hastalara Lomeguatrib TMZ kombinasyonu verilerek klinik tablo takip edilmiş ve periferik kan örneklerinden farmakodinamik testler yapılmıştır. Bu testler sonucunda, TMZ Lomeguatrib'le birlikte kullanıldığında standart dozun %60-75'inin kullanılabilmesi sonucunun ortaya çıktığı bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında, ilk kez Lomeguatrib ile TMZ birlikte primer hücre kültürlerine ve GBM hücre dizilerine uygulanmıştır. Bu kombinasyonun GBM hücrelerinde veya hayvan modellerinde kullanımına ilişkin literatür bulunmamaktadır.

4.3. Lomeguatrib, Klinik Öncesi ve Klinik Uygulamaları

Lomeguatrib ile ilgili literatürde çok az çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda lomeguatrib kolorektal (Ranson ve ark., 2006; Khan ve ark., 2008; Sabharwal ve ark., 2010; Watson ve ark., 2010), melanom (Ranson ve ark., 2006; Watson ve ark., 2009; Kefford ve ark., 2009), akut lösemi (Caporaso ve ark., 2007) ve meme kanseri hücrelerinde ve (Clemons ve ark., 2005) ve ovaryum hücre dizilerinde (Barvaux ve ark., 2004) kullanılmıştır. Lomeguatrib ile ilgili çalışmalar 2000 yılı sonrasında yapılmıştır ve bunların çoğunluğunda 2004 yılı sonrasına aittir. Ancak bu çalışmaların içerisinde Lomeguatrib'in GBM üzerindeki etkisine ilişkin bir araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışmalarda, Lomeguatrib'in MGMT inhibitör kabiliyetinin O⁶-BG'den daha iyi olduğu, daha az toksisiteye sahip olduğu ve TMZ ile birlikte kullanıldığında kanser hücrelerinin alkilasyon ajanlarına karşı duyarlılıklarını arttırdığı belirtilmektedir. Aşağıda belirtilen diğer kanserlerde gözlemlendiği gibi, bu tez çalışmasında da Lomeguatrib'in, TMZ ile birlikte uygulandığında GBM hücrelerinin TMZ'ye olan duyarlılığını arttırdığı saptanmıştır.

Barvaux ve ark. (2004), A2780 ovaryum kanser hücrelerinde, Lomeguatrib (10 µM) TMZ (25 µM) kombinasyonunun yalnızca TMZ (25 µM) kullanımına göre TMZ duyarlılığını arttırdığı belirtilmektedir. Bu çalışmada kullanılan dozlar MTT veya kolonijenik testlerle belirlenmemiştir. Ancak bizim çalışmamızda kullandığımız dozlar MTT ile belirlenmiş ve hücrelerde de TMZ duyarlılığın Lomeguatrib TMZ kombinasyonunda arttığı sonucuna ulaşılmıştır.

Clemons ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada, insan meme kanseri hücre dizisi (MCF-7) ve meme kanseri ksenografları üzerinde yaptıkları çalışmada Lomeguatrib'in MCF-7 hücrelerinin büyüme inhibisyonunda tek başına bir etkisinin olmadığı ancak hücrelerin TMZ'ye olan duyarlılığını 40 kat arttırdığı, 400 µM TMZ ile ulaşılan inhibisyon etkisine 10 µM Lomeguatrib ve 10 µM TMZ ile ulaşılabildiği belirtilmiştir. Ayrıca, ksenograft modellerinde tümör gelişimini geciktirmesi açısından, Lomeguatrib TMZ kombinasyonunun yalnız TMZ kullanımına göre daha etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Ranson ve ark.'nın (2006), ilerlemiş 38 solid kanserli hastalarda (melanom, kolorektal, küçük hücreli olmayan akciğer, renal, peritoneal karsinom, meme, mezoteliyom, özofagus, yumuşak doku sarkomu, nöroektodermal, mide ve timus) TMZ ile Lomeguatrib'in beraber kullanılabilmesi uygun dozu belirlemek amacıyla yaptıkları faz I çalışmasında, Lomeguatrib'in tek başına 10-40 mg/m² dozlarında oral olarak aldığımda myeloid seri baskılanmasının olmadığı ve TMZ ile birlikte 15 mg/m²/gün kullanılabilmesi belirtilmiştir. Ranson ve ark. (2006), hastalara belirtilen doz aralığında önce Lomeguatrib ve sonrasında TMZ vererek hastalarda klinik tablo takip etmiş ve çalışma sonucunda, bu ilaç kombinasyonunun zaman ve doz ayarlaması yapılarak ileriki çalışmalarda kullanılabilmesi belirtilmiştir. Ranson ve ark.'nın (2006) yaptığı bu çalışma sonucuna göre, Lomeguatrib TMZ kombinasyonunun hastalar arasında farklı etki gösterebileceği, etki sürelerinin değişebileceği ve Lomeguatrib'in TMZ öncesinde ne kadar süre ile uygulanması gerektiği ile ilgili konuların diğer çalışmalarla belirlenmesi gerektiği ortaya çıkmıştır. Bu tez çalışmasında da hastaların Lomeguatrib TMZ kombinasyonuna olan duyarlılıklarının farklı olduğu ve hastalar arasında farklı etki gösterebileceği ve her GBM hastasına farklı dozlarda ilaç uygulaması yapılması gerektiği saptanmıştır.

Caporaso ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada, dirençli ve tekrar eden akut lösemili hastalardan kemoterapi alanlarda Lomeguatrib TMZ kombinasyonunun lösemik blast hücrelerindeki MGMT aktivitesi üzerine etkisi araştırılmış. Bu çalışmada da Triazin grubu kemoterapötiklerin Lomeguatrible birlikte dirençli ve tekrar eden akut lösemili hastalarda kullanılmasının kemoterapötik direncin ortadan kaldırılmasında etkili olabileceği ve yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmektedir. Caporaso ve ark. (2007), Lomeguatrib TMZ kombinasyonunda Lomeguatrib dozunu 40 mg/m²/gün, TMZ 150 mg/m²/gün konsantrasyonda ve ardışık 7 gün şeklinde kullanmışlardır. Bu doz aralığının solid tümörler için kabul edilen doz aralığından (Lomeguatrib, 40 mg/m²/gün; TMZ 150-200 mg/m²/gün; 5 gün) yüksek olmasının nedeni olarak akut lösemi için ağır bir doz kullanılması gerektiği şeklinde açıklanmaktadır.

Khan ve ark. (2008) tarafında yapılan çalışmada, 19 metastatik kolorektal kanserli hastada, Lomeguatrib (40 mg/gün, 5 gün) TMZ kombinasyonu (50-200 mg/m²/gün, 5 gün) kullanıldığı ve bu hastaların klinik takiplerinin yapıldığı belirtilmiştir. Bu çalışma sonunda, klinik açıdan Lomeguatrib TMZ kombinasyonunun yalnızca TMZ kullanımından farklı olmadığı ve kombinasyonda hematolojik toksisitenin arttığı bildirilmiştir. Khan ve ark. (2008) bu sonucu, Lomeguatrib dozunun az kullanılmış olabileceği, kolorektal kanserlerde MGMT dışında MMR genlerinin de önemli olabileceği ve TMZ'nin metastatik kolorektal kanserler için iyi bir ajan olmayacağı şeklinde açıklamaktadır. Bu çalışmada, kullanılan dozların hastaların MGMT metilasyon yapısı değerlendirilmeden belirlenmiş olması klinik yanıtın yetersiz olmasına ve toksisite artışına neden olmuş olabilir.

Kefford ve ark. (2009) tarafından, 32 ilerlemiş melanom kanserli hasta üzerinde yapılan faz I çalışmasında, hastalara Lomeguatrib (40 mg/gün, 5 gün) Temozolomid (125 mg/gün, 5 gün mg) kombinasyonu verilmiş. Bu hastalarda, TMZ'nin yalnız başına kullanımı ile kombinasyonla kullanımı arasında klinik olarak fark bulunmadığı saptanmıştır. Bu nedenle, melanom hastalarında yeni doz ayarlamaları yapılması gerektiğine vurgu yapılmıştır.

Watson ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada, Lomeguatrib ve TMZ'yi farklı dozlarda ilerlemiş melanom kanserli hastalara uyguladıktan sonra bu hastalardan periferik kan örnekleri ve bazılarında tümör biopsileri almış, bunlarda toplam MGMT proteini, MGMT aktivitesi ve O⁶-meG miktarı araştırılmıştır. Bu çalışmada Lomeguatrib TMZ kombinasyonu 60 veya 80 mg Lomeguatrib 125 mg, TMZ şeklinde uygulanırken yalnız TMZ uygulaması 200 mg şeklinde yapılmıştır. Watson ve ark. (2009), Lomeguatrib TMZ kombinasyonunun MGMT inaktivasyonu ve total MGMT protein miktarı açısından TMZ'den daha etkili olduğu, TMZ'nin yalnız başına MGMT inaktivasyonunu yeterince yapamadığı, kombinasyonda periferik mononükleer hücrelerdeki O⁶-meG'nin daha fazla tespit edildiği dolayısıyla myeloid seri toksisitesinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada, kombinasyonda kullanılan TMZ dozu tek başına kullanım dozundan %37,5 daha azdır. Watson ve ark. (2009)'nın çalışmasında, tüm hasta sonuçlarının bir arada

değerlendirilmesiyle saptanan myeloid seri hücre baskılanması sonucu, kullanılan dozların bazı hastalar için yüksek olmasından kaynaklanabilir. Çünkü, bu çalışmada hastaların MGMT metilasyon yapısına ve MGMT ekspresyonunun araştırılmasına ilişkin hiçbir bilgi bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda da TMZ dozunun kombinasyonda azaltılması gerektiği ancak her hastada aynı oranda azaltılamayacağı sonucuna ulaşılmıştır.

Sabharwal ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada, 24 metastatik kolorektal kanserli hastalara irrinotekan ile birlikte Lomeguatrib (80 mg/m²) verildiği belirtilmektedir. Hastalarda yapılan klinik takip sonucunda, bu kombinasyonun kolorektal kanserli hastalarda kullanılabileceği, Lomeguatrib dozunun artırılarak uzun süreli MGMT inaktivasyonu sağlanmasıyla ve myeloid toksisitenin kontrol edilmesiyle daha iyi klinik sonuçlar elde edilebileceği bildirilmektedir.

Watson ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada, herhangi bir alkilasyon ajanı olmadan yalnızca Lomeguatrib prostat, kolorektal, meme ve tanımlanmamış merkezi sinir sistemi hastalarında kullanılmıştır. Bu çalışmanın amacı, Lomeguatrib'in 12 saat süreyle MGMT inaktivasyonu yapabileceği dozu farklı tümör örnekleri değerlendirilerek bulmaktır. Ameliyattan 12 saat önce, farklı dozlarda Lomeguatrib alan hastalardan ameliyat sırasında alınan tümör dokularında MGMT aktivasyon testi yapılmıştır. Ayrıca tanımlanamayan merkezi sinir sistemi hastalarında MGMT metilasyonu incelenmiştir. Bu çalışmada toplam MGMT proteini ELISA (enzim ilintili immün test) ile araştırılmıştır. Watson ve ark. (2010), Lomeguatrib'in 120-160 mg/gün kullanımıyla kanser hastalarında MGMT inhibisyonu yapılabileceği ve merkezi sinir sistemi tümörlerinde MGMT hipermetilasyonunun MGMT ekspresyonuyla ilişkili olmadığı belirtilmektedir. Bu çalışma, Lomeguatrib'in toksik olmadan 160 mg dozda kullanılabileceğini göstermesi açısından önemlidir. Çünkü, önceki çalışmalarda Lomeguatrib dozunun 10-80 mg arasında kullanılabileceği belirtilmektedir. Ayrıca, bu çalışmada ilk defa Lomeguatrib sonrası inaktif ve toplam MGMT proteini karşılaştırılmış ve ikisi arasında fark olduğu, inaktif MGMT'nin daha fazla olduğu belirtilmektedir. Yazarlar bu durumu, "inaktif MGMT proteozom ubiquitinasyon mekanizması için etkili bir substrat olmayabilir ve bu nedenle inaktif

MGMT toplam MGMT'den daha fazladır" şeklinde açıklamışlardır. Ancak, Watson ve ark. (2010), Lomeguatrib'in MGMT ekspresyonunu düşürebileceği ve bu nedenle aktif MGMT'nin daha az bulunabileceği şeklinde bir yorum yer almaktadır. Bu tez çalışmasında ise Lomeguatrib'in MGMT ekspresyonunu düşürdüğü gösterilmiştir. Bu nedenle, bizim sonuçlarımızda göre, Watson ve ark.'nın (2010) saptadıkları total MGMT proteinindeki azalma Lomeguatrib'in MGMT ekspresyonunu inhibe etmesinden kaynaklanabilir şeklinde yorumlayabiliriz.

Lomeguatrib ile ilgili yukarıda tek tek açıklanan klinik öncesi (Barvaux ve ark., 2004; Clemons ve ark., 2005) ve faz çalışmalarının (Ranson ve ark., 2006; Caporaso ve ark., 2007; Khan ve ark., 2008; Kefford ve ark., 2008; Watson ve ark., 2009; Watson ve ark., 2010; Sabharwal ve ark., 2010) hiç birinde GBM hastaları veya hücre dizileri değerlendirilmemiş ve Lomeguatrib'in MGMT ekspresyonu ve metilasyonu üzerine etkisi ile ilgili hiç bir araştırma yapılmamıştır. Ayrıca, TMZ'nin kullanıldığı çalışmalarda, hastalara uygulanan standart dozların belirlenmesinde MGMT metilasyon yapıları dikkate alınmamıştır. Hastalarda ortaya çıkan klinik yanıtın yetersizliği veya myeloid seri hücre toksisitesi, hastaların epigenetik ve genetik yapısı dikkate alınmadan her hastaya ortak olarak verilen standart doz uygulamasından kaynaklanabilir. Alkilasyon ajanlarıyla yapılan tedavilerde primer direnç geninin genomik ve epigenomik yapısı kullanılacak dozu doğrudan etkileyebilir. MGMT, alkilasyon ajanlarıyla tedavide en önemli direnç geni olduğu için (Middleton ve ark., 2002; Watson ve ark., 2010), ekspresyonu ve metilasyon yapısı değerlendirilerek tedavinin şekillendirilmesi daha uygun olacaktır.

Bu tez çalışması sonucunda, GBM karakterli primer tümör hücrelerinde ve GBM hücre dizilerinde Lomeguatrib'in yalnız veya TMZ ile birlikte istatistiksel olarak anlamlı derecede MGMT ekspresyonunu azalttığı, Lomeguatrib'in MGMT ekspresyonunda ki bu etkiyi MGMT metilasyonu üzerinden yapmadığı, her GBM hastasının Lomeguatrib TMZ kombinasyonuna olan yatkınlığının farklı olduğu, bu yatkınlığın MGMT geni metilasyon yapısıyla istatistiksel olarak anlamlı derecede ilişkili olduğu ve Lomeguatrib'in GBM hastalarında TMZ ile birlikte düşük dozlarda bile kullanılabilirliği ilk kez gösterilmiştir.

4.4. MGMT ve p53 Ekspresyonu Arasındaki İlişki

MGMT ve p53 gen ekspresyonları üzerine yapılan birçok çalışma vardır. Rolhion ve ark.'nın (1999) 39 GBM hastasına ait dokuda yaptıkları çalışmada, RT-PZR ile MGMT ekspresyonu ve immünohistokimya ile de yaban tip ve mutant p53 ekspresyonu araştırılmıştır. Rolhion ve ark. (1999), glial tümörlerin, p53 geninde mutasyon olan örneklerinde MGMT ekspresyonunun azaldığını ve bu nedenle düşük MGMT ekspresyonunun p53 geninde mutasyonların oluşmasını tetikleyebileceğini belirtmektedir.

Osanai ve ark. (2005), 48 meme kanserli hastaya ait tümör örneklerinde MGMT ve p53 ekspresyonunu immünohistokimya ile araştırmışlar. Osanai ve ark. (2005), MGMT ekspresyonu düşük veya olmayan tümör örneklerinde p53 ekspresyonunun yüksek saptadıklarını bildirmektedir.

Esteller ve ark. (2001) tarafından yapılan çalışmada, 314 kolorektal kanserli hastalara ait tümör örneklerinde, MGMT metilasyonu ve tek zincir konformasyonel polimorfizm analizi ile p53 transisyon mutasyonları araştırılmış. Bu çalışma sonunda araştırmacılar, MGMT metilasyonu taşıyan 126 hasta örneğinin 43'ünün (%34) p53 transisyon mutasyonlarını taşıdığı, MGMT metilasyonu olmayan 188 örneğinin 37'sinde (%19) bu p53 transisyon mutasyonlarının saptandığı bildirilmiştir. Esteller ve ark. (2000), her hangi bir olası mekanizma önermeden, MGMT'nin metilasyon yoluyla inaktivasyonunun p53 geninde G:C→A:T transisyon mutasyonlarının artmasıyla ilişkili olabileceğini bildirmektedir.

Hermission ve ark. (2006) glioma hücre dizilerinde yaptıkları çalışmada, MGMT ekspresyonunun ve p53 yapısının hücrelerin TMZ'ye olan duyarlılıklarının tahmininde yardımcı olabileceğini bildirmektedir. Bu çalışma, MGMT'nin p53 ile doğrudan ilişkili olduğunu ve TMZ yanıtının öngörülmesinde her ikisinin de önemli olduğunu göstermiştir.

Bocangel ve ark.'nın (2009), p53 ve MGMT arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak çeşitli kanser hücre dizilerinde yaptıkları çalışmalarda, yaban tip p53'ün MGMT ekspresyonunu transkripsiyon faktörü Sp1 üzerinden azalttığı sonucuna ulaşılmıştır. MGMT geninin, housekeeping genler gibi TATA ve CAAT kutuları içermediği ve p53 için bağlanma bölgesi olmadığı ancak 10 adet Sp1 transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi taşıması nedeniyle, p53'ün MGMT ekspresyonu üzerindeki etkisini Sp1 üzerinden gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Hücre içerisinde Sp1 proteinin ekspresyonu artar ise yaban tip p53'ün bu inhibisyonunun yeterli olmayacağı vurgulanmıştır. Yaban tip p53'ün MGMT promotor aktivitesini azattığı mutant p53'ün bu aktiviteye sahip olmadığı belirtilmektedir. Bocangel ve ark. (2009), p53'ün MGMT inhibisyonunu transkripsiyon düzeyinde gerçekleştirdiğini, DNA hasarıyla p53 artışının glioma hücrelerinin TMZ'ye olan duyarlılığı arttıracakını bildirmiştir. Yaban tip p53'ün MGMT ekspresyonunu azaltılmasına ilişkin sunulan veriler çalışmalar arasında uyum göstermektedir. Ancak mutant p53 için farklı görüşler ileri sürülmektedir. Mutant p53'ün Sp1 üzerinden etki göstermediği bilinmektedir. Ancak p53 promotor baskılama aktivitesini farklı yollarla da yapabilmektedir. Bu yollar a) transkripsiyonel aktivatörlerle etkileşime girerek, b) bazal transkripsiyonel kompleksle etkileşime girerek, c) histon modifiye edici enzimlerle etkileşime girerek promotor bölgelerinde kromatin yoğunlaşması yaparak gerçekleştirebilir. Mutant p53, belirtilen ilk iki yolak ile olmaz ise üçüncü yolak üzerinden promotor baskılaması yapabilir. Dolayısıyla yalnızca yaban tip p53 değil aynı zaman mutant p53'lerde bir şekilde MGMT ekspresyonunu baskılayabilmektedir. Grombacher ve ark. (1998), çalışmalarında mutant p53'ün (DNA bağlanma aktivitesi olmayan p53) bazal MGMT promotor aktivitesini baskıladığını ve bu sonucun Harris ve ark. (1996) yaptığı çalışmayla uyumlu olduğunu bildirmiştir.

Bu tez çalışmasında da, örneklerimizde genel olarak MGMT ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde baskılanırken p53 ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Bu verilerle, p53'ün sadece ekspresyon düzeyine bakılarak MGMT ekspresyonu üzerinde yorum yapılabileceğini ve p53'ün MGMT ekspresyonunu

azalttığı sonucuna varılmaktadır. Bu sonuç, p53'ün mutasyon taşıyıp taşınamasından bağımsız olarak önerilen teorilerle uyumluluk göstermektedir.

4.5. Lomeguatrib, MGMT ve p53 Ekspresyonu

MGMT inhibitörlerinin MGMT ekspresyonu üzerine etkisi ile ilgili bugüne kadar yapılmış tek bir yayın bulunmaktadır. Konduri ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada diğer bir MGMT inhibitörü olan O⁶-BG pankreas kanseri hücre serilerinde ve 200 µM konsantrasyonda kullanılmıştır. Bu çalışmada pankreas kanseri hücrelerinde O⁶-BG'nin ortalama MGMT ekspresyonunu 1,25 kat azalttığı ve gemsitabinle birlikte kullanıldığında ise 1,66 kat azalttığı belirtilmektedir. Bu çalışma, MGMT inhibitörü O⁶-BG'nin MGMT ekspresyonunu azalttığını gösteren ilk çalışma ancak bizim çalışmamız arasında bazı farklar bulunmaktadır. Öncelikle biz çalışmamızda O⁶-BG'den farklı olarak daha az toksik olduğu (Marchesi ve ark., 2007) veya toksisitesinin olmadığı (Ranson ve ark, 2007) belirtilen ve bir MGMT inhibitörü olan Lomeguatrib kullandık. MGMT inhibitörleri, klinik uygulamalarda kemoterapötik ajanın hastaya verilmesinden ortalama 2 saat önce verilmektedir. Bu çalışmada O⁶-BG'nin 48 saat uygulandığı ve sonrasında gemsitabin verildiği belirtilmiştir. Ayrıca O⁶-BG, bu çalışmada 200 µM konsantrasyonda kullanılmıştır. Bu inhibitor konsantrasyonu MGMT inhibitörleri ile ilgili diğer çalışmalara göre (Barvaux ve ark, 2004; Zhang ve ark., 2010) çok yüksektir. Bu konsantrasyonda ve bekleme süresinde MGMT ekspresyonundaki azalma klinikle uyumlu olmayabilir. Bizim çalışmamızda MGMT inhibitörü olarak kullandığımız Lomeguatrib, kemoterapötik ajandan 2 saat önce hücrelere uygulanmıştır. Bu uygulama biçimi MTT analizleri dahil olmak üzere yapılan tüm testlerde aynıdır. Ayrıca, Konduri ve ark. (2009) arkadaşlarından farklı olarak bizim çalışmamız GBM hücre dizilerinde ve *in vivoyu* yansıtması açısından primer hücre dizileri üzerinde yapılmıştır. Bizim çalışmamızda kullandığımız MGMT inhibitör konsantrasyonu 50 µM'dır. Bu konsantrasyon klinik kullanımla uyumlu bir konsantrasyondur (Ranson ve ark., 2006). Konduri ve ark. (2009), kullandıkları MGMT inhibitörü O⁶-BG ile MGMT ekspresyonunu azaltırken p53 ekspresyonunu da arttırdığını belirtmiştir. Bizim

çalışmamızda da Lomeguatrib'in MGMT ekspresyonunu azatırken p53 ekspresyonunda artış olduğu ancak bunun hastalara göre değiştiği saptanmıştır. Konduri ve ark. (2009), MGMT ekspresyonundaki azalmanın ve p53 ekspresyonundaki artışın siklinlerin (siklin B1, B2, A) ekspresyonlarının azalması ve p21 ekspresyonundaki artışla birliktelik gösterdiğini ve O⁶-BG'nin hücrede apoptoza tetiklediği belirtmektedir. Bizim çalışmamızda yapılan akım sitometri ve tek hücre jel elektroforezi çalışmaları hücrelerin apoptoza sürüklendiği ve DNA fragmentasyonunun arttığı tespit edilmiştir. Bu noktadan ele alındığında O⁶-BG'nin pankreas kanser hücrelerinde yaptığı etkinin Lomeguatrib'in GBM hücrelerinde yaptığı etkiyle uyumlu olduğu görülmektedir. Ayrıca, bu tez çalışmasında Lomeguatrib TMZ kombinasyonunun hücre döngüsü üzerine her hangi bir etkisinin olmadığı da gösterilmiştir.

MGMT inhibitörlerinin alkilasyon ajanlarıyla kullanımında ortaya çıkan en büyük yan etki myeloid seri hücrelerinin baskılanmasıdır. Bu sorun, MGMT inhibitörlerine dirençli mutant MGMT geni transdüksiyonu yapılmış hematopoietik progenitör hücreleri oluşturularak aşılabilir (Konduri ve ark., 2009). Böylece MGMT inhibitörlerinin olabilecek toksik etkilerinde hematopoietik kök hücreler seçici olarak korunmuş olur. Woolford ve ark. (2006), K562 insan hematopoietik hücrelerine P140K mutant MGMT geni transfer ederek, *in vitro* ve *in vivo* modellerde bu hücrelerin Lomeguatrib-TMZ ve O⁶-BG-TMZ kombinasyonuna direnç gösterdiğini belirtmektedirler.

Bu tez çalışması kurgusu ve sonuçlarıyla literatürdeki ilk çalışmadır. Lomeguatrib GBM primer hücre kültürlerinde ve GBM hücre dizilerinde ilk kez kullanılmıştır. Lomeguatrib'in MGMT ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı ve p53 ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır. Her hastanın kendine özgü IC₅₀ değerinde kullanılan dozlarla elde edilen sonuçlar GBM'in genetik açıdan heterojen bir yapısının olduğu bilgisini desteklerken, Lomeguatrib TMZ kombinasyonunun GBM tedavisinde kullanılabileceğini göstermiş ve her hastaya göre farklı doz ayarlaması gerekliliğini açıkça ortaya koyan önemli sonuçlara ulaşılmıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında,

- ÷ GBM hastalarına ait primer kültür başarıyla elde edilmiştir.
- ÷ MGMT inhibitörü olan Lomeguatrib GBM primer kültür hücrelerinde ve GBM hücre dizilerinde **ilk kez** kullanılmıştır.
- ÷ Lomeguatrib ve TMZ kombinasyonu GBM primer kültür hücrelerinde ve GBM hücre dizilerinde **ilk defa** kullanılmıştır.
- ÷ GBM hastalarının Lomeguatrib ve TMZ'ye olan duyarlılıklarının farklı olduğu gösterilmiştir.
- ÷ GBM hastalarının genomik heterojeniteye sahip olduğu görüşü bu çalışmayla desteklemiştir.
- ÷ Her hastanın TMZ ve Lomeguatrib kombinasyonuna olan duyarlılıklarının farklılık gösterdiği ilk kez bu çalışmayla gösterildi.
- ÷ Ameliyat olan GBM hastalarının alkilasyon ajanlarıyla tedavisinde, hastaların farklı alkilasyon ajanlarına duyarlılıklarının, hastaların tümör dokularından yapılacak primer kültürlerinde saptanmasının tedavi başlangıcında doğru bir yaklaşım olacağı önerilmiştir.
- ÷ GBM hastalarının TMZ duyarlılıklarında MGMT gen metilasyonunun önemli olduğu gösterilmiştir.
- ÷ Lomeguatrib'in GBM tedavisinde direnç gelişiminde en önemli rolü oynayan MGMT geninin ekspresyonunu azalttığı **ilk defa** gösterilmiştir ve etkinin metilasyon üzerinden yapmadığı belirlenmiştir.
- ÷ Lomeguatrib'in p53 ekspresyonunu arttırdığı **ilk defa** gösterilmiştir.
- ÷ Lomeguatrib ve TMZ'nin yalnız veya birlikte kullanımlarının GBM primer hücre kültürlerinde ve GBM hücre dizilerinde MGMT metilasyon yapısını değiştirmeden etki gösterdiği ilk kez bu çalışmayla gösterilmiştir.
- ÷ Lomeguatrib ve TMZ kombinasyonunun her hastaya farklı dozlarda olmak üzere GBM hastalarında kullanıldığında tümörde apoptozun tetiklenmesinde rol oynayabileceği gösterilmiştir.

÷ Lomeguatrib ve TMZ kombinasyonunun GBM tedavisinde etkin olarak kullanılabileceği ilk kez gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında, GBM hastalarından elde edilen primer kültürlerinde ve GBM hücre dizilerinde Lomeguatrib ve TMZ moleküllerinin MGMT metilasyonu ve ekspresyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Yapılan primer kültür yönteminin etkinliği aynı tümör dokusunda 3 boyutlu kültür gibi kültür yöntemleri de denenerek araştırılabilir.

Elde edilen ve üreme potansiyeli olan hücrelerin tümörjenik olup olmadığı immün sistemi baskılanmış farelere aktarılarak araştırılacaktır.

Daha fazla sayıda primer kültürler ve bu primer kültürlerden 3 boyutlu kültürler elde edilerek bunlar üzerinde Lomeguatrib veya diğer MGMT inhibitörlerinin ve alkilasyon ajanlarının etkileri araştırılabilir. Yine bu kültürlerde tedavide yeni aday moleküller kullanılabilir.

Ayrıca elde edilecek çok sayıdaki primer kültürlerde ve 3 boyutlu kültürlerde geniş epigenomik araştırmalar yapılarak tedavide etkin rol oynayabilecek aday genler ortaya çıkarılabilir.

Yalnızca MGMT değil, alkilasyon ajanlarına karşı direnç oluşturabileceği düşünülen diğer genlerde (MLH, MSH, PMS, MDR, v.b) yapısal, transkripsiyonel ve epigenomik açıdan araştırılabilir. Bu sayede gerçek ve ortak bir direnç mekanizması ortaya konabilir.

Primer kültürler çoğaltılarak ve karakterize edilerek yeni hücre dizileri oluşturulabilir.

ÖZET

Primer Glioblastoma Multiforme Tümör Hücrelerinde Lomeguatrib Temozolomid Kombinasyonunun MGMT Metilasyonu ve Ekspresyonuna Etkisi

Glioblastoma Multiforme (GBM) en malin astrositik beyin tümörüdür. GBM'in alkilasyon ajanlarıyla tedavisinde, yaygın olarak Temozolomid (TMZ) kullanılmaktadır. Ancak, hastalarda, TMZ tedavisi sırasında kemoterapötik direnç gelişebilmektedir. Kemoterapötik direncin nedenlerinin başında MGMT (O⁶-Metilguanin- DNA-Metiltransferaz) tamir enzimi gelmektedir. MGMT, DNA'da TMZ'nin alkil eklentilerini kaldırarak bunların toksik etkilerinin oluşumunu engeller. MGMT inhibitörleriyle MGMT inhibisyonunun yapılması TMZ direncinin ortadan kaldırılmasında önemli bir anti kanser tedavi yaklaşımıdır. Bugüne kadar, GBM tedavisinde, MGMT inhibitörü Lomeguatrib'in TMZ ile kombinasyonunun, MGMT ekspresyonuna ve metilasyonuna etkisine ilişkin literatür bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, GBM primer hücre kültürlerinde ve GBM hücre dizilerinde Lomeguatrib TMZ kombinasyonunun MGMT metilasyonuna ve ekspresyonuna etkisini araştırmaktır.

Bu kapsamda, GBM tümör dokularından primer kültür elde edilmiştir. Primer hücre kültürlerinin ve GBM hücre dizilerinin TMZ'ye ve TMZ ve Lomeguatrib kombinasyonuna olan duyarlılıkları MTT ile belirlenmiştir. Hücre kültüründe, her hücreye TMZ ve Lomeguatrib kombinasyonunda saptanan IC₅₀ değerinde ilaç verildikten sonra MGMT ve p53 ekspresyonları ve MGMT metilasyonu araştırılmıştır. Ayrıca, hücrelerde ilaç sonrası apoptoz oranı ve DNA fragmantasyonu incelenmiştir.

Bu çalışmada, tümörün *in vivo* özelliklerini en fazla yansıtan primer hücre kültürlerinde araştırmalar yapılmıştır. GBM hastalarının TMZ'ye ve TMZ Lomeguatrib kombinasyonuna olan duyarlılıklarının farklı olduğu ve TMZ duyarlılığında MGMT metilasyonunun etkili olduğu belirlenmiştir. İlk kez, bu tez çalışmasıyla, GBM primer kültürlerinde ve GBM hücre dizilerinde Lomeguatrib TMZ kombinasyonunun MGMT ekspresyonunu düşürdüğü, genel olarak p53 ekspresyonunun arttırdığı ve MGMT metilasyonunu değiştirmedeği saptanmıştır. GBM'in heterojen genetik yapısı nedeniyle, her hastaya standart bir doz kullanmak yerine, hastaların TMZ ile tedavi öncesinde, TMZ'ye olan duyarlılıklarının, tedavide direnç oluşturabilen genlerin epigenomik yapılarının ve ekspresyon miktarlarının araştırılmasıyla belirlenmesi gerektiği önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma Multiforme, Lomeguatrib, MGMT, Primer Hücre Kültürü, Temozolomid.

SUMMARY

The Effect of Lomeguatrib-Temozolomide Combination upon MGMT Promoter Methylation and its Expression on Primary Glioblastoma Multiforme Tumour Cells

Glioblastoma Multiforme (GBM) is the most malignant astrocytic brain tumor. TMZ is commonly used in the treatment of GBM with alkylation agents. But, chemotherapeutic resistance may develop during TMZ therapy in patients. MGMT (O⁶-Methylguanine- DNA-Methyltransferase) repair enzyme is foremost of factors causing to chemotherapeutic resistance. MGMT prevents the formation of toxic effects of alkyl adducts by removing alkyl adducts in DNA. The MGMT inhibition with MGMT inhibitors is an important anticancer therapeutic approach in removing TMZ resistance. So far, there is no literature that concerning the effect of the combination of Lomeguatrib with TMZ onto MGMT expression and its methylation. The aim of the study is to investigate the effect of the combination of Lomeguatrib with TMZ onto MGMT expression and its methylation.

In this context, primary cultures have been obtained from GBM tumor tissues. The sensitivity of primary cell cultures and GBM cell lines to TMZ and also to the combination of TMZ and Lomeguatrib has been determined by MTT. MGMT and p53 expressions, MGMT methylation have been investigated after drug application to each cells at the specific IC₅₀ value which was determined on the combination of TMZ and Lomeguatrib. Also, the proportion of apoptotic cells and DNA fragmentation after drug application has been analyzed. ☒

In this study, the researches have been done on the primary cell cultures which reflect the *in vivo* characteristics of tumors mostly. It has been determined that the sensitivity of GBM patients to TMZ and the combination of TMZ and Lomeguatrib are different and the MGMT methylation is efficient on TMZ sensitivity. This the first study which shows the combination of TMZ and Lomeguatrib in GBM primary cell culture and GBM cell lines decreases the MGMT expression, increases p53 expression and does not change the MGMT methylation. Because of the heterogenic of GBM genetic structure, the sensitivity of TMZ should be determined by investigating the epigenomic structures of genes which can cause resistance in the treatment of patients and the amount of expressions before the treatment of patients with TMZ instead of using standard dose for each patient.

Key Words: Glioblastoma Multiforme, Lomeguatrib, MGMT, Primary Cell Culture, Temozolomide

KAYNAKLAR

- ADAMSON, C., KANU, O.O., MEHTA, A.I., DI, C., LIN, N., MATTOX, A.A., BIGNER, D.D. (2009) Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert opinion on investigational drugs*, 18(8):1061-1083.
- AGARWALA, S.S., KIRKWOOD, J.M. (2000). Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma. *The Oncologist*, 5:144-151.
- ALLEN, N.J., BARRES, B.A. (2009). Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*, 457(7230):675-7.
- AZEVEDO, F.A., CARVALHO, L.R., GRINBERG L.T., FARFEL, J.M., FERRETTI, R.E., LEITE, R.E., JACOB FILHO, W., LENT, R., HERCULANO-HOUZEL, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *The journal of comparative neurology*, 10;513(5):532-41.
- BAKİR, A., GEZEN, F., YİLDİZ, O., AYHAN, A., KAHRAMAN, S., KRUSE, C.A., VARELLA-GARCÍA, M., YİLDİZ, F., KUBAR, A. (1998). Establishment and characterization of a human glioblastoma multiforme cell line. *Cancer genetics and cytogenetics*, 103(1):46-51.
- BARRES, B.A. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*, 6;60(3):430-40.
- BARVAUX, V.A., LORIGAN, P., RANSON, M., GILLUM, A.M., MCELHINNEY, R.S., MCMURRY, T.B., MARGISON, G.P. (2004). Sensitization of a human ovarian cancer cell line to temozolomide by simultaneous attenuation of the Bcl-2 antiapoptotic protein and DNA repair by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Molecular Cancer Therapy*, 3(10):1215-20.
- BENEKE, S., BÜRKLE, A. (2004). Poly(ADP-ribosyl)ation, PARP, and aging. *Science of aging knowledge environment : SAGE K*,49:1-8.
- BISWAS, T., RAMANA, C.V., SRINIVASAN, G., BOLDOGH, I., HAZRA, T.K., CHEN, Z., TANO, K., THOMPSON, E.B., MITRA, S. (1999). Activation of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene by glucocorticoid hormone. *Oncogene*, 18(2):525-32.
- BLOUGH, M.D., BEAUCHAMP, D.C., WESTGATE, M.R., KELLY, J.J., CAIRNCROSS, J.G. (2010). Effect of aberrant p53 function on temozolomide sensitivity of glioma cell lines and brain tumor initiating cells from glioblastoma. *Journal of neurooncology*. Baskida.
- BLUMENTHAL, D.T., SCHULMAN, S.F. (2005). Survival outcomes in glioblastoma multiforme, including the impact of adjuvant chemotherapy. *Expert review of neurotherapeutics*, 5(5):683-90.
- BOCANGEL, D., SENGUPTA, S., MITRA, S., BHAKAT, K.K. (2009). p53-Mediated down-regulation of the human DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) via interaction with Sp1 transcription factor. *Anticancer Research*, 29(10):3741-50.
- BOUTERFA, H., PİCHT, T., KESS, D., HERBOLD, C., NOLL, E., BLACK, P.M., ROOSEN, K., TONN, J.C. (2000). Retinoids inhibit human glioma cell proliferation and migration in primary cell cultures but not in established cell lines. *Neurosurgery*, 46(2):419-30.
- BREDEL, M. (2001). Anticancer drug resistance in primary human brain tumors. *Brain research. Brain research reviews*, 35(2):161-204.
- BRYANT, H.E., HELLEDAY, T. (2004). Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors as potential chemotherapeutic agents. *Biochemical Society transactions*, 32(Pt 6):959-61.
- CAPORASO, P., TURRIZIANI, M., VENDITTI, A., MARCHESI, F., BUCCISANO, F., TIRINDELLI, M.C., ALVINO, E., GARBIN, A., TORTORELLI, G., TOPPO, L., BONMASSAR, E., D'ATRI, S., AMADORI, S. (2007). Novel role of triazines in haematological malignancies: pilot study of Temozolomide, Lomeguatrib and IL-2 in the chemotherapeutic of acute leukaemia. *DNA Repair*, 6(8):1179-86.

- CLARKE, J.W., CHANG, E.L., LEVIN, V.A., MAYR, N.A., HONG, E., CAVALIERE, R., Lo, S.S. (2008). Optimizing radiotherapy schedules for elderly glioblastoma multiforme patients. *Expert review of anticancer therapy*, 8(5):733-41.
- CLEMONS, M., KELLY, J., WATSON, A.J., HOWELL, A., MCELHINNEY, R.S., MCMURRY, T.B., MARGISON, G.P. (2005). O6-(4-bromothienyl) guanine reverses temozolomide resistance in human breast tumour MCF-7 cells and xenografts. *British Journal of Cancer*, 93(10):1152-6.
- CURTIN, N. (2007). Therapeutic potential of drugs to modulate DNA repair in cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 11(6):783-99.
- DANAM, R.P., QIAN, X.C., HOWELL, S.R., BRENT, T.P. (1999). Methylation of selected CpGs in the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter region as a marker of gene silencing. *Molecular carcinogenesis*, 24(2):85-9.
- DAVALOS, D., GRUTZENDLER, J., YANG, G., KIM, J.V., ZUO, Y., YUNG, S., LITMANN, D.R., DUSTIN, M.L., GAN, W.B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, 8(6):752-758.
- DE WITT HAMER, P.C., VAN TILBORG, A.A., EIJK, P.P., SMİNIA, P., TROOST, D., VAN NOORDEN, C.J., YLSTRA, B., LEENSTRA, S. (2008). The genomic profile of human malignant glioma is altered early in primary cell culture and preserved in spheroids. *Oncogene*, 27:27(14):2091-6.
- DEANGELIS LM. (2001). Brain tumors. *The New England Journal of Medicine*, 344(2):114-23.
- Dİ TOMASO, E., PANG, J.C., LAM, H.K., TIAN, X.X., SUEN, K.W., HUI, A.B., HJELM, N.M. (2000). Establishment and characterization of a human cell line from paediatric cerebellar glioblastoma multiforme. *Neuropathology and applied neurobiology*, 26(1):22-30.
- DOLAN, M.E., PEGG, A.E. (1997). O6-benzylguanine and its role in chemotherapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 3(6):837-47.
- DRABLØS, F., FEYZI, E., AAS, P.A., VAAGBØ, C.B., KAVLI, B., BRATLIE, M.S., PEÑADIAZ, J., OTTERLEI, M., SLUPPHAUG, G., KROKAN, H.E. (2004). Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair*, 3(11):1389-407.
- DUNN, J., BABORIE, A., ALAM, F., JOYCE, K., MOXHAM, M., SIBSON, R., CROOKS, D., HUSBAND, D., SHENOY, A., BRODBELT, A., WONG, H., LILOGLOU, T., HAYLOCK, B., WALKER, C. (2009). Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *British journal of cancer*, 101(1):124-31.
- DURMAZ, R., VURAL, M. (2007). Primer ve Sekonder Glioblastoma Multiforme Genetiği. *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 17(2):80-90.
- ESTELLER, M., GARCÍA-FONCILLAS, J., ANDİON, E., GOODMAN, S.N., HİDALGO, O.F., VANACLOCHA, V., BAYLİN, S.B., HERMAN, J.G. (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *New England Journal of Medicine*, 343(19):1350-4.
- ESTELLER, M., HAMILTON, S.R., BURGER, P.C., BAYLIN, S.B., HERMAN, J.G. (1999). Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Research*, 59(4):793-7.
- ESTELLER, M., RİSQUES, R.A., TOYOTA, M., CAPELLA, G., MORENO, V., PEİNADO, M.A., BAYLİN, S.B., HERMAN, J.G. (2001). Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Research*, 61(12):4689-92.
- FAEL AL-MAYHANİ, T.M., BALL, S.L., ZHAO, J.W., FAWCETT, J., ICHİMURA, K., COLLİNS, P.V., WATTS, C. (2009). An efficient method for derivation and propagation of glioblastoma cell lines that conserves the molecular profile of their original tumours. *Journal of neuroscience methods*, 30;176(2):192-9.
- FRIEDMAN, H.S., KEIR, S., PEGG, A.E., HOUGHTON, P.J., COLVIN, O.M., MOSCHEL, R.C., BIGNER, D.D., DOLAN, M.E. (2002). O6-benzylguanine-mediated enhancement of chemotherapy. *Molecular Cancer Therapy*, 1(11):943-8.
- GAİTONDE, P., DASTUR, R., GOUR, R., RAO, V.B., NADKARNİ, J. (2008). Establishment and Characterization of Human Glioblastoma Derived Cell Line. *Journal of Neurological Sciences [Turkish]*, 25(4):17:258-265.

- GILES, G.G., GONZALES, M.F. (2001). *Brain tumors* (2nd Ed). Kaye, H.A., Laws, E.R. Harcourt Publishers, p.: 51-70.
- GRAZIANI, G., SZABÓ, C. (2005). Clinical perspectives of PARP inhibitors. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 52(1):109-18.
- GROMBACHER, T., EICHHORN, U., KAINA, B. (1998). p53 is involved in regulation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) by DNA damaging agents. *Oncogene*, 17(7):845-51.
- HAGEMANN, C., ANACKER, J., HAAS, S., RIESNER, D., SCHÖMIG, B., ERNESTUS, R.I., VİNCE, G.H. (2010). Comparative expression pattern of Matrix-Metalloproteinases in human glioblastoma cell-lines and primary cultures. *BMC research notes*, 10;3:293.
- HANISH, U.K., KETTENMANN, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*.10, 1387-1394.
- HARRIS, L.C., REMACK, J.S., HOUGHTON, P.J., BRENT, T.P. Wild-type p53 suppresses transcription of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Research*, 56(9):2029-32.
- HEGI, M.E., LIU, L., HERMAN, J.G., STUPP, R., WICK, W., WELLER, M., MEHTA, M.P., GILBERT, M.R. (2008). Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(25):4189-99.
- HERMISSON, M., KLUMPP, A., WICK, W., WISCHHUSEN, J., NAGEL, G., ROOS, W., KAINA, B., WELLER, M. (2006). O⁶-Methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *Journal of Neurochemistry*, 96(3):766-776.
- HERRUP, K., YANG, Y. (2007). Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nature Reviews, Neuroscience*, 8(5):368-78.
- HOEIJMAKERS, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835):366-74.
- HORIGUCHI, M., KIM, J., MATSUNAGA, N., KAJI, H., EGAWA, T., MAKINO, K., KOYANAGI, S., OHDO, S. (2010). Glucocorticoid-dependent expression of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene modulates dacarbazine-induced hepatotoxicity in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 333(3):782-7.
- HSIEH, P., YAMANE, K. (2008). DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mechanisms of ageing and development*, 129(7-8):391-407.
- <http://neurosurgery.mgh.harvard.edu/newwhobt.htm#Neuroepithelial>
- IACOB, G., DINCA, E.B. (2009). Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *Journal of medicine and life*, 2(4):386-93.
- ISHIKAWA, T., ZHANG, S.S., QIN, X., TAKAHASHI, Y., ODA, H., NAKATSURU, Y., IDE, F. (2004). DNA repair and cancer: lessons from mutant mouse models. *Cancer Science*, 95(2):112-7.
- KABADERE, S., OZTOPÇU, P., KORKMAZ, S., EROL, K., UYAR, R. (2004). MgSO₄ and lazard (U-83836E) partially protects glioma cells against glutamate toxicity in vitro. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 64(4):461-6.
- KAINA B, MARGISON GP, CHRISTMANN M. (2010). Targeting O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Science: CMLS*, 67(21):3663-81.
- KAINA, B., CHRISTMANN, M., NAUMANN, S., ROOS, W.P. (2007). MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA repair*, 6(8):1079-1099.
- KANUGULA, S., GOODTZOVA, K., EDARA, S., PEGG, A.E. (1995). Alteration of arginine-128 to alanine abolishes the ability of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase to repair methylated DNA but has no effect on its reaction with O6-benzylguanine. *Biochemistry*, 34(21):7113-9.
- KARAYAN-TAPON, L., QUILLIEN, V., GUILHOT, J., WAGER, M., FROMONT, G., SAIKALI, S., ETCHEVERRY, A., HAMLAT, A., LOUSSOUARN, D., CAMPION, L., CAMPONE, M., VALLETTE, F.M., GRATAS-RABBIA-RÉ, C. (2010). Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods. *Journal of neuro-oncology*, 97(3):311-22.

- KARLSSON, U.L., LEIBEL, S.A., WALLNER, K., DAVIS, L.W., BRADY, L.W. (2004). *Principles and Practice of radiation oncology* (3rd Ed.). Perez, C.A., Brady, L.W. Lippincott Company, Philadelphia, Chapter 28, p.:791-838.
- KEFFORD, R.F., THOMAS, N.P., CORRIE, P.G., PALMER, C., ABDI, E., KOTASEK, D., BEITH, J., RANSON, M., MORTIMER, P., WATSON, A.J., MARGISON, G.P., MIDDLETON, M.R. (2009). A phase I study of extended dosing with lomeguatrib with temozolomide in patients with advanced melanoma. *British Journal of Cancer*, 100(8):1245-9.
- KHAN, O., MIDDLETON, M.R. (2007). The therapeutic potential of O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase inhibitors. *Expert opinion on investigational drugs*, 16(10):1573-1584.
- KHAN, O.A., RANSON, M., MICHAEL, M., OLVER, I., LEVITT, N.C., MORTIMER, P., WATSON, A.J., MARGISON, G.P., MIDGLEY, R., MIDDLETON, M.R. (2008). A phase II trial of lomeguatrib and temozolomide in metastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 98(10):1614-8.
- KHASRAW, M., LASMANN, A.B. (2010). Advances in the treatment of malignant gliomas. *Current Oncology Reports*, 12(1):26-13.
- KHURANA, V.G., TEO, C., KUNDI, M., HARDELL, L., CARLBERG, M. (2009). Cell phones and brain tumors: a review including the long-term epidemiological data. *Surgical neurology*, 72(3):205-14.
- KIM, L., GLANTZ, M. (2006). Chemotherapeutic options for primary brain tumors. *Current treatment options in oncology*, 7(6):467-78.
- KÍTANGE, G.J., CARLSON, B.L., MLADEK, A.C., DECKER, P.A., SCHROEDER, M.A., WU, W., GROGAN, P.T., GIANNINI, C., BALLMAN, K.V., BUCKNER, J.C., JAMES, C.D., SARKARÍA, J.N. (2009). Evaluation of MGMT promoter methylation status and correlation with temozolomide response in orthotopic glioblastoma xenograft model. *Journal of neuro-oncology*, 92(1):23-31.
- KLEIHUES, P., BURGER, P.C., SCHEITHAUER, B.W. (1993). The new WHO classification of brain tumours. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 3(3):255-68.
- KLEIHUES, P., LOUIS, D.N., WIESTLER O.D., BURGER, P.C., SCHEITHAUER, B.W. (2007). *WHO classification of tumours of the central nervous system* (4th Ed.). Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K. International Agency for Research on Cancer (IARC) Lyon, p.:10-11.
- KOKKINAKIS, D.M., AHMED, M.M., CHENDIL, D., MOSCHEL, R.C., PEGG, A.E. (2003). Sensitization of pancreatic tumor xenografts to carmustine and temozolomide by inactivation of their O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase with O⁶-benzylguanine or O⁶-benzyl-2'-deoxyguanosine. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9:3801-7.
- KONDURI, S.D., TICKU, J., BOBUSTUC, G.C., SUTPHIN, R.M., COLON, J., ISLEY, B., BHAKAT, K.K., SRIVENUGOPAL, K.S., BAKER, C.H. (2009). Blockade of MGMT expression by O⁶ benzyl guanine leads to inhibition of pancreatic cancer growth and induction of apoptosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(19):6087-95.
- KRAKSTAD, C., CHEKENYA, M. (2010). Survival signaling and apoptosis resistance in glioblastoma: oppurtunities for targeted therapeutics. *Molecular cancer*, 9:135.
- KREX, D., KLINK, B., HARTMANN, C., VON DEIMLING, A., PIETSCH, T., SIMON, M., SABEL, M., STEINBACH, J.P., HEESE, O., REIFENBERGER, G., WELLER, M., SCHACKERT, G. (2007). Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain: a journal of neurology*, 130:2596-606.
- KUNKEL, T.A., ERIE, D.A. DNA mismatch repair. (2005). *Annual Review Biochemistry*, 74:681-710.
- LECLERE, M.M., NISHIOKA, M., YUASA, T., FUJIWARA, S., TAKAGI, M., IMANAKA, T. (1998). The O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. KOD1: a thermostable repair enzyme. *Molecular & general genetics : MGG*, 258(1-2):69-77.
- LEE, C.H., JUNG, K.W., YOO, H., PARK, S., LEE, S.H. (2010). Epidemiology of primary brain and central nervous system tumors in Korea. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 48(2):145-52.

- LEVIN, V.A., LEIBEL, S.A., GUTIN, P.H. (2001). *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (6th Ed). DeVita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.:2100-60.
- LOISEAU, H., HUCHET, A., RUÉ, M., COWPLI-BONY, A., BALDI, I. (2009). Epidemiology of primary brain tumor. *Revue neurologique*, 165(8-9):650-70.
- LOUIS, D.N., OHGAKI, H., WIESTLER, O.D., CAVENEE, W.K., BURGER, P.C., JOUVET, A., SCHEITHAUER, B.W., KLEIHUES, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 114(2):97-109.
- MARCHESI, F., TURRIZIANI, M., TORTORELLI, G., AVVISATI, G., TORINO, F., DE VECCHIS, L. (2007). Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 56(4):275-87.
- MCELHINNEY, R.S., DONNELLY, D.J., MCCORMICK, J.E., KELLY, J., WATSON, A.J., RAFFERTY, J.A., ELDER, R.H., MIDDLETON, M.R., WILLINGTON, M.A., MCMURRY, T.B., MARGISON, G.P. (1998). Inactivation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. 1. Novel O6-(hetaryl methyl)guanines having basic rings in the side chain. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(26):5265-71.
- MIDDLETON, M.R., KELLY, J., THATCHER, N., DONNELLY, D.J., MCELHINNEY, R.S., MCMURRY, T.B., MCCORMICK, J.E., MARGISON, G.P. (2000). O(6)-(4-bromothienyl)guanine improves the therapeutic index of temozolomide against A375M melanoma xenografts. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 15;85(2):248-52.
- MIDDLETON, M.R., THATCHER, N., MCMURRY, T.B., MCELHINNEY, R.S., DONNELLY, D.J., MARGISON, G.P. (2002). Effect of O6-(4-bromothienyl)guanine on different temozolomide schedules in a human melanoma xenograft model. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 100(5):615-7.
- MITRA, S. (2007). MGMT: a personal perspective. *DNA Repair*, 6(8):1064-70.
- NAKAMURA M, WATANABE T, YONEKAWA Y, KLEIHUES P, OHGAKI H. (2001). Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis*, 22(10):1715-9.
- OMAY, S.B., VOGELBAUM, M.A. (2009). Current concepts and newer developments in the treatment of malignant gliomas. *Indian Journal of Cancer*, 46(2):88-95.
- OSANAI, T., TAKAGI, Y., TORIYA, Y., NAKAGAWA, T., ARUGA, T., IIDA, S., UETAKE, H., SUGIHARA, K. (2005). Inverse correlation between the expression of O6-methylguanine-DNA methyl transferase (MGMT) and p53 in breast cancer. *Japanese journal of clinical oncology*, 35(3):121-5.
- PAGANI, E., FALCINELLI, S., PEPPONI, R., TURRIZIANI, M., CAPORASO, P., CAPORALI, S., BONMASSAR, E., D'ATRI, S. (2007). Combined effect of temozolomide and hyperthermia on human melanoma cell growth and O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity. *International Journal of Oncology*, 30(2):443-51.
- PARSONS, D.W., JONES, S., ZHANG, X., LIN, J.C., LEARY, R.J., ANGENENDT, P., MANKOO, P., CARTER, H., SIU, I.M., GALLIA, G.L., OLIVI, A., MCLENDON, R., RASHEED, B.A., KEIR, S., NIKOLSKAYA, T., NIKOLSKY, Y., BUSAM, D.A., TEKLEAB, H., DIAZ LA ,J.R., HARTIGAN, J., SMITH, D.R., STRAUSBERG, R.L., MARIE, S.K., SHINJO, S.M., YAN, H., RIGGINS, G.J., BIGNER, D.D., KARCHIN, R., PAPADOPOULOS, N., PARMIGIANI, G., VOGELSTEIN, B., VELCULESCU, V.E., KINZLER, K.W. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science (New York, N.Y.)*, 321:1807-1812.
- PAZ, M.F., YAYA-TUR, R., ROJAS-MARCOS, I., REYNES, G., POLLAN, M., AGUIRRE-CRUZ, L., GARCÍA-LOPEZ, J.L., PÍQUER, J., SAFONT, M.J., BALAÑA, C., SANCHEZ-CEPEDES, M., GARCÍA-VILLANUEVA, M., ARRÍBAS, L., ESTELLER, M. (2004). CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10(15):4933-8.
- PÉDEBOSCQ, S., L'AZOU, B., LIGUORO, D., POMETAN, J.P., CAMBAR, J. (2007). Interindividual differences in anticancer drug cytotoxicity in primary human glioblastoma cells. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie*, 58(4):247-53.

- PRASAD, G., HAAS-KOGAN, D.A. (2009). Radiation-induced gliomas. *Expert review of neurotherapeutics*, 9(10):1511-7.
- PREUSSER, M. (2009). MGMT analysis at DNA, RNA and protein levels in glioblastoma tissue. *Histology and histopathology*, 24(4):511-8.
- QIN, K., JIANG, X., ZOU, Y., WANG, J., QIN, L., ZENG, Y. (2010). Study on the proliferation and drug-resistance of human brain tumor stem-like cells. *Cellular and molecular neurobiology*, 30(6):955-60.
- RANSON, M., HERSEY, P., THOMPSON, D., BEITH, J., MCARTHUR, G.A., HAYDON, A., DAVIS, I.D., KEFFORD, R.F., MORTIMER, P., HARRIS, P.A., BAKA, S., SEEBARAN, A., SABHARWAL, A., WATSON, A.J., MARGISON, G.P., MIDDLETON, M.R. (2007). Randomized trial of the combination of lomeguatrib and temozolomide compared with temozolomide alone in chemotherapy naive patients with metastatic cutaneous melanoma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 5(18):2540-5.
- RANSON, M., MIDDLETON, M.R., BRIDGEWATER, J., LEE, S.M., DAWSON, M., JOWLE, D., HALBERT, G., WALLER, S., MCGRATH, H., GUMBRELL, L., MCELHINNEY, R.S., DONNELLY, D., MCMURRY, T.B., MARGISON, G.P. (2006). Lomeguatrib, a potent inhibitor of O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase: phase I safety, pharmacodynamic, and pharmacokinetic trial and evaluation in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(5):1577-84.
- RHINES, L.D., SAMPATH, P., DOLAN, M.E., TYLER, B.M., BREM, H., WEINGART, J. (2000). O6-benzylguanine potentiates the antitumor effect of locally delivered carmustine against an intracranial rat glioma. *Cancer Research*, 60(22):6307-10.
- ROLHION, C., PENAULT-LLORCA, F., KEMENY, J.L., KWIATKOWSKI, F., LEMAIRE, J.J., CHOLLET, P., FINAT-DUCLOS, F., VERRELLE, P. (1999). O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene (MGMT) expression in human glioblastomas in relation to patient characteristics and p53 accumulation. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 84(4):416-20.
- ROOS, W.P., BATISTA, L.F., NAUMANN, S.C., WICK, W., WELLER, M., MENCK, C.F., KAINA, B. (2007). Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene*, 26(2):186-97.
- ROSELL, R., DE LAS PENAS, R., BALANA, C., SANTARPIA, M., SALAZAR, F., DE AGUIRRE, I., REGUART, N., VILLA, J., WEI, J., RAMIREZ, J.L., MOLINA, M.A., Y CAJAL, S.R., JABLONS, D., TARON, M. (2008). Translational research in glioblastoma multiforme: molecular criteria for patient selection. *Future Oncology (London, England)*, 4(2):219-228.
- SABHARWAL, A., CORRIE, P.G., MIDGLEY, R.S., PALMER, C., BRADY, J., MORTIMER, P., WATSON, A.J., MARGISON, G.P., MIDDLETON, M.R. (2010). A phase I trial of lomeguatrib and irinotecan in metastatic colorectal cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 66(5):829-35.
- SARKAR, C., JAIN, A., SURI, V. (2009). Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian Journal of Cancer*, 46(2):108-119.
- SARKARIA, J.N., KITANGE, G.J., JAMES, C.D., PLUMMER, R., CALVERT, H., WELLER, M., WICK, W. (2008). Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(10):2900-8.
- SATHORNSUMETEE, S., RICH, J.N. (2008). Designer Therapies for Glioblastoma Multiforme. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1142:108-132.
- SCHOFIELD M.J., HSIEH P. (2003). DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annual Review Microbiology*, 57:579-608.
- SCHOLD SC, J.R., KOKKINAKIS, D.M., CHANG, S.M., BERGER, M.S., HESS, K.R., SCHIFF, D., ROBINS, H.I., MEHTA, M.P., FINK, K.L., DAVIS, R.L., PRADOS, M.D. (2004). O6-benzylguanine suppression of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in anaplastic gliomas. *Neuro-Oncology*, 6(1):28-32.
- SEITER, K., LIU, D., LOUGHRAN, T., SIDDIQUI, A., BASKIND, P., AHMED, T. (2002). Phase I study of temozolomide in relapse/refractory acute leukemia. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(15):3249-53.

- SHAH, S.N., HILE, S.E., ECKERT, K.A. (2010). Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias, and variability in clinical cancer phenotypes. *Cancer Research*, 70(2):431-5.
- SMITH, K.A., ASHBY, L.S., GONZALEZ, L.F., BRACHMAN, D.G., THOMAS, T., COONS, S.W., BATTAGLIA, M., SCHECK, A. (2008) Prospective trial of gross-total resection with Gliadel wafers followed by early postoperative Gamma Knife radiosurgery and conformal fractionated radiotherapy as the initial treatment for patients with radiographically suspected, newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Journal of Neurosurgery, Supplement*, 109:106-17.
- SOFRONIEW, M.V., VINTERS, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119:7-35.
- SRIVENUGOPAL, K.S., SHOU, J., MULLAPUDI, S.R., LANG FF, J.R., RAO, J.S., ALI-OSMAN, F. (2001). Enforced expression of wild-type p53 curtails the transcription of the O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene in human tumor cells and enhances their sensitivity to alkylating agents. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 7(5):1398-409.
- STUPP, R., HEGI, M.E., GILBERT, M.R., CHAKRAVARTI, A. (2007). Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 10;25(26):4127-36.
- STUPP, R., MASON, W.P., VAN DEN BENT, M.J., WELLER, M., FISHER, B., TAPHOORN, M.J., BELANGER, K., BRANDES, A.A., MAROSI, C., BOGDHANN, U., CURSCHMANN, J., JANZER, R.C., LUDWIN, S.K., GORLIA, T., ALLGEIER, A., LACOMBE, D., CAIRNCROSS, J.G., EISENHAEUER, E., MIRIMANOFF, R.O. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *The New England Journal of Medicine*, 352(10):987-96
- SWEASY, J.B., LANG, T., DIMAIO, D. (2006). Is base excision repair a tumor suppressor mechanism? *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 5(3):250-9.
- TATTER, S.B. (2010). The new WHO Classification of Tumors affecting the Central Nervous System. Erişim, [<http://neurosurgery.mgh.harvard.edu/newwhobt.htm>]. Erişim tarihi: 20.08.2010.
- TENTORI, L., LEONETTI, C., SCARSELLA, M., D'AMATI, G., VERGATI, M., PORTARENA, I., XU, W., KALISH, V., ZUPI, G., ZHANG, J., GRAZIANI, G. (2003). Systemic administration of GPI 15427, a novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, increases the antitumor activity of temozolomide against intracranial melanoma, glioma, lymphoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9(14):5370-9.
- TENTORI, L., MUZI, A., DORIO, A.S., SCARSELLA, M., LEONETTI, C., SHAH, G.M., XU, W., CAMAIONI, E., GOLD, B., PELLICCIARI, R., DANTZER, F., ZHANG, J., GRAZIANI, G. (2010). Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activity in PARP-1 silenced tumour cells increases chemosensitivity to temozolomide and to a N3-adenine selective methylating agent. *Current Cancer Drug Targets*, 10(4):368-83.
- TUBBS, J.L., PEGG, A.E., TAINER, J.A. (2007). DNA binding, nucleotide flipping, and the helix-turn-helix motif in the base repair O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase and its implications for cancer chemotherapy. *DNA repair*, 6:1100-1115.
- TUBBS, J.L., LATYPOV, V., KANUGULA, S., BUTT, A., MELIKISHVILI, M., KRAEHNBUHL, R., FLECK, O., MARRIOTT, A., WATSON, A.J., VERBEEK, B., MCGOWN, G., THORNCROFT, M., SANTIBANEZ-KOREF, M.F., MILLINGTON, C., ARVAI, A.S., KROEGER, M.D., PETERSON, L.A., WILLIAMS, D.M., FRIED, M.G., MARGISON, G.P., PEGG, A.E., TAINER, J.A. (2009). Flipping of alkylated DNA damage bridges base and nucleotide excision repair. *Nature*, 459(7248):808-13.
- TURRIZIANI, M., CAPORASO, P., BONMASSAR, L., BUCCISANO, F., AMADORI, S., VENDITTI, A., CANTONETTI, M., D'ATRI, S., BONMASSAR, E. (2006). O6-(4-bromophenyl)guanine (PaTrin-2), a novel inhibitor of O6-alkylguanine DNA alkyl-transferase, increases the inhibitory activity of temozolomide against human acute leukaemia cells in vitro. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 53(4):317-23.
- TUTEJA, N., TUTEJA, R. (2001). Unraveling DNA repair in human: molecular mechanisms and consequences of repair defect. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 36(3):261-90.

- VAN NĪFTERĪK, K.A., VAN DEN BERG, J., VAN DER MEĪDE, W.F., AMEZĪANE, N., WEDEKĪND, L.E., STEENBERGEN, R.D., LEENSTRA, S., LAFLEUR, M.V., SLOTMAN, B.J., STALPERS, L.J., SMĪNĪA, P. (2010). Absence of the MGMT protein as well as methylation of the MGMT promoter predict the sensitivity for temozolomide. *British journal of cancer*, 103(1):29-35.
- VAN NOORT, J.M. (2006). Human glial cell culture models of inflammation in the central nervous system. *Drug Discovery Today*, 11(1-2):74-80.
- VERBEEK, B., SOUTGATE, T.D., GILHAM, D.E., MARGISON, G.F. (2008). O6-methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy. *British Medical Bulletin*, 85:17-33.
- VERKHRATSKY, A.N., BUTT, A. (2007). *Glial neurobiology a textbook*. John Wiley & Sons, Chapter I, p.:3-12.
- VESELSKA, R., KUGLĪK, P., CEJPEK, P., SVACHOVA, H., NERADĪL, J., LOJA, T., RELĪCHOVA, J. (2006). Nestin expression in the cell lines derived from glioblastoma multiforme. *BMC Cancer*, 2:6:32.
- WAGNER, L.M., MCLENDON, R.E., YOON, K.J., WEISS, B.D., BILLUPS, C.A., DANKS, M.K. (2007). Targeting methylguanine-DNA methyltransferase in the treatment of neuroblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13:5418-25.
- WANG, J., WANG, X., JĪANG, S., LĪN, P., ZHANG, J., WU, Y., XĪONG, Z., REN, J.J., YANG, H. (2007). Establishment of a new human glioblastoma multiforme cell line (WJ1) and its partial characterization. *Cellular and molecular neurobiology*, 27(7):831-43.
- WATSON, A.J., MIDDLETON, M.R., MCGOWN, G., THORNCROFT, M., RANSON, M., HERSEY, P., MCARTHUR, G., DAVIS, I.D., THOMSON, D., BEITH, J., HAYDON, A., KEFFORD, R., LORIGAN, P., MORTIMER, P., SABHARWAL, A., HAYWARD, O., MARGISON, G.P. (2009). O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase depletion and DNA damage in patients with melanoma treated with temozolomide alone or with lomeguatrib. *British Journal of Cancer*, 100(8):1250-6.
- WATSON, A.J., SABHARWAL, A., THORNCROFT, M., MCGOWN, G., KERR, R., BOJANIĆ, S., SOONAWALLA, Z., KING, A., MĪLLER, A., WALLER, S., LEUNG, H., MARGISON, G.P., MIDDLETON, M.R. (2010). Tumor O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase inactivation by oral lomeguatrib. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(2):743-9.
- WATSON, P., LYNCH, H.T. (2001). Cancer risk in mismatch repair gene mutation carriers. *Familial Cancer*, 1(1):57-60.
- WEIL, R.J. (2006). Glioblastoma Multiforme-Treating a Deadly Tumor with Both Strands of RNA. *PLoS Medicine*, 3(1): e31.
- WICK, W., PLATTEN, M., WELLER, M. (2009). New (alternative) temozolomide regimens for the treatment of glioma. *Neuro-Oncology*, 11(1):69-79.
- WOOLFORD, L.B., SOUTHGATE, T.D., MARGISON, G.P., MĪLSOM, M.D., FAĪRBAĪRN, L.J. (2006). The P140K mutant of human O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) confers resistance in vitro and in vivo to temozolomide in combination with the novel MGMT inactivator O(6)-(4-bromophenyl)guanine. *The Journal of Gene Medicine*, 8(1):29-34.
- YOSHINO, A., OGINO, A., YACHI, K., OHTA, T., FUKUSHĪMA, T., WATANABE, T., KATAYAMA, Y., OKAMOTO, Y., NARUSE, N., SANO, E., TSUMOTO, K. (2010). Gene expression profiling predicts response to temozolomide in malignant gliomas. *International journal of oncology*, 36(6):1367-77.
- ZHANG, J., STEVENS, M.F., LAUGHTON, C.A., MADHUSUDAN, S., BRADSHAW, T.D. (2010). Acquired resistance to temozolomide in glioma cell lines: molecular mechanisms and potential translational applications. *Oncology*, 78(2):103-14.
- ZHANG, L., YAMANE, T., SATOH, E., AMAGASAKĪ, K., KAWATAKĪ, T., ASAHARA, T., FURUYA, K., NUKUĪ, H., NAGANUMA, H. (2005). Establishment and partial characterization of five malignant glioma cell lines. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 25(2):136-43.

EKLER

EK-1

BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

Hastalığınızın gelişimi ile ilgili genetik nedenleri bulmak için yeni bir bilimsel araştırma yapmaktayız. Bu form, katılmanız önerilen araştırma ile ilgili olarak sizi bilgilendirmek üzere hazırlanmıştır. Hemen söyleyelim ki araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Formun düzenlenmesinde, araştırmaya katılıp katılmama konusunda karar vermenizin kolaylaştırılması hedeflenmiştir. Yeterli görmediğiniz açıklamalar ya da sorularınız varsa, bu formu okuduktan sonra araştırmacıya sorabilirsiniz. Aşağıda yer alan bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Araştırmanın ismi, “Primer Glioblastoma Multiforme Tümör Hücrelerinde Lomegatrib Temozolomid Kombinasyonunun MGMT Promotor Metilasyonu ve Ekspresyonu Üzerine Etkisi”dir. Araştırma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Beyin Cerrahisi Anabilim Dalı ve Patoloji Anabilim Dalları tarafından yürütülmektedir.

Araştırmaya davet edilmenizin nedeni hastalığınız gelişimini etkileyen ve kullanacağınız ilaçların etkinliğinin değişmesine neden olan genetik nedenleri araştırmak. Genetik bazı unsurlar hastalığınızın gelişimini etkiler. İnsanın genetik materyalinde (DNA’sında) var olan şifre vücudumuzda meydana gelen tüm olaylar ve olaylarla ilgili bilgiyi içermektedir. Değişik nedenlerle bu bilgide meydana gelen değişiklikler kişinin hastalanmasına neden olabilir. Ayrıca, hastalığınızın tedavisi için doktorunuzun önereceği ilaçların etkisi her insanda aynı olmayabilir. Bunun temel nedenlerinden biri yine bu DNA’da meydana gelen değişikliklerdir. DNA’da normalde var olmayan bu genetik değişiklikleri bilmek hastalığınızın tedavisinin belirlenmesinde doktorunuza yardımcı olabilir.

Bu çalışmanın amacı, hastalığınızın gelişmesine ve kullanacağınız ilaçların etkinliğinin belirlenmesinde rol alan bazı genetik nedenleri araştırmaktır.

Hastalığınız nedeniyle ameliyat olacağınızı biliyorsunuz. Ameliyat sırasında hastalığınızın tanısı için sizden hastalığınız ile ilgili olduğu düşünülen kısımdan doku parçası çıkarılarak Patoloji Anabilim Dalı'na verilecek. Biz, Patoloji'ye tanı amaçlı giden parçadan arta kalanlar olursa bunlardan nohut büyüklüğünde ki bir kısmı almak istiyoruz. Ayrıca, doktorunuz ameliyat sırasında hastalığınız ile ilgili kısımdan doku çıkarmak için aynı organınızdan hastalığınız ile ilgili olmayan dokulardan da almak zorunda kaldığını belirtmektedir. Ancak bunun hayati önem taşımadığını ve zorunlu olarak yaptıklarını belirttiler. Eğer ameliyat sırasında ortalama bir nohut büyüklüğünde hastalığınız ile ilgili olmayan kısımdan da parça çıkarılırsa bu parçayı da almak istiyoruz. Böylece her iki parça üzerinde yapacağımız testlerle bunlar arasındaki genetik farklılıkları araştırmış olacağız. Dokularınızdan hücreler elde edeceğiz ve bunlara laboratuarda ilaçlar vereceğiz. İlaçların hücreler üzerindeki etkisinin nasıl olacağını belirlediğini düşündüğümüz MGMT isimli proteinin miktarını ve miktarının değişmesine neden olan faktörleri araştıracağız. Bu testlerde sizin dokularınızdan ve hücrelerinizden DNA (genetik materyal), RNA (diğer genetik materyal) ve protein elde edeceğiz.

Patoloji için gönderilecek doku kısmından nohut büyüklüğünde bir kısım artmazsa ve hastalığınızı ilgilendirmeyen parça ortalama bir nohut büyüklüğünden küçük olursa biz bunları almayacağız. Dolayısıyla çalışmaya katılmamış olacaksınız. Eğer bu çalışmaya katılmayı kabul ederseniz ve yukarıda anlatılan dokuları alırsak bu parçalar üzerinde bir takım laboratuvar çalışması yaparak hastalığınızı etkileyebilecek genetik nedenleri ortaya çıkarmaya çalışacağız. Ancak, izniniz olmadan asla dokularınız alınmayacaktır.

Çalışmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz ve katıldıktan sonra da istediğiniz zaman vazgeçebilirsiniz. Katıldıktan sonra vazgeçmeniz halinde çalışmadan çıkarılacaksınız. Bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır. Ayrıca, araştırmacı olarak ta isteğiniz dışında sizi araştırmadan çıkarabiliriz. Eğer dokularınızdan hücrelerinizi elde edemezsek (bu durumun hastalığınız ile ilgisi yok) ve dolayısıyla istediğimiz laboratuvar çalışmalarını yapamazsak araştırmadan çıkarılırsınız. Bu durum size bildirilmeyecektir.

Bu çalışma sizin hastalığınızın tedavi şeklini kesinlikle değiştirmeyecektir. Ayrıca, tedavi şeklinizin belirlenmesinde bu araştırmanın hiçbir etkisi olmayacaktır. Araştırma kapsamında size her herhangi bir ilaç verilmeyecektir. Bu araştırma sizin için hiçbir risk taşımamaktadır ve size araştırmaya bağlı bir zarar gelmeyecektir. Bu araştırma sizin zamanınızı almayacaktır. Hastalığınız ile ilgili zaten ameliyat olmayı kabul ettiyseniz bizim için fazladan bir zaman harcamayacaksınız. Araştırma sırasında sizi ilgilendirebilecek her hangi bir gelişme olursa bu size bildirilecektir. Bu araştırmada yer alacak toplam gönüllü sayısı 20 olarak belirlenmiştir.

Size bu araştırmaya katılmanız konusunda hiçbir ödeme yapılmayacaktır ve para talep edilmemektedir. Hastalığınız ile ilgili rutin tetiklerinizin ücreti bu araştırma kapsamında karşılanmayacaktır. Rutin tetikler bağlı bulunduğunuz sosyal güvelik kuruluşu tarafından karşılanacaktır ve bu araştırma sizin sosyal güvenlik kuruluşunuza hiçbir mali yük getirmeyecektir.

Çalışmadan çıkacak sonuçlar tıp eğitiminde veya bilimsel nitelikteki yayınlarda kullanılabilir. Bu amaçların dışında bu kayıtlar kullanılmayacak ve başkalarına asla verilmeyecektir. Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir.

Bu araştırma ile ilgili olarak her türlü kararınıza saygı duyuyoruz. Bu araştırma kapsamında sormak istediğiniz her türlü sorular için günün 24 saati Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na 312 3103010-400 ve Araş. Gör. Mehmet TAŞPINAR'a 505 485 08 11'nolu telefonlardan ulaşabilirsiniz.

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı : Mehmet
Soyadı : Taşpınar
Doğum Yeri ve Tarihi : Ermenek, 10.09.1977
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Evli
Askerlik Durumu : Yapmadı
İletişim Adresi ve Telefon : Çevreli Cad. 50/4 Aydınlikevler / Ankara
mtaspinartr@yahoo.com
0 505 4850811

II-Eğitimi

Doktora : Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji AD, 2005-
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji AD, 2005.
Lisans : Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji
Öğretmenliği, 2000.
Yabancı dil : İngilizce

III. Ünvanları

Araştırma Görevlisi, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD
[35.madde], 2002.

IV. Meslek Deneyimi

Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD, 2001-2002.

Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD, 2002-

V. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği

VI. Bilimsel İlgi Alanları

Yayın Bilgileri

SCI,SCI/Expanded Kapsamında Yayınlanan Yayınlar

- 1- Bucak MN, Tuncer PB, Sariozkan S, Başpınar N, **Taspınar M**, Akalın PP, Cayan K, Buyukleblebici S, Aydos S, Ilgaz S.(2010). Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*, Inpress.
- 2- Atinkaya C, Bilgiç E, Yazıcı Ü, **Taşpınar M**, Öz G, Yürüker S, Özpolat B, Taştepe İ.(2010) Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hastalarında CD14 ve CD44s Ekspresyonu. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, Inpress.
- 3- Aydos S, **Taspınar M**, Sunguroglu A, Aydos K.(2009) Association of CYP1A1 and GST Polymorphisms with Male Infertility. *Fertility Sterility*, 92(2):541-7.
- 4- **Taspınar M**, Aydos SE, Comez O, Elhan AH, Karabulut HG, Sunguroglu A. (2008). CYP1A1, GST gene polymorphisms and risk of chronic myeloid leukemia. *Swiss Med Wkly*, 12;138(1-2):12-7.
- 5- Sahin F, **Taspınar M**, Sunguroglu A. (2007). Molecular pathogenesis of pancreatic cancer: Review. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 27(4):560-566.
- 6- Sahin F, **Taşpınar M**, Karasartova D, Ozkul A, Gerçeker D.(2006). Investigation of the role of ribonuclease L gene in the response of tonsil tissues against viral infections. *Mikrobiyol Bul*, 40(4):307-15.

- 7- G.Öztürk., E.Erdoğan., Ö. Anlar., M, Kösem., **M. Taspınar**. (2005). Effect of leukemia inhibitor factor in experimental cisplatin neuropathy in mice. *Cytokine*, 29(1):31-41.

Proceedings

- 1- Sunguroğlu A, **Taspınar M**, Aydos S, Sakiragaoglu A, Düzen IV, Tutar E, Sunguroğlu K. (2009). 14th World Congress on Clinical Nutrition and 5th International Congress on Cardiovascular Diseases. Kosice, June 4-7.

Yurt İçi Hakemli Dergilerdeki Yayınlar

- 1- Aydos S, **Taspınar M**, Sakiragaoglu O, Ilgaz S, Sunguroglu A, Aydos K. Fertil ve İnfertil Türk Erkeklerinde FSH Reseptör Gen Polimorfizmi (2009). *Optimal Tıp Dergisi*, 22:1-4;9-12.
- 2- Aydos S, **Taspınar M**, Sakiragaoglu O, Sunguroglu A, Aydos K.(2008). Türk toplumunda Protamin 1 (PRM1) Geni G197T Tek Nükleotid Polimorfizminin Erkek Fertilitesi Üzerine Etkisi. *Klinik Laboratuvar ve Araştırma Dergisi* 12:1-4;9-11.

Yurt Dışı Kongrelerde Sunulan Poster ve Sözlü Bildiriler

Poster Bildirileri

- 1- Sena Aydos, **Mehmet Taspınar**, Asuman Sunguroğlu, Kaan Aydos. Analyzes of the assciation between varicocele and GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in infertile patients. *Archives of Gynecology and Obsterics*. Supplement 1 to volume 275-May 2007, page 164.
- 2- Sena Aydos, **Mehmet Taspınar**, Kaan Aydos, Asuman Sunguroğlu. Association of CYP1A1 and GSTM1 Polymorphisms with male infertility. 6th Annual Meeting of Mediterranean Society for Reproductive Medicine. April 20-23, 2007. Abtract Book page:42.
- 3- Aydos S, **Taspınar M**, Sahin F, Karasartova D, Sunguroğlu A, Aydos K. Detection of Herpesviridae family members including Herpes Simplex Virus1, Herpes Simplex Virus2, Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus in blood samples of Male Infertility Patients. 14th World Congress on In Vitro

- Fertilization & 3rd World Congress on In Vitro Maturation. Abstract Book, Page 160. September 15-19, 2007, Montreal Canada.
- 4- Sena Erdoğan Aydos, **Mehmet Taşpınar**, Onur Şakırağaoğlu, Asuman Sunguroğlu, Kaan Aydos. PRM1 Gene Polymorphism and Male Infertility. The XX International Congress of Genetics, Berlin, Germany, July 12 – 17, 2008.
 - 5- Sena Erdoğan Aydos, **Mehmet Taşpınar**, Onur Şakırağaoğlu, Asuman Sunguroğlu, Kaan Aydos. FSH Receptor Gene Polymorphism in Fertile and Infertile Turkish Men. The XX International Congress of Genetics, Berlin, Germany, July 12 – 17, 2008.
 - 6- Varol N, Ozkan T, Çelik S, Gümüş Akay G, Akcora D, Rustemoglu A, **Taşpınar M**, Ozkal P, Gokmen D, Ilhan O, Beksac M, Ozcan M, Sunguroglu A. The Methylation Analysis of DAP Kinase (DAPK) Gene in Imatinib Resistant Chronic Myeloid Leukemia. The XX International Congress of Genetics, Abstract Book, Page:319, Berlin, Germany, July 12 – 17, 2008.
 - 7- Gurleyik E, **Taşpınar M**, Oztuna D, Atinkaya C, Yazici C, Avci A, Sunguroğlu A. Plasma ADA and PON1-arylesterase enzyme activities in lung cancer patients. Turkish Society of Molecular Medicine, Third International Congress of Molecular Medicine, May 5-8, 2009, Istanbul.
 - 8- Korkmaz S, Gurleyik E, **Taşpınar M**, Oztuna D, Atinkaya C, Yazici U, Avci A, Sunguroglu A. Plasma Nitric Oxide levels and Nitric oxide synthase activity in lung cancer patients. Turkish Society of Molecular Medicine, Third International Congress of Molecular Medicine, May 5-8, 2009, Istanbul.
 - 9- Aydos S, **Taşpınar M**, Ozkan T, Şakırağaoğlu O, Ilgaz S, Gokçe I, Baltacı S, Sunguroglu A. PON1 192Q/R Polymorphism and Prostate Cancer. Mediterranean Medical Genetics Meeting, 2009, Ankara.
 - 10- **M. Taşpınar**, H.Ugur, S.Ilgaz, T.Ozkan, M. Ozdemir, D.Oztuna, A.Sunguroğlu. The effect of Lomeguatrib-Temozolomide combination upon to MGMT expression on primary human glioblastoma tumour cells and glioma cell lines. The EMBO meeting, Abstract Book, syf.179-180, 4-7 September 2010, Barcelona, Spain.

Sözlü Bildiriler

- 11- **Taspınar M**, Aydos S, Comez O, Elhan AH, Karabulut HG, Sunguroglu A. CYP1A1, GST polymorphism and risk of Chronic Myeloid Leukaemia. Ehrlich II, 2nd World Conference on Magic Bullets, Abstract Book, Page 107. October 3-5, 2008, Nurnberg, Germany.

Yurt İçi Kongrelerde Sunulan Poster ve Sözlü Bildiriler***Poster Bildirileri***

- 1- Öztürk G., **Taşpınar M**. Cisplatine Bağlı Nöropatide Schwann Hücreleri ve Lösemi İnhibitör Faktörün Etkileri. 28. Ulusal Fizyoloji Kongresi Özet Kitabı, s:16124-27 Eylül 2002, İzmir.
- 2- Fikret Şahin, **Mehmet Taşpınar**, Djursun Karasartova, Aykut Özkul, Devran Gerçeker. Tonsil Dokusunun Viral Enfeksiyonlara Duyarlı Olmasında Ribonuclease L Geninin Araştırılması. XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi 12-16 Eylül 2006. Kongre Kitabı. P230. syf: 469.
- 3- S. Aydos, **M. Taşpınar**, K. Aydos, A. Sunguroğlu. CYP1A1, ve GSTM1 Polimorfizmlerinin erkek infertilitesi ile ilişkisi. X. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. Bildiri Kitapçığı, Syf. 288. 6-9 Eylül 2007. Belek Antalya.
- 4- **M. Taşpınar**, I.V Düzen, P. Özkal, P. Akpınar, D. Öztuna, E. Tutar, A. Sunguroğlu. Myeloperoksidaz (MPO) 129G/A Polimorfizmi ve Ateroskleroz. X. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. Bildiri Kitapçığı, Syf. 173. 6-9 Eylül 2007. Belek Antalya.
- 5- **M. Taşpınar**, F Şahin, D Karasartova, A. Sunguroğlu. Ateroskleroz Hastalarında HSV1, HSV2, EBV ve CMV Virüslerinin Saptanması. X. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. Bildiri Kitapçığı, Syf. 190. 6-9 Eylül 2007. Belek Antalya.
- 6- **M. Taşpınar**, S Aydos, I.V Düzen, D. Öztuna, E. Tutar, A. Sunguroğlu. CYP1A1 Polimorfizmi ve Ateroskleroz Riski. X. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. Bildiri Kitapçığı, Syf. 191. 6-9 Eylül 2007. Belek Antalya.
- 7- **M. Taşpınar**, S. Aydos, O. Comez, O. Sakiragaoglu, I.V. Düzen, D. Öztuna, E. Tutar, A. Sunguroglu. The importance of genetic polymorphisms of Phase I

and Phase II enzymes in the development of atherosclerosis.IV. Clinical Vascular Biology Congress. 7-11 Mayıs 2008, Antalya. European Journal of Clinical Investigation. May 2008 Vol:38(5). Syf:342.

- 8- **M. Taspınar**, O. Comez, I.V. Düzen, O. Sakiragaoglu, D. Oztuna, E. Tutar, A. Sunguroglu. Myeloperoksidase (MPO) 463G/A polimorfizm and atherosclerosis in Turkish Population. IV. Clinical Vascular Biology Congress. 7-11 Mayıs 2008, Antalya. European Journal of Clinical Investigation. May 2008 Vol:38(5).Syf:355.
- 9- **Mehmet Taşpınar**, Sena Aydos, Ebru Gürleyik, Filiz Taşpınar, Ali Doğan Dursun, Derya Öztürk, Aslıhan Avcı, Metin Baştuğ, Asuman Sunguroğlu. Kronik Hipobarik Hipoksiye Maruz Bırakılan Ratların Plazma ve Testis Dokularındaki Oksidatif Stres Yanıtı.1.Antiaging ve Estetik Tıp Kongresi, Türkiye Klinikleri Supplement P-4. 6-9 Kasım 2008. Antalya.
- 10- Sena Aydos, **Mehmet Taşpınar**, Seda Ilgaz, Sertaç Batıoğlu, Asuman Sunguroğlu. Tedaviye Dirençli Primer İnfertilite Olgusunda FSHR -29 G/A Polimorfizmi. 4.Ege Genetik Sempozyumu, 21 Kasım 2008, Kuşadası.

Sözlü Bildiriler

- 11- Devran Gerçekler, Fikret Şahin, Djursun Karasartova, Nilgün Çekin, **Mehmet Taşpınar**. Tonsil Dokularında Latent HHV6 İnfeksiyon Varlığının Araştırılmasında, PCR ve Western Blot Yöntemlerinin Kıyaslanması. XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi 12-16 Eylül 2006. S19. Özet Kongre Kitabı. syf: 379.
- 12- S. Aydos, **M. Taspınar**, A. Sunguroğlu, K. Aydos. İnfertil Hastalarda GSTM1 ve GSTT1 polimorfizmleri ve Varikosel arasındaki ilişkinin analizi. X.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. Bildiri Kitapçığı, Syf.86. 6-9 Eylül 2007. Belek Antalya
- 13- **Mehmet Taşpınar**, Sena Aydos, Onur Şakırağaoğlu, I. Veysel Düzen, Eralp Tutar, Asuman Sunguroğlu. Ateroskleroz Riskinde PON1 192Q/R Polimorfizminin Önemi 1.Antiaging ve Estetik Tıp Kongresi, Türkiye Klinikleri Supplement S-3, Sayfa:272. 6-9 Kasım 2008. Antalya.
- 14- Fikret Sahin, Nuray Yazihan, **Mehmet Taşpınar**, Djursun Karasartova, Işın Kuzu, T.Murat Özsan. Ketaminin Akt-1 Fosforilasyonunu İnhibe

- Ederek Kanser Oluşumunu Engellemesi. 2. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu Bildiri Kitapçığı 17 No'lu Bildiri. 24-27 Şubat 2008. Bursa.
- 15- Sena Aydos, **Mehmet Taşpınar**, Kaan Aydos, Asuman Sunguroğlu. GST polimorfizminin sigara içen erkeklerde fertilite üzerine etkisi. 8.Ulusal Androloji Kongresi.Bildiri Kitapçığı, S 47. 20-23 Mayıs 2009, İzmir.
- 16- Sena Aydos, **Mehmet Taşpınar**, Derya Öztuna, Asuman Sunguroğlu, Kaan Aydos. Infertil hastalarda GSTT1 ve GSTM1 polimorfizminin Varikoselle İlişkisi. 8.Ulusal Androloji Kongresi.Bildiri Kitapçığı, S 72. 20-23 Mayıs 2009, İzmir.
- 17- Cansel Atinkaya, **Mehmet Taşpınar**, Gürhan Öz, Onur Sakırağaoğlu, Ülkü Yazıcı, Atilla Elhan, Asuman Sunguroğlu, İrfan Taştepe. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Olgularında Faz I ve Faz II Enzimlerinin Genetik Polimorfizmlerinin Önemi. 5.Türk Göğüs Cerrahisi Kongresi, Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi Ek 1, Syf.261. 14-17 Mayıs 2009, Kusadası.
- 18- **Mehmet Taşpınar**, Cansel Atinkaya, Onur Sakırağaoğlu, Gürhan Öz, Ülkü Yazıcı, Atilla Elhan, Asuman Sunguroğlu, İrfan Taştepe. PON1 polimorfizmi ve Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri 5.Türk Göğüs Cerrahisi Kongresi, Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi Ek 1, Syf.77, 14-17 Mayıs 2009, **Kusadası**.

VII. Bilimsel Etkinlikleri

Ödüller

Antiaging ve Estetik Tıp Kongresi, 6-9 Kasım 2008, Antalya. “Ateroskleoz Riskinde PON1 192Q/R Polimorfizminin Önemi” başlıklı çalışmayla Bilimsel Araştırma Ödülü

Yurt Dışında Yapılan ve Davetli Konuşmacı Olarak Bulunulan Kongre

Ehrlich II, 2nd World Conference on Magic Bullets, Nurnberg, Germany.