



**BELİRLİ KEMOTERAPÖTİKLER VE KOLESTEROL
İLAÇLARININ *İN VİTRO* BEYİN TÜMÖRÜ MODELİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Hatice AYDIN DOĞAN

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Elanur AYDIN KARATAŞ**

2022

Her hakkı saklıdır.



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

BELİRLİ KEMOTERAPÖTİKLER VE KOLESTEROL İLAÇLARININ *İN VİTRO* BEYİN TÜMÖRÜ MODELİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Hatice AYDIN DOĞAN

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Elanur AYDIN KARATAŞ

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2022

Her hakkı saklıdır

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

29 / 04 / 2022

Hatice AYDIN DOĞAN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BELİRLİ KEMOTERAPÖTİKLER VE KOLESTEROL İLAÇLARININ İN VİTRO BEYİN TÜMÖRÜ MODELİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Hatice AYDIN DOĞAN

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Elanur AYDIN KARATAŞ

Beyin tümörleri, diğer tümörlere kıyasla yetişkinlerde daha nadir görülsede, bebeklerde ve çocuklarda kansere bağlı morbidite ve mortalitenin en yaygın nedenlerinden biridir. Beyin tümörleri ile ilgili en büyük sorunlardan biri kemoterapi ilaçlarının kan-beyin bariyeri nedeniyle beyne istenilen dozda ulaşamamasıdır. Kemoterapi ilaçları, tedavi etkinliğini artırmak için diğer ilaçlarla birlikte verilmektedir. Diğer yandan; kolesterol, hayvan hücre zarının önemli bir bileşenini oluşturan steroid maddedir. Kolesterol sentezini düzenleyen kolesterol geri besleme inhibisyon mekanizmalarının kaybı, malign transformasyonun önemli bir özelliğidir. Literatür incelemesinden, tümör büyümesinin inhibisyonunun, kolesterol veya kolesterol sentezinin varlığını kısıtlayarak sağlanabileceği makul bir varsayımdır. Son zamanlarda kolesterol düzenleyici ilaçlar olan simvastatin ve lovastatin ile kemoterapötiklerin (gemsitabin ve karmustin) eş zamanlı uygulanmasının in vitro beyin tümörü modelinde etkilerinin araştırılmadığı bulunmuştur. Mevcut tezde, literatürdeki bu boşluğun doldurulması amaçlanmaktadır. Hücre Canlılığı Tespit Kiti-8, test bileşiklerinin hücre canlılığı üzerindeki etkilerini belirlemek için kullanılmış ve insan nöroblastom SH-SY5Y hücrelerinde her bileşik için IC₂₀ konsantrasyonları belirlenmiştir. Daha sonra test bileşiklerinin apoptoz üzerindeki etkileri hem kolorimetrik hem de western blot analizi ile ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, statinler hem tek başına hem de kemoterapötiklerle birlikte uygulandığında doza bağlı bir şekilde proliferasyonu inhibe etmiştir. Özellikle, lovastatinin hem gemsitabin hem de karmustinin etkinliğini artırarak apoptozu indüklediği her iki yöntemde de gösterilmiştir. Yapılan testlerden elde edilen bulguların bir sonucu olarak, statinlerin şu anda kullanılan antikanser ilaçlarının etkinliğini potansiyel olarak artırabilecek yeni bir nöroblastoma tedavi seçeneği olabileceği önerilmektedir.

2022, 42 sayfa

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Kemoterapötik, Nöroblastom, Proliferasyon, Statin, Western blot analizi

ABSTRACT

MS. Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SPECIFIC CHEMOTHERAPEUTICS AND CHOLESTEROL DRUGS ON AN *IN VITRO* BRAIN TUMOR MODEL

Hatice AYDIN DOĞAN

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Elanur AYDIN KARATAŞ

Although brain tumors are less common in adults compared to other tumors, they are one of the most common causes of cancer-related morbidity and mortality in the infants and children. One of the biggest problems about brain tumors is that chemotherapy drugs cannot reach the brain in the desired dose due to the blood-brain barrier. Chemotherapy drugs are given in combination with other drugs to increase treatment efficiency. On the other hand; Cholesterol is a steroid substance that forms an important component of the animal cell membrane. The loss of cholesterol feedback inhibition mechanisms that regulate cholesterol synthesis is an important feature of malignant transformation. From the literature review, a reasonable assumption is that tumor growth inhibition can be achieved by restricting the presence of cholesterol or cholesterol synthesis. Recently, it was found that simvastatin and lovastatin, which are cholesterol-regulating drugs, and the effects of simultaneous administration of chemotherapeutics (gemcitabine and carmustine) on *in vitro* brain tumor model were not investigated. In the current thesis, it is aimed to fill this gap in the literature. Cell Viability Detection Kit-8 was used to determine the effects of test compounds on cell viability and IC_{20} concentrations were determined for each compound in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Then, the effects of test compounds on apoptosis were revealed both colorimetrically and by western blot analysis. According to the results obtained, statins inhibited proliferation in a dose-dependent manner, both when administered alone and with chemotherapeutics. In particular, it was demonstrated in both methods that lovastatin induced apoptosis by increasing the efficiency of both gemcitabine and carmustine. As a result of the findings from the tests, it is suggested that statins may be a new neuroblastoma treatment option that could potentially enhance the effectiveness of currently used anticancer drugs.

2022, 42 Page

Keywords: Apoptosis, Chemotherapeutic, Neuroblastoma, Proliferation, Statin, Western blot analysis

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca her anlamda bana yol gösteren, destek olan, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, her türlü ilgi, sabır ve anlayışı gösteren değerli danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Elanur AYDIN KARATAŞ'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım kıymetli hocam Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ'a,

Çalışmalarım sırasında yanımda olan, yakın ilgi ve desteğini benden esirgemeyen Nesliőah BARLAK' a ve laboratuvarında birlikte çalıştığım değerli arkadaşlarıma,

Eğitim hayatımın ilk gününden beri bana her zaman güvenen, destekleyen, maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan kıymetli anneme ve babama, canım kardeşlerime, her zor durumumda yardım elini uzatan dostum Betül Karıslı'ya ve bu süreçte beni yalnız bırakmayan sevgili eşim Yunus DOĞAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Hatice AYDIN DOĞAN
Nisan 2022

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser.....	1
1.1.1. Merkezi sinir sistemi kanserleri.....	3
1.1.1.1. Nöroblastoma.....	5
1.2. Beyin Kanserlerinde Tedavi Yöntemleri.....	6
1.2.1. Test bileşiklerinden beyin tümörlerinin tedavisinde kullanılan gempitabin ve karmustin.....	6
1.3. Kolesterol Metabolizması.....	7
1.3.1. Beyinde kolesterol metabolizması.....	9
1.3.2. Kanser hücrelerinde kolesterol metabolizması.....	9
1.3.3. Yüksek kolesterol tedavisinde kullanılan statinler.....	11
1.3.3.1. Simvastatin.....	12
1.3.3.2. Lovastatin.....	12
2. KAYNAK ÖZETLERİ	14
3. MATERYAL ve YÖNTEM	16
3.1. Materyal.....	16
3.2. Yöntem.....	18
3.2.1. Hücre kültürü.....	18
3.2.2. Hücre sayımı.....	18
3.2.3. Hücrelerin 48 Well Plate'e ekimi.....	19
3.2.4. İlaçların hazırlanması.....	19
3.2.4.1. Gempitabinin hazırlanması.....	19
3.2.4.2. Karmustinin hazırlanması.....	19

3.2.4.3. Simvastatinin hazırlanması	20
3.2.4.4. Lovastatinin hazırlanması	20
3.2.5. Hücre canlılık testleri	20
3.2.6. Apoptozis	21
3.2.7. Western Blot.....	21
3.2.8. İstatistiksel analiz	24
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	25
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	35
KAYNAKLAR	36



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler Açıklama

°	Derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mM	Milimolar
V	Volt
%	Yüzde

Kısaltmalar

DMSO	Dimetil sülfoksit
FBS	Fetal Bovine Serum
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HMG-CoA	3-hidroksi 3-metil glutaril koenzim-A
INSIG	İnsülin kaynaklı gen
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
SCAP	SREBP bölünme aktive edici protein
SREBP	Sterol yanıt elemanı bağlayıcı proteinler

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. 2020 Yılında Dünya genelinde ortaya çıkan kanser vaka sayıları.....	1
Şekil 1.2. Türkiye 2020 Kanser İstatistikleri.	2
Şekil 1.3. 2020 Merkezi Sinir Sistemi kanserleri istatistikleri.....	4
Şekil 1.4. Hücre içi kolesterol metabolizması.	8
Şekil 4.1. 24 saatte gempitabinin SH-SY5Y hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi.	25
Şekil 4.2. 24 saatte karmustinin SH-SY5Y hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi.	26
Şekil 4.3. 24 saatte simvastatinin SH-SY5Y hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi.	27
Şekil 4.4. 24 saatte lovastatinin SH-SY5Y hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi.	27
Şekil 4.5. Test bileşiklerinin IC20 değerleri.	27
Şekil 4.6. Gempitabin ve statinlerin eşzamanlı tedavisinin 24 saatte SH-SY5Y hücrelerinde proliferasyon üzerindeki etkileri.	28
Şekil 5.6. Karmustin ve statinlerin eşzamanlı tedavisinin 24 saatte SH-SY5Y hücrelerinde proliferasyon üzerindeki etkileri.	29
Şekil 5.7. SH-SY5Y hücrelerinde gempitabin ve statinlere maruz kaldıktan sonra gözlenen apoptoz oranları.	30
Şekil 5.8. SH-SY5Y hücrelerinde karmustin ve statinlere maruz kaldıktan sonra gözlenen apoptoz oranları.....	30
Şekil 5.9. Test bileşikleri ile muamele edilmiş SH-SY5Y hücrelerinde insan kaspaz-8'in Western blot analizi.....	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

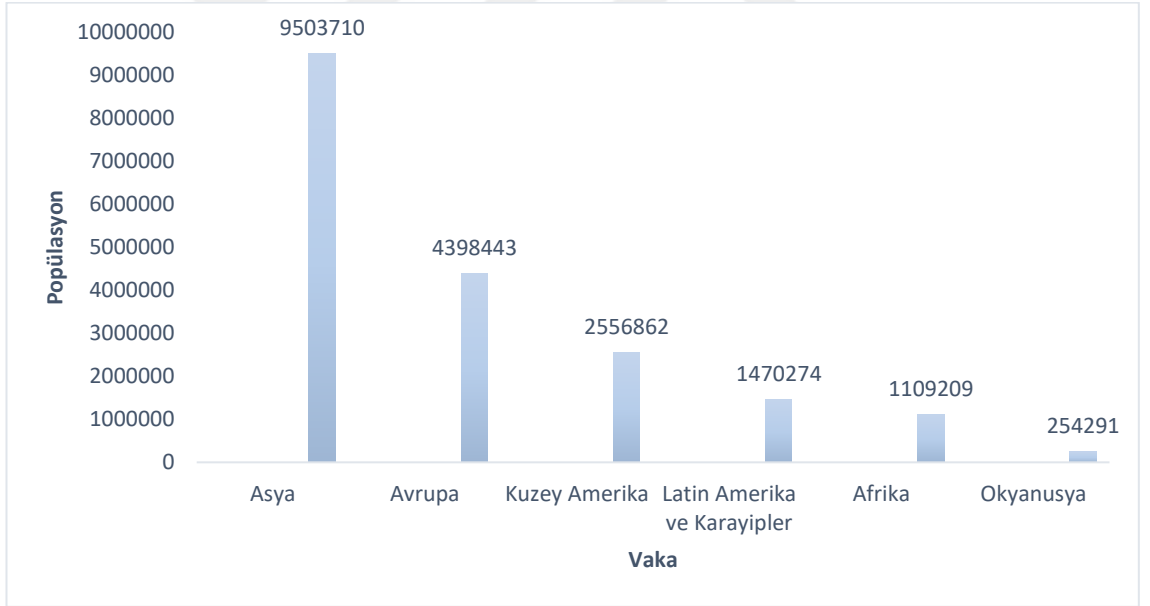
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal ve kitlerin listesi.....	16
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan cihazların listesi.....	17
Çizelge 3.3. %10' luk Ayrırma jeli (Alt jel).....	22
Çizelge 3.4. Ayrırma jeli (%12).....	23
Çizelge 3.5. %4' lük Yürütme jeli (üst jel).....	23



1. GİRİŞ

1.1. Kanser

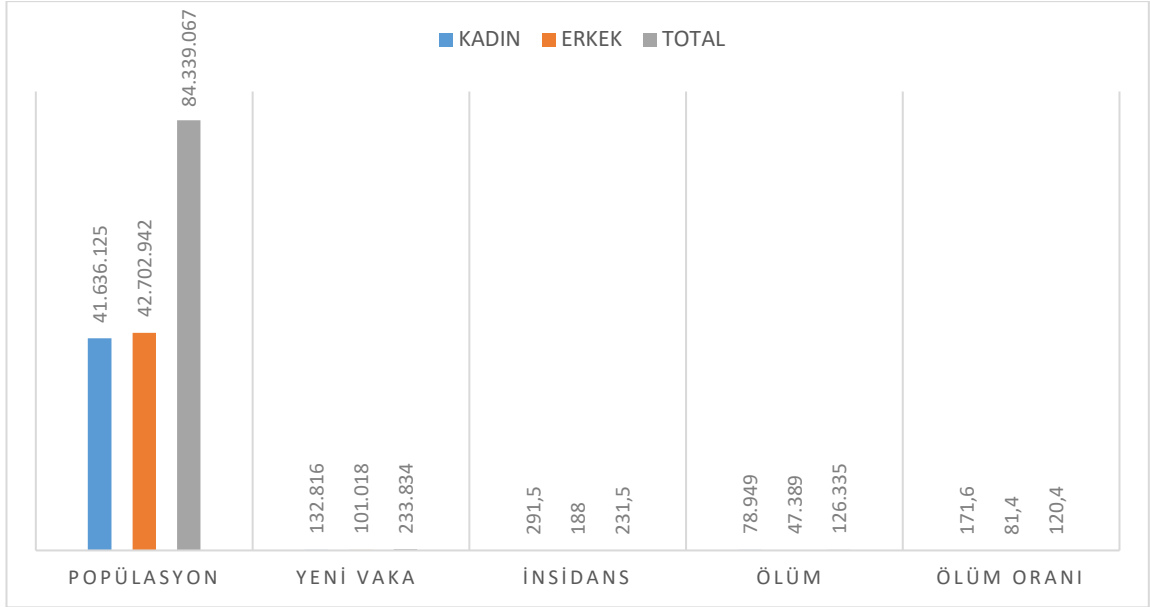
Kanser büyüme, çoğalma, metabolik aktivitelerini hücre içi dengeye uygun şekilde sürdürme, gerekli koşullarda programlı hücre ölümünün başlatılması gibi normal hücre fonksiyonlarını kaybeden hücrelerle karakterize kompleks bir hastalıktır (Kim et al. 2018; Tajan 2020). Kanser vücudun herhangi bir yerinde ortaya çıkabilmektedir ve günümüzde hem dünyada hem de ülkemizde en önemli ölüm nedenleri arasında yer almaktadır (Baran 2018). Dünya sağlık örgütü verilerine göre 2020 yılında dünya genelinde ortalama 19 milyon yeni kanser vakası görülmüştür ve 2040 yılında bu sayının yaklaşık olarak 28 milyon olması beklenmektedir. Son yıllarda vakalarda yaşanan artış ile kanser dünya genelinde ilk sıradaki ölüm nedeni olmuştur ve 2020 yılında 10 milyon insan kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir (Anonymous 2022a; Anonymous 2022b).



Şekil 1.1. 2020 yılında Dünya genelinde ortaya çıkan kanser vaka sayıları (Anonymous 2022b)'den alınmıştır.

Ülkemizde 2020 yılında yaklaşık 233 bin yeni kanser vakası görülmüştür ve ortalama 126 bin kişi hayatını kaybetmiştir (Anonymous 2022b).

1. GİRİŞ



Şekil 1.2. Türkiye 2020 Kanser İstatistikleri (Anonymous 2022b)'den alınmıştır

Milyonlarca hücreden oluşan insan vücudunda kanser, hemen hemen yerde ortaya çıkabilmektedir. Kanser hücreleri bening ya da malign özellikte olabilmektedir. Bening kanserler iyi huylu olarak adlandırılmaktadır. İyi huylu kanserlerin metastaz yapmadığı ve ameliyatla alındıklarında çoğunlukla yeniden nüks etmedikleri bilinmektedir. Ancak buldukları yere bağlı olarak hastanın yaşamını olumsuz etkileyebilmektedirler. Örneğin beyindeki bening tümörler ciddi semptomlara neden olabilmekte veya yaşamı tehdit edebilmektedir. Kötü huylu yani malign kanserler bening kanserlerin aksine tedaviye direnç gösterebilmektedir ve metastaz yaparak vücutta başka bölgelere yayılabilme potansiyeline sahiptir (Pérez-Herrero and Fernández-Medarde 2015; Wang et al. 2018; Anonymous 2021a).

Normal hücreler ve kanser hücreleri arasında birçok fark vardır. Kanser hücreleri normal hücrelerden farklı olarak bölünme sinyaline ihtiyaç duymadan sürekli bölünebilmektedir. Normal koşullarda hücrelerde homeostazın korunması için hücre-hücre teması sağlanınca ERK ve Akt gibi hücre içi sinyal yollarının olumsuz etkilenmesiyle bölünme durdurulmaktadır, bu süreç kontak inhibisyonu olarak adlandırılmaktadır. Kanser hücrelerinde ise kontak inhibisyonu kaybolmaktadır. Kontak inhibisyonun kaybı bir hücrenin malign fenotip kazanmasında önemli bir aşamadır (Patel et al. 2019). Hücrelerin kanser hücresine dönüşmesinde önemli bir diğer aşama ise apoptozdan kaçma yeteneği kazanmasıdır. Sağlıklı bir hücrede geri dönüşümsüz bir hasar

1. GİRİŞ

meydana geldiğinde ya da hücre yaşlandığında hücre apoptoza götürülmektedir. Ancak kanser hücrelerinde apoptoz yolağında görevli kritik proteinlerde işlev kaybı görülmektedir ve bu durumda hücreler apoptozdan kaçabilmektedir (Kim et al. 2018; Baran 2018).

Sınırsız bölünüp çoğaldıkça normal hücreye kıyasla çok daha fazla besin ve enerjiye ihtiyaç duyan kanser hücresi, yoğun bir damar sistemine ve farklı bir mikroçevreye sahiptir (Brahimi-Horn et al. 2007). Kan dolaşımına giren malign kanser hücreleri diğer doku ve organlara metastaz yaparak yayılım göstermektedir (Wang et al. 2018; Anonymous 2021a).

Kanser hücrelerinde sahip oldukları genetik epigenetik ya da çevresel farklılıklara ek olarak metabolizmalarında da birçok değişim meydana gelmektedir (Wang et al. 2018; Anonymous 2021a). Kanser hücreleri buldukları mikroçevrede besin ve oksijen yetersiz ise çevresel strese maruz kalmaktadır. Bu stres ortamında bölünüp çoğalmaya devam edebilmek için de metabolik yollarını değiştirmektedirler. Çoğu kanser hücresi, sağlıklı hücrelerin aksine büyük ölçüde glikoliz ile enerji üretmektedir (Brahimi-Horn et al. 2007; Wang et al. 2018; Tajan 2020).

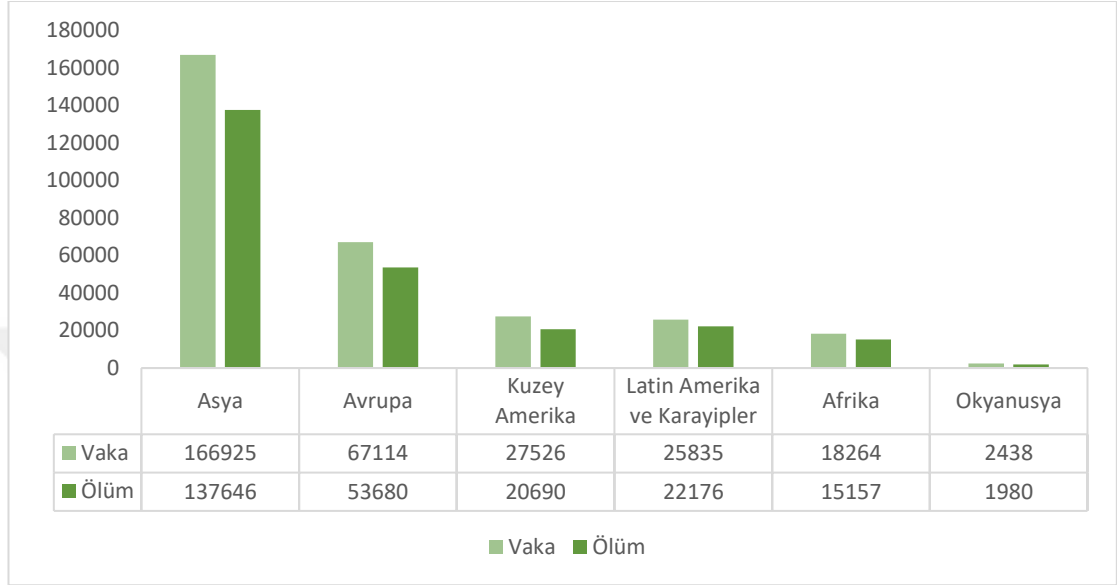
1.1.1. Merkezi sinir sistemi kanserleri

Merkezi sinir sistemi (MSS), beyin ve omurilikten oluşmaktadır. Beyin önemli vücut fonksiyonlarını kontrol eden hayati bir organdır. Omurilik ise çevresel sinirlerle beyin arasında ki bağlantıyı kurmaktadır (Anonymous 2021b). MSS kanserleri beyin veya omurilik hücrelerinde meydana gelen anomalilere bağlı olarak ortaya çıkan benign ya da malign olabilen kanserlerdir. MSS tümörleri hem çocuklarda hem de yetişkinlerde ortaya çıkabilmektedir (Anonymous 2021a).

Orijini MSS hücreleri olan kanserlere primer kanser adı verilmektedir, vücutta herhangi bir dokuda başlayıp beyne metastaz yapan kanserler ise sekonder kanserler olarak isimlendirilmektedir. Beyinde ortaya çıkan bir kanser benign ya da malign olsa da hastanın yaşam kalitesini düşürecek semptomlara neden olabilmektedir. Beynin karmaşık yapısı burada ortaya çıkan kanserlerin anlaşılması ve tedavisini zorlaştırmaktadır. MSS

1. GİRİŞ

kanserlerinin belirti ve prognozu her hastada farklıdır ancak ortaya çıktıktan sonra ilerlemesi hızlıdır tedavi edilse de tekrar etme olasılığı fazladır. Kanser tanısı için kullanılan biyopsi gibi yöntemler bazen beyin kanserlerinde kullanılamamaktadır (Lyon et al. 2017; Anonymous 2021a; Anonymous 2021b).



Şekil 1.3. 2020 MSS kanserleri istatistikleri (Anonymous b 2022)'den alınmıştır

Merkezi sinir sistemini oluşturan hücrelerden farklı kanser türleri oluşmaktadır. Glioma, glial hücrelerden köken almaktadır. Astrosit adı verilen, bir tür glial hücre olan, sinir hücrelerinin devamlılığında görevli beyin hücrelerinde başlayan astrositomlar; diğer bir glial hücre türü oligodendrositlerden oluşan oligodendrogliyal tümörler; oligodendrositler ve astrositlerin birlikte bulunduğu heterojen yapıda ki karışık gliomlar glioma olarak tek başlık altında toplanabilmektedir. Bunun dışında beyin ve omuriliğin çevresinde yer alan ve sıvı dolu boşlukları kaplayan hücrelerde başlayan ependimal tümörler; embriyonal tümör olarak bilinen ve en çok çocuklarda ve gençlerde görülen birçok alt sınıfı olan medulloblastomlar; epifiz bezi hücreleri olan parankimal hücrelerde veya pineositlerde oluşan pineal parankimal tümörler dünya sağlık örgütü MSS kanserleri sınıflandırılmasında yer alan kanserlerden bazılarıdır. Bu kanserler arasında yetişkinlerde en yaygın olarak ortaya çıkan glioblastoma ve en yaygın çocukluk çağı solid malign tümörü nöroblastoma MSS kanserlerinin ilerleyişi ve tedavi yöntemleri araştırmaları açısından üzerinde sıklıkla çalışılan kanser türleridir (Louis et al. 2021).

1. GİRİŞ

Primer beyin tümörlerinden glioblastoma erişkinlerde en sık görülen ve en kötü prognoza sahip beyin tümörüdür. Beynin beyaz cevherinde bulunan ve glia adı verilen dört grup destek hücresinden köken alan ve genelde sınırları belli olmayan ve cerrahi tedavi sonrası radyoterapi ve kemoterapi gibi ek tedaviler gerektiren, nüks etme oranları yüksek tümörlerden biridir. Dünya sağlık örgütü derecelendirme sistemine göre glioblastoma 4.sınıf astrositomdur. Glioblastoma nedeniyle dünyada her yıl yaklaşık olarak 225.000 ölüm meydana gelmektedir ve bu hastalık genelde 60 yaş üstünde teşhis edilmektedir. Tedaviye rağmen hastaların sağ kalım süresi çok kısadır. Bu nedenle hastanın yaşam kalitesini ve süresini arttıracak yeni, güncel tedaviler araştırılmaya devam edilmektedir (Ahmad et al. 2019).

1.1.1.1.Nöroblastoma

Nöroblastomlar malign solid merkezi sinir sistemi tümörleridir. Nöral krest hücrelerinden köken alan nöroblastoma, çocuklarda en yaygın görülen tümördür ve 15 yaşın altındaki hastalarda kanserlerin neden olduğu tüm pediatrik ölümlerin %15' ini oluşturmaktadır (Davidoff et al. 2012; Richards et al. 2018; Kholodenko et al.2018). Pediatrik kanserler arasında görülme oranları açısından lösemi ve beyin tümörlerinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Sempatik sinir dokularının bulunduğu her yerde ortaya çıkabilen, beyin dokusu içerisinde hızlı bir şekilde yayılabilen ölümcül beyin tümörü çeşididir (Davidoff et al. 2012; Kholodenko et al. 2018). Normalde, dorsal tüpten göç eden ve nöral krest hücrelerinin öncülleri olan hücreler, sempatik sinir sistemindeki hedeflerine ulaştınca farklılaşır, ancak hücrelerin göçü esnasında ya da farklılaşırken meydana gelen mutasyonlar nöroblastoma gelişimine neden olabilmektedir. Bununla birlikte çoğu nöroblastomanın kesin nedeni bilinmemektedir ve en olası neden olarak çevresel faktörler gösterilmektedir. Ancak çevresel faktörler ve nöroblastoma arasında doğrudan bir ilişki kurulamamıştır (Whittle et al. 2017). Nöroblastomlar heterojen bir yapıya sahiptir ve bazen bazı çocuklarda spontan olarak gerileyebilirken bazı çocuklarda tedaviye rağmen kötü prognoz göstermektedir. Vakaların %50'si tedavi edilse bile nüks eder ve ölümlerle sonuçlanmaktadır (Whittle et al. 2017; Richards et al. 2018).

1. GİRİŞ

Nöroblastoma tedavisinde standart tedavi yöntemleri olan kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahaleler kullanılmaktadır. Nöroblastoma hücreleri, bağışıklık sisteminden kaçma yeteneğinde olan hücrelerdir ve bu durum kullanılan tedavilerin etkinliğini önemli ölçüde azaltmaktadır. Buna ek olarak ilerlemiş nöroblastomanın tedavisi için kullanılan kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahaleler yetersiz kalmaktadır (Whittle et al. 2017; Richards et al. 2018).

1.2. Beyin Kanserlerinde Tedavi Yöntemleri

Beyin tümörleri için mevcut tedavilerin başında gelen yöntem ameliyatla tümörün çıkarılmasının ardından, hastaya radyoterapi veya kemoterapi uygulanmasıdır. Beyin tümörlerinde cerrahi müdahale sıklıkla kullanılsa da ameliyat sonrası kan dolaşımına giren hücreler kanserin yayılmasına neden olmaktadır. Buna ek olarak beyin ameliyatı mümkün kılmayan bir bölgesinde tümör olması durumunda ameliyat edilememektedir. Sadece kemoterapi ve radyoterapi kullanılmaktadır (Lyon et al. 2017). Merkezi sinir sisteminin, plazmada ki toksik ajanlardan ve patojenlerden korunması, iyonların ve moleküllerin geçişinin düzenlenmesinde görevli olan kan beyin bariyeri normal beyin fonksiyonunun sürdürülmesi için kritik öneme sahiptir. Kan beyin bariyerinin varlığı sağlıklı koşullarda çok önemli olsa da beyindeki hastalıkların tedavisi için çoğu zaman bir engeldir (Ballabh et al 2004; Obermeier et al. 2013). Kan beyin bariyeri tedavi için gerekli kemoterapotik ilaç dozunun beyne geçememesine neden olmaktadır. Tümörün bulunduğu ortam ve kan beyin bariyeri tedavi etkinliğini azaltan faktörler arasındadır (Lyon et al. 2017).

1.2.1. Test bileşiklerinden beyin tümörlerinin tedavisinde kullanılan gemsitabin ve karmustin

Gemsitabin, DNA sentezini inhibe eden pirimidin nükleozid analogu, antimetabolit ve bir antineoplastik ajan olan önemli bir kemoterapi ilacıdır (Toschi et al. 2005). Hücre içine girdikten sonra gemicitabine fosforillenerek aktif formları olan gemsitabin difosfat ve gemsitabin trifosfata çevrilmektedir. Gemsitabin yumurtalık kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, metastatik meme kanseri ve pankreas kanseri gibi birçok kanserin tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalar

beyin tümörlerinin tedavisinde de gemsitabinin oldukça etkili bir ilaç olduğunu göstermiştir ancak kan beyin bariyerinden geçişi sınırlıdır (Noble and Goa 2012; Stukov et al. 2020).

Karmustin glioblastoma, medulloblastoma, astrositom, metastatik beyin tümörleri gibi beyin tümörlerinin yanı sıra, meme, mide, karaciğer, pankreas, akciğer, yumurtalık ve testis kanseri, Hodgkin ve Non-Hodgkin lenfoma gibi çeşitli kanserlerin tedavisinde de kullanılan FDA onaylı bir kemoterapi ilacıdır. Alkilleyici ajan sınıfında olan karmustinin, karaciğerde parçalanarak aktif ara formları oluşturulmaktadır. Bu aktif ara formlar, DNA'daki pürin bazlarını çapraz bağlayarak onları modifiye etmektedir ve DNA, RNA ve protein sentezini inhibe ederek hücreleri ölüme götürmektedir (Anonymous 2018).

1.3. Kolesterol Metabolizması

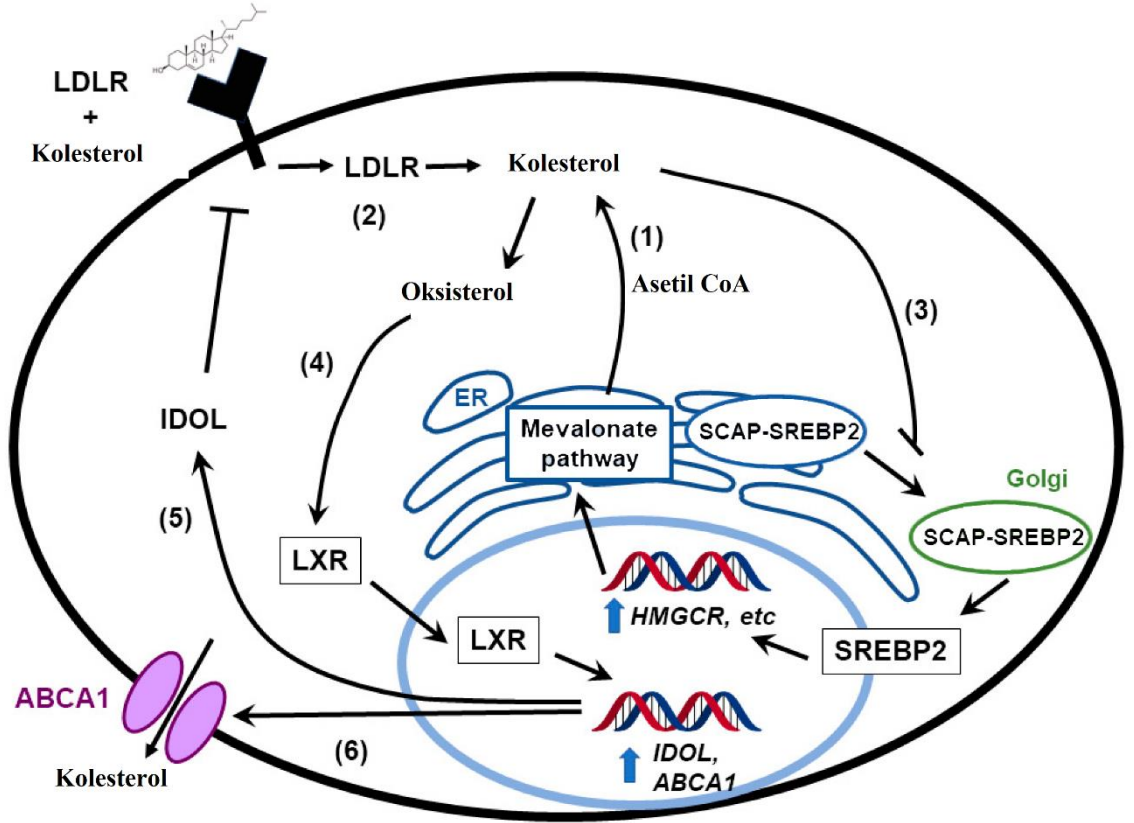
Kolesterol neredeyse bütün hücreler tarafından de novo sentezlenen bir lipittir. Başlıca karaciğerde üretilen kolesterol, hücrelerde sentezlenebileceği gibi bir kısım kolesterol de diyetle dışardan alınmaktadır. Normal bir hücrede, sağlıklı yeni hücrelerin oluşturabilmesi için hücre zarının yapısına katılan ve hücre sinyal iletiminde görevli, bazı steroid hormonlar ile D vitamininin üretiminde kullanılan önemli bir metabolittir. Kolesterol, hücre zarının fiziksel özelliklerini etkiler, lipid membranın akışkanlığının düzenlenmesinde görev alır ve membran geçirgenliğini azaltmaktadır. Ayrıca kolesterol hücre içinde ya da hücre yüzeyinde görevli birçok proteinin işlevini doğrudan veya dolaylı yoldan düzenleyebilmektedir (Benito-Vicente et al. 2018).

Sentezlenen kolesterolün hücrelere taşınmasında karaciğer tarafından üretilen düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL) ve yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) görev almaktadır. Kanda ki kolesterolün karaciğere taşınmasında LDL, karaciğer ve diğer dokularda bulunan kolesterolün hücrelere taşınmasında HDL görev almaktadır. Sağlıksız yaşam şekli ve beslenme alışkanlıkları ya da kalıtsal faktörler sonucu kanda ki kolesterol yükselebilmektedir. Kanda yüksek oranda kolesterol birikimi ateroskleroza neden olmaktadır. Ateroskleroz damarların tıkanması sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır ve

1. GİRİŞ

ateroskleroz nedeniyle insanlarda kalp krizi ve felç riski artmaktadır (Benito-Vicente et al. 2018; Ouimet et al. 2019).

Kolesterol metabolizması son derece iyi karakterize edilmiştir. Hücre içinde kolesterol biyosentezi ve alımı negatif feedback ile dengede tutulmaktadır (Benito-Vicente et al. 2018). Kolesterol sentezinin ilk aşamasında asetil koenzim A (Asetil CoA) ve asetoasetil CoA'dan 3-hidroksi 3-metilglutaril CoA (HMG CoA) oluşmaktadır. Bu aşamada HMG CoA sentaz enzimi görev almaktadır. Sonra ki aşamada HMG CoA redüktaz enzimi, 3-hidroksi 3-metilglutaril CoA'dan mevalonat oluşumunu katalizlemektedir. Bundan sonra gerçekleşen bir dizi reaksiyon ile kolesterol sentezlenmektedir (Keha 2011).



Şekil 1.4. Hücre içi kolesterol metabolizması Ahmad et al. (2019)' dan değiştirilerek alınmıştır.

Sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinler (SREBP) kolesterol sentez yolağında ki enzimlerin ve LDL reseptörünün transkripsiyonunda görevli transkripsiyon faktörleridir. SREBP aynı zamanda kolesterol sentezinin durdurulmasında da görev

almaktadır. Ortamda kolesterol varsa SREBP, endoplazmik retikulumda zara yerleşik insülin kaynaklı gene (INSIG) bağlı olan SREBP bölünme aktive edici protein (SCAP) tarafından endoplazmik retikulumda tutulmaktadır. Kolesterol seviyesi düşerse SCAP proteini INSIG' den ayrılarak SREBP'leri golgiye transfer etmektedir. Golgide alt birimlerine ayrılan SREBP'ler, nükleusa giderek kolesterol senteziyle ilgili genlerin transkripsiyonunda görev almaktadır (Reboldi et al. 2018; Ouimet et al. 2019).

Karaciğer X reseptörü (LXR) hücrede kolesterol homeostazını düzenlemede görevli bir diğer faktördür. Kolesterolün oksisterole dönüşümü ile aktive olan LXR' ler, hücre dışına kolesterol akışını sağlayan Abca1 gibi proteinleri kodlayan genleri transkribe ederek hücre içinde kolesterol seviyesini dengelemektedir (Reboldi et al. 2018; Ouimet et al. 2019).

1.3.1. Beyinde kolesterol metabolizması

Sağlıklı bir hücrenin büyümesi ve gelişmesi için kolesterol işlevi kritiktir. Kolesterol plazma zarının yapısında bulunan ve steroid hormonların, safra asitleri gibi birçok molekülün sentezi için öncü olarak görev alan önemli bir bileşiktir. Diğer doku ve organların aksine beyinde kan beyin bariyeri kolesterol geçişine de izin vermediği için dışardan kolesterol alınamaz ve ihtiyaç duyulan bütün kolesterol beyinde sentezlenmektedir. Beyinde ki kolesterol tüm vücutta bulunan kolesterolün yaklaşık %20'sidir. Kolesterolün beyinden atılması için hidrosillenmesi gerekmektedir. 24(S)-hidrosikolesterol formatına dönüştürülen kolesterol bu şekilde kan beyin bariyerinden geçebilmektedir (Butterick et al. 2010; Yanae et al. 2011; Villanueva et al. 2017; Ahmad et al. 2019).

1.3.2. Kanser hücrelerinde kolesterol metabolizması

Sağlıklı bir hücrede kolesterol miktarının dengede tutulması kritik öneme sahiptir ve kolesterol sentezi bu dengeyi korumak adına birçok aşamada kontrol edilmektedir. Kolesterol, mitokondride asetil-koenzim A'nın (asetil-CoA) oluşumuyla başlayan ve endoplazmik retikulumda bir dizi enzimatik reaksiyon içeren mevalonat yolağı ile sentezlenmektedir (Murai 2015; Codini et al. 2021). Kolesterol sentezinde

1. GİRİŞ

görevli önemli bir hız sınırlayıcı enzim olan 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) redüktaz enzimi kolesterol düşürmeyi amaçlayan ilaçların hedefidir (Freed-Pastor et al. 2011; Keha 2011; Murai 2015).

Kanser hücreleri sınırsız bölündükçe gerekli olan besin ve enerjiyi elde etmek adına metabolik yollarını değiştirmektedir. Kanser hücrelerinin zar üretimi, makromoleküllerin sentezi ve canlılığını devam ettirebilmesi için glikoz ve aminoasitler gibi birçok moleküle olan talebinde artış gözlenmiştir. Yapılan araştırmalar, kanser oluşumu ve gelişimi ile kolesterolün artmasının ilişkili olduğunu göstermiştir. Hızlı büyüyen kanser hücreleri ATP tüketimini azaltmak ve kolesterol dengesini korumak için mevalonat yolağında görevli enzimlerin ekprese edilmesini sağlamaktadır. Kanser hücrelerinde, hücreye dışarıdan kolesterol alımını sağlayan LDL reseptörünün ekspresyonu ve mevalonat yolağında görevli protein olan SREBP'nin aktivasyonu söz konusuysen fazla kolesterolün hücre dışına taşınmasında görevli LXR-IDOL gibi faktörlerin inaktive edildiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda hücrelere kolesterol taşıyan HDL miktarında gözlenen artış ve kanserin oluşması arasında doğru orantı olduğu gösterilmiştir (Riscal et al. 2019; Nazih et al. 2020; Liu et al. 2021). HDL'ler sinyal molekülü olarak işlev yapabilmektedir. Bu durum PI3K/AKT veya MAPK gibi sinyal yollarının aktivasyonuna dolayısıyla hücre sel proliferasyona neden olmaktadır (Riscal et al. 2019). Buna ek olarak bu yolların aktivasyonu hücre içi kolesterol seviyelerini, SREBP'lerin aktive edilmesiyle *de novo* kolesterol sentezine ve hücre içine kolesterol alınımında görevli LDL reseptörlerinin ekspresyonuna neden olmaktadır (Guo et al.2011).

Kolesterol metabolizması ve kanser arasında ki ilişkiyi açıklamak için yapılan araştırmalar, hücrede kolesterol metabolizmasının transkripsiyonel düzenlenmesinde görevli olan SREBP'leri aktive ya da inaktive ederek hücre homeostazını koruyan onkojenler ve tümör baskılayıcı genlerle kanserli hücrede yeniden metabolik düzenleme arasındaki ilişkiyi tespit etmiştir. Örneğin tümör baskılayıcı protein olan p53, SREBP'ler aracılığıyla mevalonat yolunu inhibe etmektedir. Kanserlerin büyük birçoğunda p53 geninde mutasyon olduğu bilinmektedir ve dolayısıyla mevalonat yolağı inhibe edilememektedir (Murai 2015; Codini et al. 2021). Bunun yanında son yıllarda

mikroRNA'lar üzerinde yapılan çalışmalar ile kolesterol sentezinin düzenlenmesinde SREBP'lerin ve mikroRNA-33'ün arasında bir ilişki tespit edilmiştir (Murai 2015).

Çoğu kanser türü enerji ihtiyacını karşılamak için lipid ve kolesterol kullanır ve yapılan araştırmalar kolesterol sentez yolağının birçok kanser türünde değiştiğini göstermiştir (Wang et al. 2018). Araştırmalar kanserde değişen bu metabolik yolların kanser tanı ve tedavisi için önemli bir hedef olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalarda beyin tümöründe kolesterol sentezinin arttığı, kolesterol metabolizmasında görevli genlerin up-regüle olduğu ve bu yolağı hedef alan ilaçların beyin tümörü tedavisinde olumlu etkisi gösterilmiştir (Butterick et al. 2010; Yanae et al. 2011; Ahmad et al. 2019).

1.3.3. Yüksek kolesterol tedavisinde kullanılan statinler

Statin grubu ilaçlar, kolesterolün yüksek olduğu durumlarda, hücre içinde kolesterol sentezini hedef alarak kolesterol sentezini durduran ilaçlardır. Statin, kolesterol sentez yolağında görevli olan HMG-CoA redüktaz enzimini inhibe eden, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış, kolesterolü düşürmek amacıyla kullanılan ilaç sınıfını ifade etmektedir (Faubion et al. 2019). Kolesterol sentezi birçok adımda gerçekleşmektedir. Ancak düzenlenmesiyle ilgili en önemli basamak HMG-CoA'nın mevalonata dönüşüm basamağıdır. HMG-CoA'dan mevalonat oluşumunu katalizyen HMG-CoA redüktaz enzimi kolesterol sentezinin düzenlenmesinde anahtar bir enzimdir ve statin grubu ilaçlar da HMG-CoA redüktaz enziminin inhibe edilmesini hedef almaktadır (Tomaszewski et al. 2011; Bathaie et al 2017; Faubion et al. 2019; Kuang et al. 2021).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılan statinlerin, pleiotropik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu etkisinin yanı sıra antikanser özelliklere sahip oldukları da ortaya konmuştur (Ding et al.2019; Faubion et al. 2019; Kuang et al. 2021).

Yaygın kullanılan statinlerden simvastatin, lovastatin ve atorvastatin ağız yoluyla alınmakta ve bağırsaklarda enzimatik olarak metabolize edilmektedir. Hücre içine giren

1. GİRİŞ

statinler HMG-CoA redüktaz enziminin aktif bölgesine bağlanarak enzim aktivitesini inhibe etmektedirler. Böylece mevalonat oluşmamaktadır. Böylece kolesterol sentezinin yanı sıra mevalonat yolağının diğer ürünlerinin oluşumu da engellenmektedir (Tomaszewski et al. 2011; Riscal et al. 2019; Faubion et al. 2019; Kuang et al. 2021). Hücre içindeki kolesterol sentezinin azalması ile SREBP sinyal yolu aktifleşir ayrıca LDL reseptörlerinin ekspresyonu up-regüle edilmekte ve böylece hücre içine kolesterol alımı gerçekleştirilmektedir. Bu durum kandaki kolesterol seviyesinin azalmasına neden olmaktadır (Faubion et al. 2019; Kuang et al. 2021). Statinlerin kanser hücrelerinde kullanımını ile ilgili çalışmalar, statinlerin kanser hücrelerinde dolaylı olarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir.

1.3.3.1. Simvastatin

Simvastatin hücre içi kolesterol sentezinde görevli HMG-CoA redüktaz enzimini inhibe ederek kolesterol sentezini azaltan, kötü kolesterolü (LDL) düşürmeye ve kandaki iyi kolesterolü (HDL) yükseltmeye yardımcı olmak için yaygın olarak kullanılan statin grubu bir ilaçtır (Duarte et al. 2021).

1.3.3.2. Lovastatin

Lovastatin, kanda ki aşırı kolesterolün azaltılması aterosklerozun ve kalp ameliyatına olan ihtiyacı azaltmak amacıyla kullanılan HMG-CoA redüktaz inhibitörüdür. Statin grubu ilaçlardan olan lovastatin ilk olarak *Aspergillus terreus* türünden izole edilen bir laktondur. Lovastatin HMG-CoA redüktazı inaktive eder ve RAS-MAPK-ERK sinyal yolunu inaktive etmektedir. Dolayısıyla kanser hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır. Lovastatinin kan-beyin bariyerini ve plasenta bariyerini geçtiği yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Protic et al. 2019; Duong and Bajaj 2021).

Çocukluk çağında nöroblastoma, her geçen gün prevalansı, morbiditesi ve mortalitesi artan önemli bir hastalıktır. Sistemik kemoterapinin uygulanması, yan etkileri ve tüm kemoterapi ilaçlarının geçmesine izin vermeyen kan-beyin bariyerinin varlığı ile sınırlıdır. Bu yüzden, özellikle kan-beyin bariyerinin varlığı dolayısıyla etkinliği azalan

1. GİRİŞ

kemoterapi ilaçlarının etkinliğini arttırmaya yönelik çalışmalar popülaritesini korumaktadır. Yapılan literatür taramaları sonucunda, tez kapsamında test edilen statin ve kemoterapötiklerin *in vitro* beyin tümörü modelinde sinerjistik etkileri hakkında literatürde bilgi olmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenlerle, mevcut tez çalışmasında; simvastatin, lovastatin, gempitabin ve karmustinin SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri üzerinde hücre canlılığı ve apoptozis üzerine etkilerinin olup olmadığının tespit edilmesi amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Cai et al. (2021) Kolon kanseri tedavisinde, atorvastatin kullanımının kaspaz-3 ve kaspaz-9 seviyelerinde artışa neden olduğu dolayısıyla apoptozun indüklenmesinde rolü olabileceği gösterilmiştir.

Jang et al. (2016) Simvastatinin kolon kanseri hücre hattı HT-29'da ERK/Akt sinyal yolağını inhibe ettiği, hücre proliferasyonunu azalttığı ve proapoptotik ERK'i indüklediği ortaya çıkarılmıştır.

Hus et al. (2011) Multipl miyelomlu hastaların tedavisinde çoğunlukla talidomid ve lenalidomid gibi kemoterapi ilaçları kullanılmaktadır. Bunun yanında yapılan *in vitro* çalışmalarda, HMG-CoA redüktaz inhibitörlerinin, miyelom hücre hatlarında antiproliferatif ve proapoptotik özellikler sergiledikleri gösterilmiştir. Bu çalışmada tekrar eden veya ilaç direnci gelişen multipl miyeloma sahip 91 hastaya, talidomid, deksametazon ve lovastatin veya talidomid ve deksametazon verilmiştir. Talidomid ve deksametazon uygulanan hastaların %32' sinde ve talidomid, deksametazon ve lovastatin verilen hastalarının %44' ünde önemli bir klinik yanıt gözlenmiştir ayrıca bu iki grup karşılaştırıldığında, talidomid, deksametazon ve lovastatin uygulanan hastalarda genel sağkalımın uzadığı gösterilmiştir. Buna ek olarak plazma hücreleri, talidomid ve lovastatinin, apoptoz hızı üzerindeki etkilerini değerlendirmek için *in vitro* kültürlendi. Yapılan *in vitro* deneyler ile bu ilaçların tek başlarına uygulanmasına kıyasla birlikte uygulanmasının apoptozu daha yüksek oranda arttırdığı ortaya çıkarılmıştır.

Greenaway et al. (2016) yumurtalık kanserinde yapılan çalışma ile, simvastatin ile HMG-CoA redüktazın inhibisyonu, p53 mutasyonuna sahip yumurtalık kanseri hücrelerinde apoptozun indüklendiği gösterilmiştir.

Huang et al. (2020) meme kanserlerinde lovastatinin, aktive edici protein kinaz (AMPK) sinyal kaskadını aktive ederek hücrenin ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, AMPK sinyal yolunun inaktivasyonu, lovastatin aracılığıyla p38MAPK ve p53'ün fosforilasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Higashi et al. (2016) Hepatosellüler karsinomada yapılan çalışmada statinlerin, hücrelerde proliferasyonun inhibisyonu, apoptozun indüksiyonu ve hastalığın kötü prognozunu önleme gibi etkilerinin olduğu tespit edilmiştir.

Kochuparambil et al. (2010) Simvastatin ile artan dozlarda tedavi edilen prostat kanseri hücre hatlarında Akt sinyal yolağının inaktivasyonu gösterilmiştir. Buna ek olarak simvastatin ile muamele edilen hücrelerde hücre göçünün ve proliferasyonunun önemli ölçüde inhibe edildiği ortaya çıkarılmıştır.

Deng et al. (2019) Simvastatin ve fluvastatin yalnız uygulandıkları prostat kanseri hücre hattında (PC3) doza bağlı olarak antiproliferatif ve apoptotik etkisinin varlığı bildirilmiştir. PC3 hücrelerinde yapılan analizler apoptotik protein olan kaspaz-3 seviyelerinde belirgin bir artışın olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak DU145 prostat kanseri hücre hattında da benzer etkilerinin olduğu gözlenmiştir. Ayrıca hücrelerin önce Akt fosforilasyonunun inhibitörü olan MK2206 ile sonra simvastatin ve fluvastatin ile muamelesi, statinlerin etkinliğini önemli ölçüde arttırmıştır.

Göbel et al. (2020) En ölümcül jinekolojik malignite olan yumurtalık kanseri vakalarının çoğunda, geç tanı, metastatik yayılım ve ilaç direncinin gelişmesi nedeniyle tedavi etkinliği düşüktür. Tedavi etkinliğini arttırmak için insan yumurtalık kanseri hücre dizileri (IGROV-1, A2780, A2780cis), artan konsantrasyonlarda statinler ve zoledronik asit ile muamele edilmiştir. Bu bileşiklerin hücre canlılığı ve apoptoz üzerindeki etkileri Cell Titer Blue®, Kaspase 3/7 Glo® gibi yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. Ayrıca western blot yöntemi kullanılarak mevalonat yolağının inhibisyonu doğrulanmıştır. Elde edilen sonuçlar ile bu bileşiklerin, hücre canlılığını %80' e kadar azalttığı, apoptozu 8 kat arttırdığı, mevalonat yolağının inhibisyonu gösterilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu tezde yer alan çalışmaların tamamı Erzurum Teknik Üniversitesi Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (YÜTAM) laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.1. Materyal

Çalışma boyunca kullanılan kitler ve kimyasalların listesi çizelge 3.1’de, cihazlar ise 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal ve kitlerin listesi

MALZEME	TEMİN EDİLEN FİRMA
DMEM F12	Gibco®
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco®
Phosphate Buffered Salin (PBS)	EcoTech Biotechnology®
Penicillin Streptomycin	Gibco®
L-Glutamine	Sigma-Aldrich®
Trypsin	Gibco®
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich®
48 well plate	Corning® Costar®
96 well plate	Corning® Costar®
Petri Dish	Corning® Costar®
Cell Viability Detection Kit-8 (CVDK-8)	EcoTech Biotechnology®
Phenylmethylsulfonyl flüoride (PMSF)	Roche®
Süt Tozu	EcoTech Biotechnology
Whatman Kağıdı	Sigma-Aldrich®
Nitroselüloz Membran	Sigma-Aldrich®
Metanol	Sigma-Aldrich®
İzopropanol	Sigma-Aldrich®
RIPA lysis buffer	EcoTech Biotechnology®
Proteaz inhibitör kokteyl	Thermo Scientific®
Crystal Violet	Sigma-Aldrich®

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çizelge 3.1. (Devam)

Laemli Sample Buffer 10x	EcoTech Biotechnology®
B-actin Antikor	Santa Cruz Biotechnology®
Caspase-8 Antikor	Santa Cruz Biotechnology®
Anti-rabbit Seconder Antikor	Santa Cruz Biotechnology®
Akrilamit	BioShop®
Bis-akrilamit	Sigma-Aldrich®
N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich®
Ponceau	EcoTech Biotechnology®
Reaksiyon Buffer	EcoTech Biotechnology®
Dithiothreitol (DTT)	EcoTech Biotechnology®
Lysis Buffer	EcoTech Biotechnology®
Karmustin	MedChem Express®
Gemsitabin	MedChem Express®
Simvastatin	MedChem Express®
Lovastatin	MedChem Express®

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan cihazların listesi

ÇİHAZIN ADI	MARKA
Buzdolabı (+4°C)	Templo
Derin Dondurucu (-20°C)	Edesa
Epoch Spektrofotometre	BioTek EPOCH
Laminar Air Flow (Class II Safety Cabinet)	ESCO NordicSafe
Derin Dondurucu (-80°C)	ESCO Lexicon
Co ₂ İnkübatör	ESCO Celculture CO ₂ İnkübatör
Mikropipet	Axypet
Mini Santrifüj	WiseSpin
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen
Vortex	Wisd Wisemix VM-10

Çizelge 3.2. (Devam)

Otoklav	Tomy SX-500E
İnvert Mikroskop	Leica
Su Banyosu	Wisd WiseBath
Saf Su Cihazı	Millipore Direct-Q-3 UV
Blotlama cihazı	Bio-Rad Trans-Blot® Turbo™
Jel Görüntüleme Cihazı	Bio-rad ChemiDoc
Isıtıcı-soğutucu Kuru Blok	Biorer, ch 202
Masaüstü pH Metre	Adwa, AD1000
Hassas Terazî	Shimadzu ATX 224

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürü

Deneylerde nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y kullanılmıştır. SH-SY5Y hücreleri DMEM F12 besiyerinde çoğaltılmıştır. Besiyeri içerisinde, %10 FBS, %1 Penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri +4°C’de saklanmıştır. Hücreler steril T25 flask içinde, 37°C, %5 CO₂’li ortamda kültüre edilmiştir. Çoğaltılan hücrelerin yoğunluğuna göre her 2 ya da 4 günde bir pasaj yapılmıştır.

3.2.2. Hücre sayımı

Kültürdeki hücreler deneyin amacına göre %70-%80 konfluensiye ulaştıktan sonra PBS ile yıkandıktan sonra tripsin ile flask zemininden ayrılması sağlanmıştır. Mini santrifüj ile 8000 rpm’de 30 sn santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldı ve çöken hücreler 1 ml besiyerinde çözülmüştür. Hemositometre lamına 15 µl tripan blue, 15 µl hücre koyularak invert mikroskopta sayım yapılmıştır. Toplam hücre sayısı 3.1 numaralı formüle göre bulunmuştur.

$$\text{Hücre sayısı} \times \text{seyreltme faktörü (2)} \times 10.000 \quad (3.1)$$

3.2.3. Hücrelerin 48 Well Plate'e ekimi

Her kuyuda, SH-SY5Y hücreleri için 3000 hücre olacak şekilde 48 well plate'e ekim yapılmıştır. Plate, hücrelerin morfoloji alıp zemine tutunması için CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir.

3.2.4. İlaçların hazırlanması

Kemoterapi ilaçları gemcitabin ve karmustin ile kolesterol ilaçları simvastatin ve lovastatin olmak üzere kullanılan bütün ilaçlar medchem expresten temin edilmiştir. Hazırlanan stok çözeltiler -80°C'de saklanmıştır.

3.2.4.1. Gemcitabinin hazırlanması

Medchem expresten satın alınan gemcitabine, firmanın protokolüne uygun olarak DMSO ile hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok -80°C'de saklandı. 100 µg/ml ana stok için 5mg gemcitabine hassas terazi ile tartılıp 250µl DMSO içinde çözülmüştür. Daha sonra ana stoktan 10 µg/ml ve 1 µg/ml dozlar 3.2. numaralı formüle göre hesaplanarak hazırlanmıştır. Yapılan literatür tarama ile belirlenen 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml dozlar uygun besiyeri ile hazırlanarak hücrelere uygulanmıştır.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad (3.2.)$$

3.2.4.2. Karmustinin hazırlanması

Karmustin, Medchem Expressin ilacı hazırlama prosedürüne uygun olarak DMSO ile ilacın tamamı çözülerek 150 mM ana stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok -80°C'de saklanmıştır. 3.2 numaralı formüle göre önce 10 mM ara stok hazırlanmıştır, daha sonra da literatür taramasından elde edilen verilere uygun olarak belirlenen 1,5 µM, 3,125 µM, 6,25 µM, 12,5 µM 50 µM ve 100 µM dozlar yine aynı formüle göre hesaplanarak besiyeri ile hazırlandı ve hücrelere verilmiştir.

3.2.4.3. Simvastatinin hazırlanması

Simvastatin 10 mM stok çözeltisi hazırlanırken üretici firmanın talimatlarına göre çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. 4,18 mg tartılan ilaç 1 ml DMSO içinde çözülmüştür. 40 µM, 80 µM, 100 µM dozlar literatüre uygun olarak tespit edilmiş ve hücrelere tatbik edilmiştir.

3.2.4.4. Lovastatinin hazırlanması

Simvastatine benzer şekilde 10 mM ana stok 4,04 mg tartılarak 1 ml DMSO ile hazırlanmıştır ve 48 well plate'e ekilen hücrelere 40 µM, 80 µM, 100 µM dozlar uygulanmıştır.

3.2.5. Hücre canlılık testi

Yukarıda anlatıldığı gibi stokları hazırlanan ilaçların literatürden elde edilen bilgiler doğrultusunda belirlenen dozları, SH-SY5Y hücreleri için DMEM F12 besiyeri kullanılarak hazırlanmıştır. Her doz 3 tekrar halinde hücrelere verilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak besiyeri kullanılmıştır. 24 saat sonunda test bileşiklerinin hücre canlılığı üzerine etkilerini belirlemek üzere cell viability detection kit-8 (CVDK-8, EcoTech Biotechnology) kullanılmıştır.

Firma protokolünde belirtilen şekilde her kuyuda %10 kit olacak şekilde hücrelere verilmiş ve plate 3 saat boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. Her 1 saat sonunda ve toplam 3 kez epoch mikroplate reader ile ölçüm alınmıştır. Sonuçlar excell üzerinden hesaplandı ve probit analizi ile IC₂₀ değerleri belirlenmiştir.

IC₂₀ değerleri ile kemoterapi-statin kombinasyonları hücrelere uygulanmıştır. CVDK-8 testi ile ilaçların tek tek ve ikili kombinasyonları arasında ki canlılık farkları ölçülmüştür.

3.2.6. Apoptozis

Küçük petri dishlere 100.000 hücre ekilmiş ve 24 saat morfoloji alıp zemine tutunmaları için inkübe edilmiştir. Canlılık testleri ile belirlenen IC₂₀ değerlerine göre hücrelere ilaçlar uygulanmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda bütün hücreler mikroskop altında kontrol edilmiştir. %1 PMSF, %1 DTT, kalanı lysis buffer olacak şekilde lysis buffer hazırlanmıştır. Çok fazla ölüm olduğu gözlenen gruplardan besiyeri alınıp santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası pellet hazırlanan lysis buffer ile çözülmüştür. Diğer petrilere besiyerleri uzaklaştırılmış ve petri dishler PBS ile yıkanmıştır. Her petri dishe 50-75 µl lysis buffer eklenmiştir. Scraper yardımıyla zeminden hücreler kazınarak bir ependorf tüpüne alınmıştır. Ependorf tüpleri 10 dk, 13.000 rpm, +4°C'de santrifüj edilerek süpernatant yeni bir tüpe alınmıştır. Her tüpten 5'er µl alınıp (2 tekrar) 96 well plate'e koyulmuş ve üstlerine 100 µl comassie brilliant blue boyası eklenmiştir. Başlangıçta hazırlanan lysis buffer blank olarak kullanılmıştır. Plate, plate shaker'da 30 sn boyunca 37°C'de çalkalanmıştır. Sonra 595 nm'de plate reader ile konsantrasyon ölçümü yapılmıştır. Konsantrasyonlar (3.4) numaralı formüle göre hesaplanmıştır.

$$y = 0,0766 * x - 0,121 \quad (3.4.)$$

Hesaplama sonucunda elde edilen değerlere göre her tüpten 3'er tekrar olacak şekilde 96 well plate'e koyulmuştur. Blank olarak lysis kullanılmıştır. Reaksiyon buffer %1 DTT eklenerek hazırlanmıştır. Her kuyuya 50'şer µl reaksiyon buffer, 5'er µl substrat eklenmiştir. 30 sn 37°C'de çalkalanan plate daha sonra 15 dk. inkübatörde inkübe edilmiştir. 15 dk. sonunda plate reader ile 405 nm'de ölçüm alınmıştır. 2 saat boyunca her 15 dk' da bir ölçüm alınmıştır. Sonuçlar excell üzerinde değerlendirilmiştir.

3.2.7. Western Blot

Küçük petri dishlere SH-SY5Y hücrelerinden 100.000 hücre ekilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. Canlılık testleri ile belirlenen IC₂₀ değerlerine göre hücreler ilaçlarla 24 saat muamele edilmiştir. 24 saat sonunda besiyerleri uzaklaştırılıp petri dishler PBS ile yıkanmıştır. %1 PMSF, %1 proteaz inhibitörü, kalanı RIPA lysis buffer olacak şekilde lysis buffer hazırlanmıştır. Her petri dishe 100-120 µl lysis buffer eklenmiş ve scraper

3. MATERYAL ve YÖNTEM

yardımıyla zeminden hücreler kazınmıştır ve bir ependorf tüpüne alınmıştır. Hücrelerin tamamen parçalanması amacıyla her tüp sıvı azot ile dondurulup elde çözülmüştür. Dondur-çöz işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Daha sonra 13.000 rpm, +4°C'de 10 dk. santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant yeni bir tüpe alınmıştır. Her bir tüpten 5µl alınıp (2 tekrar) 96 well plate'e koyulup üzerlerine comassie brillant blue boyası da eklenerek 30 sn 37°C'de çalkalanmıştır. Sonra 595 nm'de plate reader ile protein konsantrasyonları ölçülmüştür. Protein konsantrasyonları 3.3 numaralı formüle göre hesaplanmıştır. Tüpte kalan proteinlerin üzerine 10x laemli buffer eklenerek 100°C'de 5 dk. kaynatıldıktan sonra ependorf tüpleri -80 °C'de saklanmıştır.

$$y = 0,0766 * x - 0,121 \quad (3.3.)$$

İzole edilen proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayırmak amacıyla SDS-PAGE yapılmıştır. Proteinler sodyum dodesil sülfat (SDS) ile negatif (-) yükle yüklenerek aralarında ki yük farkı ortadan kaldırılarak elektriksel ortamda yalnızca moleküler ağırlıklarına göre ayrılmaları sağlanmıştır. Çizelge 3.4, 3.5 ve 3.6'da bu deney için kullanılan malzemelerin tam listesi gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. %10'luk Ayırma Jeli (Alt jel)

Ayırma Jeli (%10)	Hacim
Distile su	1400 µl
Akrilamid+Bis-akrilamid	1650 µl
Tris-HCl (pH:8.8)	1875 µl
SDS	50 µl
Amonyum persülfat (APS)	50 µl
TEMED	2 µl

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çizelge 3.4. Ayırma jeli (%12)

Ayırma Jeli (%12)	Hacim
Distile su	1.000 µl
Akrilamid+Bis-akrilamid	2.000 µl
Tris-HCl (pH:8.8)	1.875 µl
SDS	50 µl
APS	50 µl
TEMED	2 µl

Çizelge 3.5 %4'lük Yürütme Jeli (Üst jel)

Yürütme jeli (%4)	Hacim
Distile su	2.175 µl
Akrilamid+Bis-akrilamid	397,5 µl
Tris-HCl (pH:6.8)	375 µl
SDS	30 µl
APS	30 µl
TEMED	7,5 µl

B-aktin proteini için %10'luk ayırma jeli, kaspaz-8 proteini için %12'lik ayırma jeli hazırlanmıştır. APS ve TEMED hariç tüm solüsyonlar steril bir şişede karıştırılmıştır. Jelin katılaşmasını sağlayan APS ve TEMED en son eklenmiş ve hızlıca 2 cam plaka arasına dökülmüştür. Jelin üzerine saf izopropanol eklendi ve 30-40 dk. donması için beklenmiştir. Donan jelin üzerinde ki izopropanol uzaklaştırılmış ve üst jel yine APS ve TEMED'in sonradan eklenmesiyle hazırlanıp alt jel üstüne dökülmüştür. Tarak takıldıktan sonra jelin donması için +4°C'de 40-45 dk. bekletilmiştir. Polimerizasyon gerçekleşikten sonra tarak çıkarılmıştır. Cam, tanka yerleştirilerek 1x running buffer dökülmüştür. Kuyulara proteinler yüklenmiş ve 80 V'de marker açılana kadar yürütülmüştür, marker açılınca 110 V'ye çıkarılmıştır ve yürütmeye devam edilmiştir.

Yürütme tamamlanınca moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler için transfer aşamasına geçilmiştir. Transfer buffer ile ıslatılan whatman kâğıdı cihaza koyulmuştur. Nitroselüloz membran da transfer buffer ile ıslatılarak cam üzerinde ki jelin

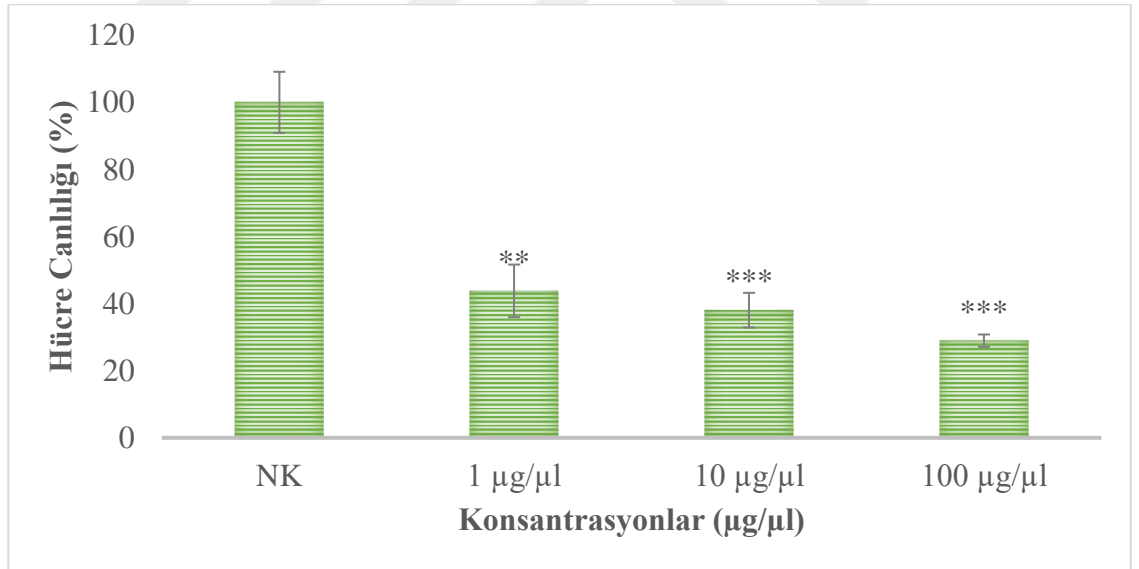
üstüne koyulmuştur. Baloncuk olmamasına özen gösterilmiştir. Jel, membran altta olacak şekilde whatman kağıdının üzerine konulmuştur. Üstüne tekrar ıslatılmış whatman kâğıdı koyulmuş ve sandviç şeklinde bir yapı oluşturulmuştur. Cihaz 3 kez 7'şer dk. çalıştırılmıştır (25 V 1,3 A). Transfer işlemi bittikten sonra membrana aktarılan protein bantlarının görünür olması adına Ponceou S (EcoTech Biotechnology) boyası ile bir süre çalkalanmıştır. Daha sonra hedef proteinin olduğu aralığa göre membran kesildi ve PBST ile 3 kez yıkanmıştır. Bloklama ajanı olarak süt tozu (EcoTech Biotechnology) hazırlanmış ve 1 saat boyunca membran PBST ile hazırlanan süt tozu (%5) içinde yatay çalkalayıcıda çalkalanmıştır. 1 saatin sonunda membran, 3 kez PBST ile yıkanmıştır. Hedef proteinin antikoru ile bir gece +4°C'de yatay çalkalayıcı ile çalkalanmıştır. Non spesifik bağlanmaları uzaklaştırmak için 3 kez PBST ile yıkanan membran eğer protein için sekonder antikor varsa 1 saat sekonder antikor ile çalkalayıcı üzerinde muamale edilmiştir ve sonra yine 3 kez yıkanmıştır. Bantların görüntülenmesi için ClearBand ECL Western blot substratı kullanılmıştır. Biorad ChemiDoc MP cihazı ile bantlardan görüntü alınmıştır.

3.2.8. İstatiksel Analiz

Mevcut tez çalışmasındaki tüm deneyler 3 tekrarlı olarak çalışılmış olup ve değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Veriler istatiksel olarak Student's t test aracılığıyla analiz edilmiş ve $p < 0,05$ değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

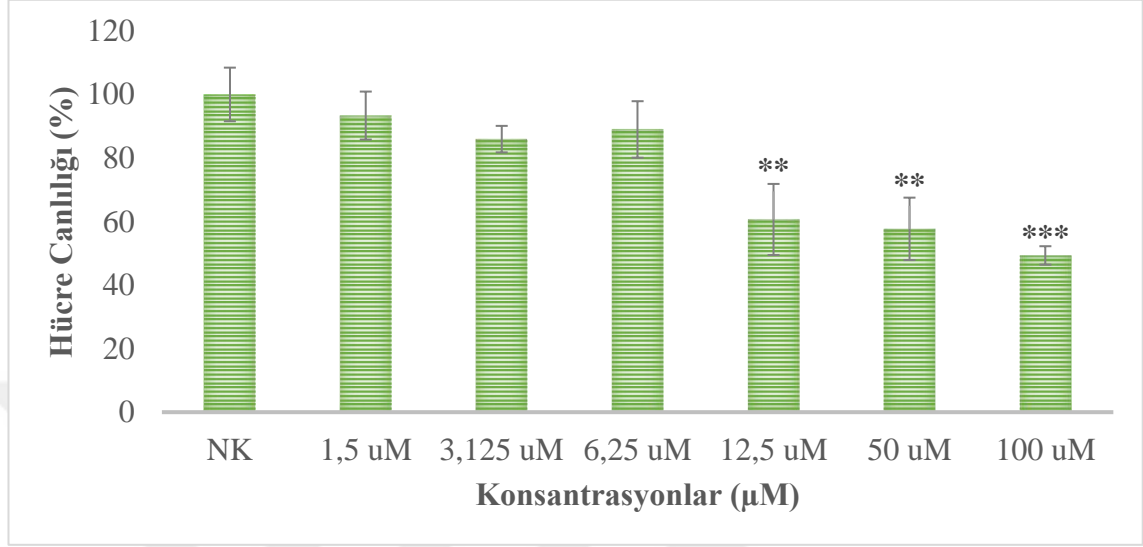
Bu tez çalışmasında, statinlerin ve kemoterapötik ajanların SH-SY5Y hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkileri 3 adımda belirlenmiştir. İlk olarak statinler ve kemoterapötiklerin tek başına SH-SY5Y hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. İkinci olarak, proliferasyon testlerinden alınan sonuçlara göre her bileşik için IC20 konsantrasyonları belirlenmiştir. Son olarak, statinler ve kemoterapötikler için belirlenen IC20 konsantrasyonları ile ilaçların kombinasyonları SH-SY5Y hücrelerine uygulanmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Başlangıçta, yapılan literatür araştırması ile her test için konsantrasyon aralıkları belirlenmiş ve deneyler, aşağıdaki konsantrasyon aralıkları kullanılarak 24 saatte yapılmıştır: gemsitabin (1-100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), karmustin (1,5-100 μM), simvastatin (40-100 μM), lovastatin (40-100 μM). Şekil 4.1'de gösterildiği gibi SH-SY5Y hücrelerinde artan gemsitabin konsantrasyonu ile proliferasyonda önemli bir azalma olduğunu ortaya çıkarılmıştır. Sırasıyla %43,8, %38, %28,9 oranları ile en düşük dozda bile hücre canlılığı %50' nin altına düşmüştür.



Şekil 4.1. 24 saatte gemsitabinin SH-SY5Y hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi (NK: Negatif kontrol; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ve *** $P < 0.001$, negatif kontrole kıyasla).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

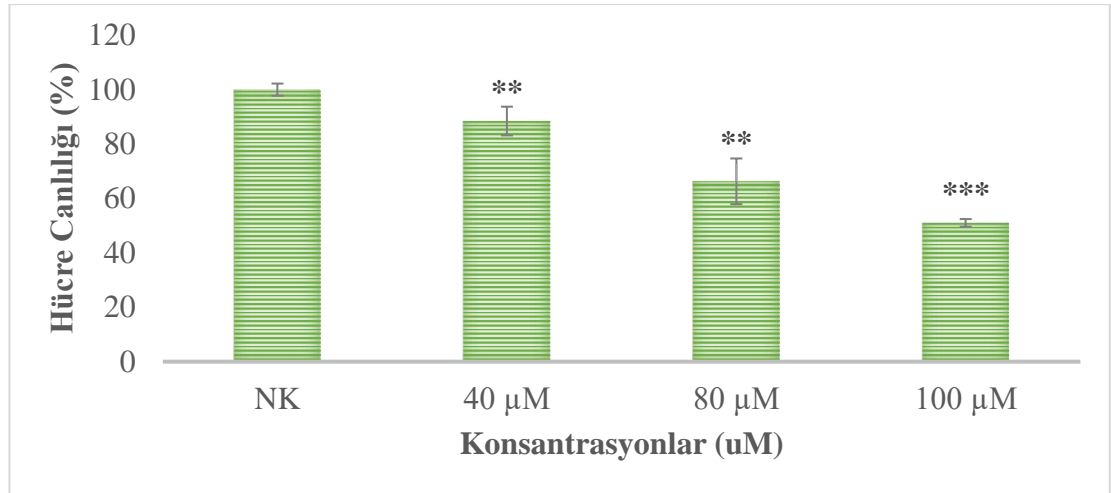
Şekil 4.2' de görüldüğü gibi, 12,5 μM ve üzerindeki karmustin konsantrasyonları, SH-SY5Y hücrelerinin çoğalmasını önemli ölçüde inhibe etmiştir. 12,5 μM konsantrasyondan itibaren canlılık oranları: % 60,6, % 57,6, % 49,3.



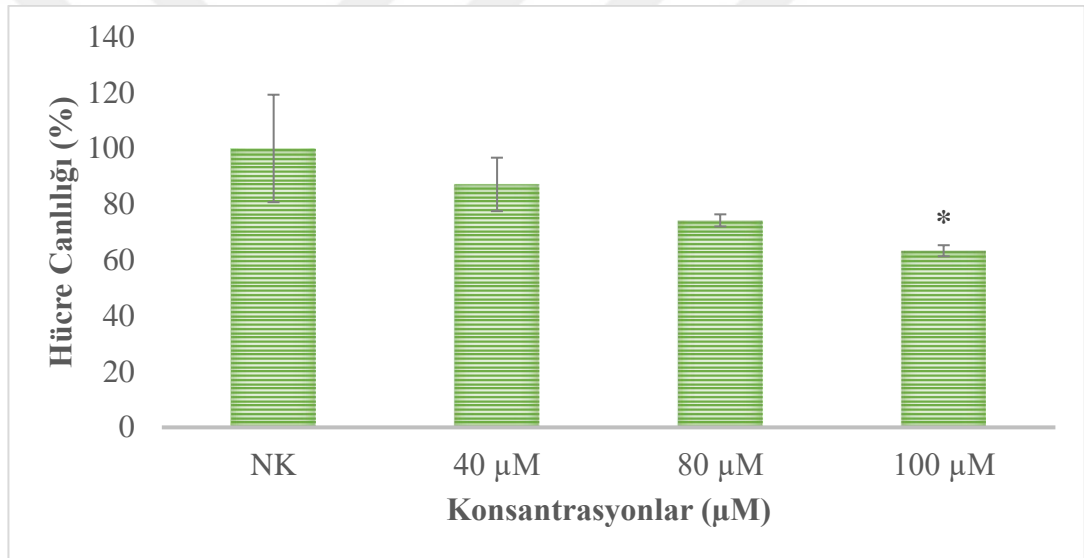
Şekil 4.2. 24 saatte karmustinin SH-SY5Y hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi (NK: Negatif kontrol; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ve *** $P < 0.001$, negatif kontrole kıyasla).

Statinlerin, artan dozlarda uygulandığı SH-SY5Y hücrelerinde statinlerin etkileri incelendiğinde elde edilen sonuçlar, uygulanan tüm simvastatin konsantrasyonlarında ve en yüksek lovastatin konsantrasyonunda hücre canlılığını önemli derecede inhibe ettiğini göstermektedir. Bu sonuçlar Şekil 4.3 ve Şekil 4.4' te gösterilmiştir. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, yüksek dozlarda çok daha fazla ölüm meydana gelmiştir. Ancak yüksek dozlardaki ölüm oranlarının fazlalığına rağmen her iki ilaç grubu da tek başına uygulandıklarında, SH-SY5Y hücrelerinde doza bağlı anti-proliferatif aktivite sergiledikleri tespit edilmiştir. Simvastatin uygulaması ile hücre canlılığı en düşük konsantrasyondan yükseğe doğru sırasıyla % 88,4, % 66,2, % 51,2 olarak ortaya çıkmıştır. Lovastatin de ise % 87,1, % 74,2, % 63,3 oranları görülmüştür.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



Şekil 4.3. 24 saatte simvastatinin SH-SY5Y hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi (NK: Negatif kontrol; *P<0.05, **P<0.01 ve ***P<0.001, negatif kontrole kıyasla).



Şekil 4.4. 24 saatte lovastatinin SH-SY5Y hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi (NK: Negatif kontrol; *P<0.05, **P<0.01 ve ***P<0.001, negatif kontrole kıyasla).

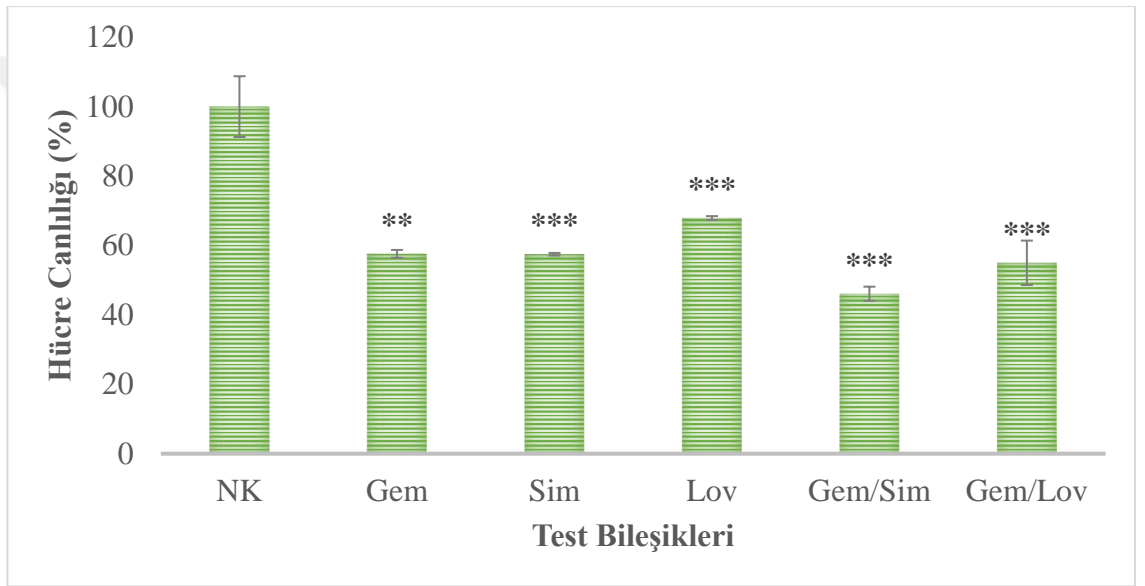
Bu veriler kullanılarak hesaplanan IC₂₀ değerleri Şekil 4.5' te gösterilmiştir.

Şekil 4.5. Test bileşiklerinin IC₂₀ değerleri

	Gemsitabin	Karmustin	Simvastatin	Lovastatin
IC ₂₀	0,054	7,534	53,978	58,045

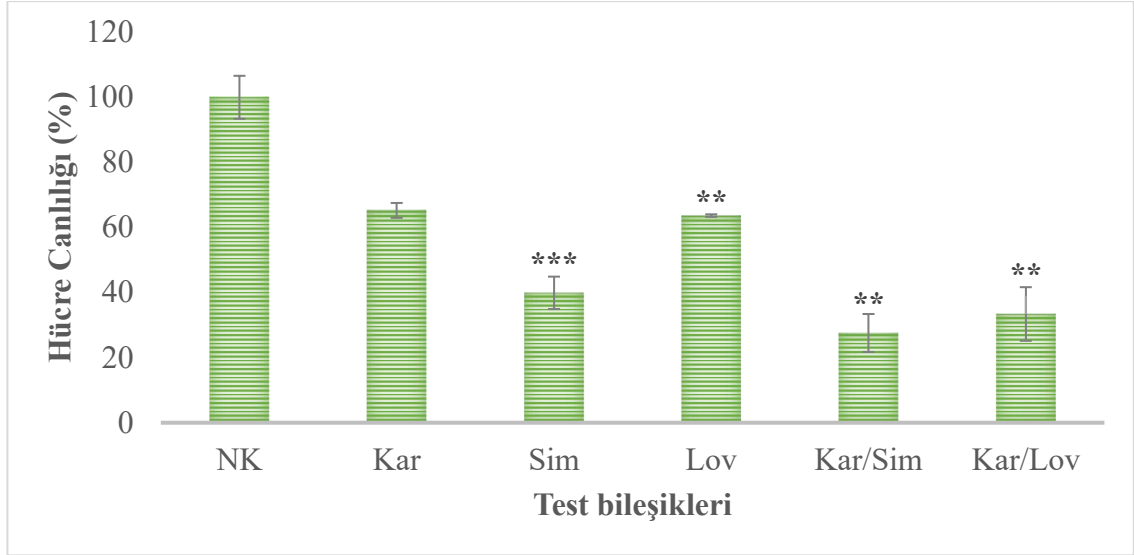
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Sinerjistik etkileri araştırılan test bileşiklerinin birlikte uygulanmasının ardından elde edilen bulgular göz önüne alındığında, SH-SY5Y hücrelerinde simvastatin hem gemsitabinin hem de karmustinin antikanser etkisini arttırmıştır ancak karmustinin etkisini gemsitabinden daha fazla arttırdığı ortaya konmuştur. Diğer taraftan, lovastatin de simvastatine benzer şekilde her iki kemoterapötik hücresel canlılığı üzerindeki etkinliğini artırmasına rağmen, karmustinin etkisini gemsitabine kıyasla daha belirgin şekilde arttırmıştır. Bunlara ek olarak statinlerin kendi aralarında karşılaştırıldıklarında lovastatinin daha etkili olduğu tespit edilmiştir. İlgili sonuçlar Şekil 4.6 ve 4.7'de özetlenmiştir.



Şekil 4.6. Gemsitabin ve statinlerin eşzamanlı tedavisinin 24 saatte SH-SY5Y hücrelerinde proliferasyon üzerindeki etkileri. (NK: Negatif kontrol; Gem: Gemsitabin; Sim: Simvastatin; Lov: Lovastatin; *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001, negatif kontrole kıyasla).

Tek başına uygulandığında gemsitabin %57, lovastatin %67, simvastatin %57 iken, statinler ile gemsitabin birlikte uygulandığında gemsitabin-lovastatin %54, gemsitabin-lovastatin %46 olarak hücre canlılığı önemli ölçüde azalmıştır.

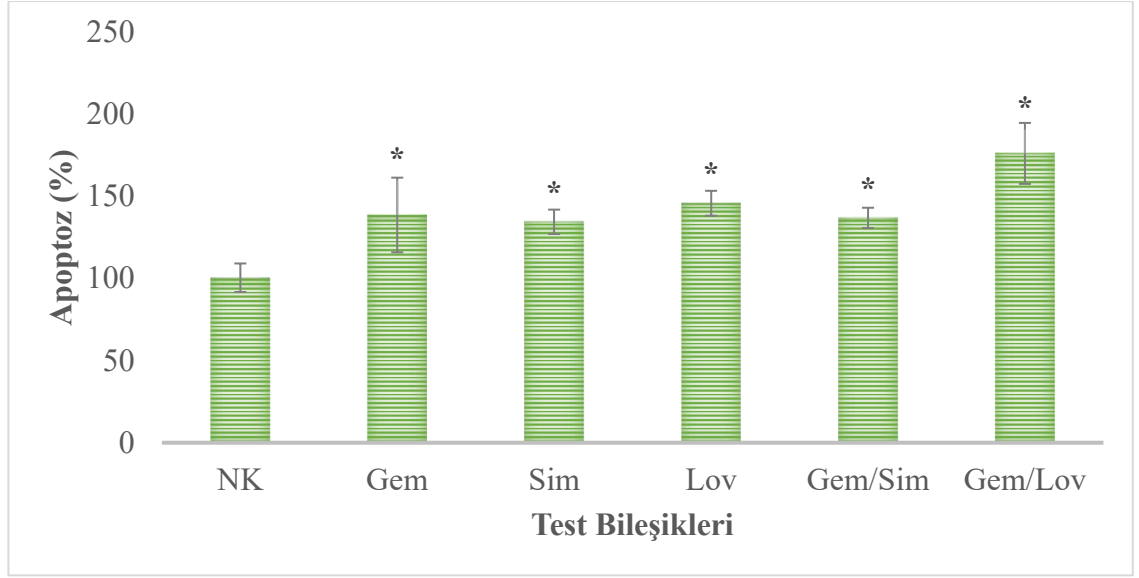


Şekil 4.7. Karmustin ve statinlerin eşzamanlı tedavisinin 24 saatte SH-SY5Y hücrelerinde proliferasyon üzerindeki etkileri. (NK: Negatif kontrol; Kar: Karmustine; Sim: Simvastatin; Lov: Lovastatin; *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001, negatif kontrole kıyasla).

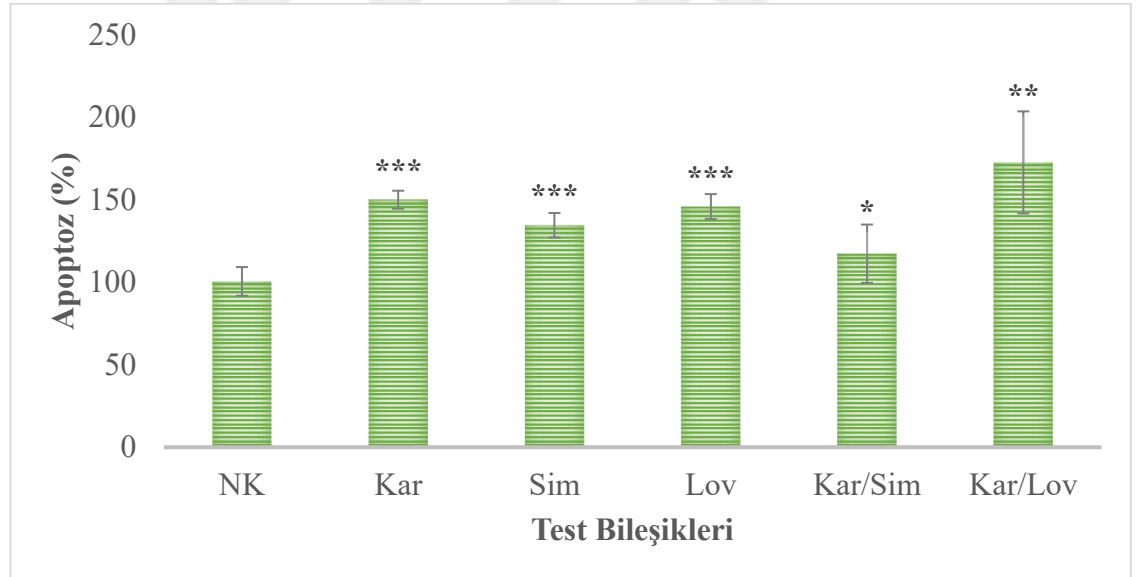
Karmustin ve statinler tek tek uygulandığında sırasıyla % 65, % 39, % 63 oranında hücre canlılık oranlarının birlikte uygulama ile büyük ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (% 27,5, % 33,4).

Kaspaz aktivasyonu programlı hücre ölümünün bir özelliğidir ve Kaspaz-3 apoptozun ana enzimatik belirteçidir. Statinlerin ve kemoterapötiklerin kombine uygulaması ile hücrelerdeki değişen kaspaz-3 aktivitesi, Caspase-3 Kolorimetrik Aktivite Deney Kiti ile analiz edilmiştir. Şekil 4.8 ve 4.9, SH-SY5Y hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin negatif kontrole kıyasla tüm test bileşiklerinde, önemli ölçüde arttığını göstermektedir. Bu sonuçların gösterdiği en önemli bulgu, her iki statinin, gemsitabin ve karmustin ile tedaviyi takiben SH-SY5Y hücrelerinde kaspaz aktivitesini, negatif kontrole kıyasla önemli ölçüde arttırmasıdır. Lovastatin ve simvastatin, kaspaz-3 aktivitesi açısından karşılaştırıldığında, önce ki sonuçlara benzer şekilde lovastatinin simvastatinden daha yüksek kaspaz-3 aktivitesi indüklediği gösterilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



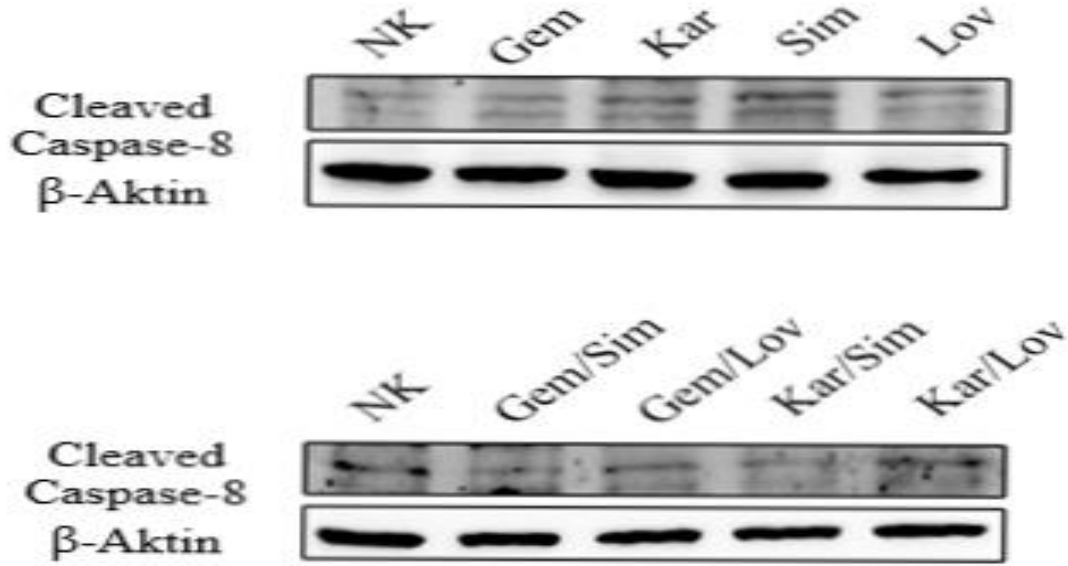
Şekil 4.8. SH-SY5Y hücrelerinde gemsitabin ve statinlere maruz kaldıktan sonra gözlenen apoptoz oranları. (NK: Negatif kontrol; Gem: Gemsitabin; Sim: Simvastatin; Lov: Lovastatin; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, negatif kontrole kıyasla).



Şekil 4.9. SH-SY5Y hücrelerinde karmustin ve statinlere maruz kaldıktan sonra gözlenen apoptoz oranları. (NK: Negatif kontrol; Kar: Karmustin; Sim: Simvastatin; Lov: Lovastatin; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, negatif kontrole kıyasla).

SH-SY5Y hücrelerine statinlerin (simvastatin ve lovastatin) kemoterapötiklerle (gemsitabin ve karmustin) eşzamanlı uygulamasının apoptoz üzerindeki etkilerini doğrulamak için western blot analizi yapılmıştır. Sonuçlar hem statinlerin hem de kemoterapötiklerin, tek başına uygulandığında SH-SY5Y hücrelerinde kaspaz-8'i aktive ederek apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca bulgularımız, karmustin ve

lovastatinin eşzamanlı tedavisinin diğer kombinasyonlara kıyasla apoptozu daha güçlü bir şekilde indüklediğini göstermiştir. Bununla birlikte, kaspaz testi sonuçlarına uygun olarak, gemsitabin ile birlikte lovastatinin kullanımı da etkin bir şekilde apoptozu indüklemiştir. (Şekil 4.10)



Şekil 4.10. Test bileşikleri ile muamele edilmiş SH-SY5Y hücrelerinde insan kaspaz-8'in Western blot analizi. (NK: Negatif kontrol; Gem: Gemsitabin; Kar: Karmustin; Sim: Simvastatin; Lov: Lovastatin).

Beyin kanserleri yetişkinlere kıyasla çocuklarda daha sık ortaya çıkmaktadır ve çocuklarda kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir (McNeill 2016; Barnholtz-Sloan et al. 2018; Udaka and Packer 2018). Son yıllarda kanser tedavisi için kullanılan yeni tedavilere rağmen beyin kanserlerinde sıklıkla beyin cerrahisi, kemoterapi ve radyoterapi yöntemleri tercih edilmektedir (Karajannis et al. 2008). Ancak tedavide kullanılan kemoterapi için bir sınırlayıcı vardır. Birçok kemoterapi ilacının hedef dokuya etkili bir şekilde ulaşamamasında ki neden kan beyin bariyerinin seçici geçirgen yapısıdır ve bu durum tedavi etkinliğini sınırlayan önemli bir etmendir (Ebrahimi Shahmabadi et al. 2014). Dolayısıyla beyin tümörlerinin kemoterapötik tedavisinde ilk hedef, kan beyin bariyerini geçebilecek bir kemoterapi ilacının kullanılmasıdır. Mevcut tezde, *in vitro* beyin kanseri (SHSY-5Y) modelinde, kemoterapi ilaçları, gemsitabin ve karmustin ile kan-beyin bariyerini geçebilen statinlerin (simvastatin ve lovastatin) sinerjistik etkisi araştırılmıştır (MacDonald et al. 2008). Bu amaçla test bileşikleri ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu CVDK-8 ve yara iyileştirme

yöntemleri ile araştırılmıştır. Ayrıca test bileşiklerinin apoptotik etkilerini moleküler düzeyde göstermek için apoptoz testi ve western blot yöntemleri kullanılmıştır.

Sonuçlar her iki statin ilacının da doza bağlı olarak hücrelerde antiproliferatif etkilerinin var olduğu gösterilmiştir. Statinlerin hücre canlılığını inhibe edici bu etkilerinin en önemli özelliği tüm gruplarda artan dozlara bağlı olarak meydana gelmesidir. SH-SY5Y hücrelerinde, lovastatin ve simvastatinin hücre proliferasyonunu inhibe edici etkisine rağmen bu ilaçların kemoterapötik ajanlarla (gemsitabin ve karmustin) kombinasyonu, proliferasyonu her iki ajanın tek başına olduğundan daha etkili bir şekilde inhibe etmiştir. Çalışmalardan elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar daha önce birçok araştırmacı tarafından da tespit edilmiştir. Yürütülen bir çalışmada lovastatin ile tedavi edilen meme kanseri hücrelerinde (MDAMB231 ve MDAMB468), lovastatinin doza bağlı olarak hücre proliferasyonunun inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Klawitter et al. 2010). Martirosyan et al. 2010, tüm yumurtalık kanseri hücre hatlarında lovastatin muamelesinin hücre canlılığını düşürdüğünü tespit etmiştir (Ovca432, A2780, Hey, Ovca429, HOC7, A2780ADR, DOV13, Skov3, A2780CIS ve OVHS1). Prostat kanseri hücre hatları PC3, DU145 ve LnCap ile yapılan çalışmada hücreler 24 saat boyunca lovastatin ve simvastatin ile muameleye tabi tutulmuş ve proliferasyonların önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir (Hoque et al. 2008). Atorvastatin, simvastatin ve lovastatinin, karaciğer kanseri hücreleri (HepG-2) üzerindeki etkileri sitotoksik etkileri araştırıldı ve artan konsantrasyonlarda hücrelere verilen statinlerin hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir (Wang et al. 2017). Yine yakın zamanda yapılan bir çalışma simvastatin, lovastatin ve atorvastatinin insan kolorektal kanser hücre hatlarında (HT29, SW620 and HCT116), yumurtalık kanseri hücre hattında (OVCAR8) ve meme kanseri hücre hattında (MCF-7), hücre canlılığını azalttığını gösterilmiştir (Rao and Rao 2021). Daha önce yapılan çalışmalar, hücrelere kemoterapötik ve statinlerin kombinasyonlarının uygulanmasının, hücre canlılığını azalttığı, yalnız statin ya da kemoterapötik uygulamasına kıyasla kombine ilaç uygulamasının hücre proliferasyonunu daha etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermiştir. İnsan pankreas kanalı adenokarsinomu hücre hattı (MIA PaCa-2) üzerinde pitavastatinin ve gemsitabinin tek uygulanması ve gemsitabinin pitavastatin ile kombine uygulamasının etkileri üzerine yapılan bir çalışmada, hücre canlılığının, hem her iki ilacın tek uygulanmasında hem de kombine ilaç tedavisinde

önemli ölçüde azaldığı ve ilaçların kombine uygulamasının monoterapilerine göre hücre canlılığının inhibisyonunda daha fazla etkili olduğu bildirilmiştir (Chen et al. 2020).

Statinler, kanser hücrelerinde birkaç farklı mekanizmayı tetikleyerek hücre proliferasyonunda azalmaya veya inhibisyona neden olabilmektedir. Bu mekanizmalardan birkaçı, apoptozun indüklenmesi (I) ve G1 fazında hücre döngüsünün durdurulması (II), mitokondri ve endoplazmik retikulum stres yollarının aktive edilmesi (III), hücre büzülmesi (IV) ve kontak inhibisyonun kaybını içerir (V) (Hoque et al. 2008; Wang et al. 2017; Rao and Rao 2021). Bu çalışmada, nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y üzerinde statinlerin (simvastatin ve lovastatin) tek başına ve kemoterapötik ajanlarla (gemsitabin ve karmustin) kombinasyon halindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, test bileşiklerinin, SH-SY5Y hücrelerine tek başına uygulandığında, kontrole kıyasla apoptozu indüklediğini göstermiştir. Statinler ve kemoterapötikler hücrelere birlikte uygulandığında ise statinler, kemoterapötiklerin etkisini arttırmış ve apoptozu daha etkin bir şekilde indüklemiştir. Ayrıca elde edilen sonuçlara göre lovastatin ve karmustinin eş zamanlı uygulanmasının kaspaz-8 aktivitesini artırdığı ve apoptozu indüklediği protein düzeyinde gösterilmiştir. Nitekim mevcut literatür bilgileri de bu sonuçları desteklemektedir. Son yıllarda *in vitro* çalışmalarda simvastatin ve lovastatinin insan kolon kanseri (HT-29), lenfoma (A20 ve EL4), insan leiomyomu, prostat kanseri (PC3), kolorektal kanser (HCT116), yumurtalık kanserinde (Hey 1B and Ovar-3 hücreleri), medulloblastom beyin tümörü (Daoy, D283 ve D341 hücre dizileri), meme kanseri (MCF-7, T47D, MDA-MB-231 ve BT-549), osteosarkom (UMR-106), Barrett's özofagus adenokarsinomu (OE33 ve BIC-1 EAC hücreleri), safra kanalı kanseri (SNU-245), hipofaringeal karsinomlarda (Fadu) çeşitli mekanizmalarla apoptozun indüklenmesinde rol aldıkları rapor edilmiştir (Ogunwobi and Beales 2008; Liu et al. 2009; Sandoval-Usme et al. 2011; Chang et al. 2013; Qi et al. 2013; Borahay et al. 2014; Jang et al. 2016; Wang et al. 2016; Lee et al. 2016; Yen et al. 2016; Sheikholeslami et al. 2019; Deng et al. 2019). Yapılan bir çalışmada yumurtalık kanseri hücrelerinde lovastatinin p53'ten bağımsız bir şekilde apoptozu indüklediği ve kemoterapötik bir ajan olan doksorubisin ile sinerjistik etkilerinin olduğu ortaya konmuştur (Martirosyan et al. 2010). Buranrat et al. (2017), meme kanseri hücre hattı MCF-7 hücrelerine uygulanan simvastatin ve doksorubisin kombinasyonunun, kaspaz-3 aktivitesini artırarak apoptozu indüklediğini ortaya koydu bu sonuçlara benzer şekilde, yürütülen bir diğer çalışmada tek

başına simvastatin uygulamasına kıyasla, simvastatin ve doksorubisin kombinasyonunun daha etkili olduğu gsterilmiŐtir (Rezano et al. 2021). Kemoterapötik ajanlar olan 5-FU ve sislpatin ile kolon kanseri hücre hatları SW480, HCT116, LoVo ve HT29'da indüklenen apoptoz, lovastatinin muamelesi ile arttırılmıŐtır (Agarwal et al. 1999). Xu et al. Pankreas kanserinde küre oluşturan hücrelerin atorvastatin, selekoksib ve tipifarnib kombinasyonu ile tedavisinin apoptotik hücre sayısında güçlü bir artışa yol açtığını göstermiştir. Aynı çalışmada apoptozdaki artışın kaspaz-3 aktivitesinden kaynaklandığı gösterilmiştir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, SH-SY5Y hücreleri ile yapılan bu tez çalışmasında karmustin ve gemsitabinin sitotoksik etkilerinin statinler ile arttırıldığı gösterilmiştir. Simvastatin ve lovastatinin kaspaz bağımlı apoptozu indüklediği ve dolayısıyla kemoterapötiklerin antitümör etkisinin artmasına katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, nöroblastoma tedavisinde, simvastatin ve lovastatinin moleküler etki mekanizmaları ile ilgili mevcut çalışmalara katkıda bulunur ve kanser tedavisinde halihazırda kullanılan kemoterapötik ajanların etkinliğini arttırmayı amaçlayan ileride yapılacak çalışmalar için bir temel sağlamaktadır. Diğer bir ifadeyle, statinlerin ve kemoterapötik ilaçların birlikte kullanımı, kanser hücrelerinin ilaç direncini azaltabilir, böylece bu ilaçların terapötik etkisini büyük ölçüde iyileştirebileceği düşünülmektedir. Ayrıca, kanser tedavi stratejileri arasında belirli konsantrasyonlarda statinlerin dahil edilmesinin, kemoterapi ilaçlarının etkin tedavisinde kullanılacak dozun potansiyel olarak azaltılabileceği ve böylece kemoterapi ilaçlarının yan etkilerinin azaltılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Agarwal, B., Bhendwal, S., Halmos, B., Moss, S. F., Ramey, W. G., Holt, P. R. 1999. Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clinical Cancer Research: an Official Journal of The American Association for Cancer Research*, 5(8), 2223–2229.
- Ahmad, F., Sun, Q., Patel, D., Stommel, J. M. 2019. Cholesterol metabolism: a potential therapeutic target in glioblastoma. *Cancers*, 11(2), 146.
- Anonymous 2018. Web Sitesi: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/carmustine>, Erişim Tarihi 04.12.2022.
- Anonymous 2021a. Web Sitesi: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>, Erişim Tarihi: 05.04.2022.
- Anonymous 2021b. Web Sitesi: <https://www.cancer.net/cancer-types/central-nervous-system-tumors-brain-and-spinal-cord-childhood/introduction> Erişim Tarihi: 15.02.2022.
- Anonymous 2022a. Web Sitesi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, Erişim Tarihi: 08.04.2022.
- Anonymous 2022b. Web Sitesi: <https://gco.iarc.fr/> Erişim Tarihi: 05.04.2022.
- Baran, Y. 2018. *Moleküler Kanser Biyolojisi*. Kısayol Yayıncılık, 582, Ankara.
- Ballabh, P., Braun, A., Nedergaard, M. 2004. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease*, 16(1), 1–13.
- Bathaie, S. Z., Ashrafi, M., Azizian, M., Tamanoi, F. 2017. Mevalonate Pathway and Human Cancers. *Current molecular pharmacology*, 10(2), 77–85.
- Benito-Vicente, A., Uribe, K. B., Jebari, S., Galicia-Garcia, U., Ostolaza, H., Martin, C. 2018. Familial hypercholesterolemia: the most frequent cholesterol metabolism disorder caused disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3426.
- Borahay, M. A., Kilic, G. S., Yallampalli, C., Snyder, R. R., Hankins, G. D., Al-Hendy, A., Boehning, D. 2014. Simvastatin potently induces calcium-dependent apoptosis of human leiomyoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(51), 35075–35086.
- Brahimi-Horn, M. C., Chiche, J., Pouyssegur, J. 2007. Hypoxia and cancer. *Journal of Molecular Medicine*, 85(12), 1301–1307.

- Buranrat, B., Suwannaloet, W., Naowaboot, J. 2017. Simvastatin potentiates doxorubicin activity against MCF-7 breast cancer cells. *Oncology Letters*, 14, 6243-6250.
- Butterick, T. A., Igbavboa, U., Eckert, G. P., Sun, G. Y., Weisman, G. A., Müller, W. E., Wood, W. G. 2010. Simvastatin stimulates production of the antiapoptotic protein Bcl-2 via endothelin-1 and NFATc3 in SH-SY5Y cells. *Molecular Neurobiology*, 41(2-3), 384–391.
- Cai, S., Gao, Z. 2021. Atorvastatin inhibits proliferation and promotes apoptosis of colon cancer cells via COX-2/PGE2/ β -Catenin Pathway. *Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 26(4), 1219–1225.
- Chang, H. L., Chen, C. Y., Hsu, Y. F., Kuo, W. S., Ou, G., Chiu, P. T., Huang, Y. H., Hsu, M. J. 2013. Simvastatin induced HCT116 colorectal cancer cell apoptosis through p38MAPK-p53-survivin signaling cascade. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(8), 4053–4064.
- Chen, Y. H., Chen, Y. C., Lin, C. C., Hsieh, Y. P., Hsu, C. S., Hsieh, M. C. 2020. Synergistic anticancer effects of gemcitabine with pitavastatin on pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2 *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Management and Research*, 12, 4645–4665.
- Codini, M., Garcia-Gil, M., Albi, E. 2021. Cholesterol and sphingolipid enriched lipid rafts as therapeutic targets in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 726.
- Davidoff A. M. 2012. Neuroblastoma. *Seminars in Pediatric Surgery*, 21(1), 2–14.
- Deng, J. L., Zhang, R., Zeng, Y., Zhu, Y. S., Wang, G. 2019. Statins induce cell apoptosis through a modulation of AKT/FOXO1 pathway in prostate cancer cells. *Cancer Management and Research*, 11, 7231–7242.
- Ding, X., Zhang, W., Li, S., Yang, H. 2019. The role of cholesterol metabolism in cancer. *American Journal of Cancer Research*, 9(2), 219–227.
- Duong H, Bajaj, T. Web Sites: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540994/>, Erişim Tarihi: 12.03.2021.
- Duarte, J. A., de Barros, A., Leite, E. A. 2021. The potential use of simvastatin for cancer treatment: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 141, 111858.
- Ebrahimi Shahmabadi, H., Movahedi, F., Koochi Moftakhari Esfahani, M., Alavi, S. E., Eslamifar, A., Mohammadi Anaraki, G., Akbarzadeh, A. 2014. Efficacy of Cisplatin-loaded polybutyl cyanoacrylate nanoparticles on the glioblastoma. *Tumour Biology: The Journal of The International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(5), 4799–4806.

- Faubion, S. S., Kapoor, E., Moyer, A. M., Hodis, H. N., Miller, V. M. 2019. Statin therapy: does sex matter?. *Menopause*, 26(12), 1425–1435.
- Freed-Pastor, W. A., Mizuno, H., Zhao, X., Langerød, A., Moon, S. H., Rodriguez Barrueco, R., Barsotti, A., Chicas, A., Li, W., Polotskaia, A., Bissell, M. J., Osborne, T. F., Tian, B., Lowe, S. W., Silva, J. M., Børresen-Dale, A. L., Levine, A. J., Bargonetti, J., Prives, C. 2012. Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. *Cell*, 148(1-2), 244–258.
- Göbel, A., Zinna, V. M., Dell'Endice, S., Jaschke, N., Kuhlmann, J. D. Wimberger, P., Rachner, T. D. 2020. Anti-tumor effects of mevalonate pathway inhibition in ovarian cancer. *BMC Cancer*, 20(1), 703.
- Greenaway, J. B., Virtanen, C., Osz, K., Revay, T., Hardy, D., Shepherd, T., DiMattia, G., Petrik, J. 2016. Ovarian tumour growth is characterized by mevalonate pathway gene signature in an orthotopic, syngeneic model of epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*, 7(30), 47343–47365.
- Guo, D., Reinitz, F., Youssef, M. 2012. An LXR agonist promotes glioblastoma cell death through inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-dependent pathway. *Cancer Discovery*, 1(5), 442–456.
- Higashi, T., Hayashi, H., Kitano, Y., Yamamura, K., Kaida, T., Arima, K., Taki, K., Nakagawa, S., Okabe, H., Nitta, H., Imai, K., Hashimoto, D., Chikamoto, A., Beppu, T., Baba, H. 2016. Statin attenuates cell proliferative ability via TAZ (WWTR1) in hepatocellular carcinoma. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 33(11), 123.
- Hoque, A., Chen, H., Xu, X. C. 2008. Statin induces apoptosis and cell growth arrest in prostate cancer cells. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 17(1), 88–94.
- Huang, S. W., Chyuan, I. T., Shiue, C., Yu, M. C., Hsu, Y. F., Hsu, M. J. 2020. Lovastatin-mediated MCF-7 cancer cell death involves LKB1-AMPK-p38MAPK-p53-survivin signalling cascade. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(2), 1822–1836.
- Hus, M., Grzasko, N., Szostek, M., Pluta, A., Helbig, G., Woszczyk, D., Adamczyk-Cioch, M., Jawniak, D., Legiec, W., Morawska, M., Kozinska, J., Waciński, P., Dmoszynska, A. 2011. Thalidomide, dexamethasone and lovastatin with autologous stem cell transplantation as a salvage immunomodulatory therapy in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Annals of Hematology*, 90(10), 1161–1166.
- Jang, H. J., Hong, E. M., Park, S. W., Byun, H. W., Koh, D. H., Choi, M. H., Kae, S. H., Lee, J. 2016. Statin induces apoptosis of human colon cancer cells and downregulation of insulin-like growth factor 1 receptor via proapoptotic ERK activation. *Oncology Letters*, 12(1), 250–256.

- Karajannis, M., Allen, J. C., Newcomb, E. W. 2008. Treatment of pediatric brain tumors. *Journal of Cellular Physiology*, 217(3), 584–589.
- Keha, E. 2014. *Biyokimya Aktif yayinevi*, 645, İstanbul.
- Kitagawa, K., Moriya, K., Kaji, K., Saikawa, S., Sato, S., Nishimura, N., Namisaki, T., Akahane, T., Mitoro, A., Yoshiji, H. 2020. Atorvastatin augments gemcitabine-mediated anti-cancer effects by inhibiting yes-associated protein in human cholangiocarcinoma cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7588.
- Kim, C., Kim, B. 2018. Anti-Cancer natural products and their bioactive compounds inducing er stress-mediated apoptosis: a review. *Nutrients*, 10(8), 1021.
- Khandelwal Gilman, K. A., Han, S., Won, Y. W., Putnam, C. W. 2021. Complex interactions of lovastatin with 10 chemotherapeutic drugs: a rigorous evaluation of synergism and antagonism. *BMC Cancer*, 21(1), 356.
- Kholodenko, I. V., Kalinovskiy, D. V., Doronin, I. I., Deyev, S. M., Kholodenko, R. V. 2018. Neuroblastoma origin and therapeutic targets for immunotherapy. *Journal of Immunology Research*, 2018, 7394268.
- Klawitter, J., Shokati, T., Moll, V., Christians, U., Klawitter, J. 2010. Effects of lovastatin on breast cancer cells: a proteo-metabonomic study. *Breast Cancer Research: BCR*, 12(2), R16.
- Kochuparambil, S. T., Al-Husein, B., Goc, A., Soliman, S., Somanath, P. R. 2011. Anticancer efficacy of simvastatin on prostate cancer cells and tumor xenografts is associated with inhibition of Akt and reduced prostate-specific antigen expression. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 336(2), 496–505.
- Kuang, Y. L., Theusch, E., M Krauss, R., W Medina, M. 2021. Identifying genetic modulators of statin response using subject-derived lymphoblastoid cell lines. *Pharmacogenomics*, 22(7), 413–421.
- Lee, J., Hong, E. M., Jang, J. A., Park, S. W., Koh, D. H., Choi, M. H., Jang, H. J., Kae, S. H. 2016. Simvastatin induces apoptosis and suppresses insulin-like growth factor 1 receptor in bile duct cancer cells. *Gut and Liver*, 10(2), 310-317.
- Liu, H., Liang, S. L., Kumar, S., Weyman, C. M., Liu, W., Zhou, A. 2009. Statins induce apoptosis in ovarian cancer cells through activation of JNK and enhancement of bim expression. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 63(6), 997–1005.
- Liu, W., Chakraborty, B., Safi, R., Kazmin, D., Chang, C., McDonnell, D. P. 2021. Dysregulated cholesterol homeostasis results in resistance to ferroptosis increasing tumorigenicity and metastasis in cancer. *Nature Communications*, 12(1) 5103.

- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffiatti, R., von Deimling, A., Ellison, D. W. 2021. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1231–1251.
- Lyon, J. G., Mokarram, N., Saxena, T., Carroll, S. L., Bellamkonda, R. V. 2017. Engineering challenges for brain tumor immunotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 114, 19–32.
- Martirosyan, A., Clendening, J. W., Goard, C. A., Penn, L. Z. 2010. Lovastatin induces apoptosis of ovarian cancer cells and synergizes with doxorubicin: potential therapeutic relevance. *BMC Cancer*, 10, 103.
- Murai T. 2015. Cholesterol lowering: role in cancer prevention and treatment. *Biological Chemistry*, 396(1), 1–11.
- Nazih, H., Bard, J. M. 2020. Cholesterol, Oxysterols and LXRs in breast cancer pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1356.
- Noble, S., Goa, K. L. Gemcitabine, Web Sites: <https://doi.org/10.2165/00003495-199754030 00009>, Erişim tarihi: 11.05.2021.
- MacDonald, N., Stanbrook, M. B., Rieder, M. J. 2008. Statins, indication creep and risks for children and youth. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal de l'Association Medicale Canadienne*, 179(12), 1239.
- Obermeier, B., Daneman, R., Ransohoff, R. M. 2013. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature Medicine*, 19(12), 1584–1596.
- Ogunwobi, O. O., Beales, I. L. 2008. Statins inhibit proliferation and induce apoptosis in Barrett's esophageal adenocarcinoma cells. *The American Journal of Gastroenterology*, 103(4), 825–837.
- Ouimet, M., Barrett, T. J., Fisher, E. A. 2019. HDL and reverse cholesterol transport. *Circulation Research*, 124(10), 1505–1518.
- Patel, D., Ahmad, F., Kambach, D. M., Sun, Q., Halim, A. S., Kramp, T., Camphausen, K. A., Stommel, J. M. 2019. LXR β controls glioblastoma cell growth, lipid balance, and immune modulation independently of ABCA1. *Scientific Reports*, 9(1), 15458.
- Pérez-Herrero, E., Fernández-Medarde, A. 2015. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 93, 52–79.
- Protic, D., Salcedo-Arellano, M. J., Dy, J. B., Potter, L. A., & Hagerman, R. J. 2019. New targeted treatments for fragile X syndrome. *Current Pediatric Reviews*, 15(4), 251–258.

- Qi, X. F., Zheng, L., Lee, K. J., Kim, D. H., Kim, C. S., Cai, D. Q., Wu, Z., Qin, J. W., Yu, Y. H., Kim, S. K. 2013. HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis of lymphoma cells by promoting ROS generation and regulating Akt, Erk and p38 signals via suppression of mevalonate pathway. *Cell Death & Disease*, 4(2), e518.
- Rao, P. S., Rao, U. S. 2021. Statins decrease the expression of c-Myc protein in cancer cell lines. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 476(2), 743–755.
- Reboldi, A., Dang, E. 2018. Cholesterol metabolism in innate and adaptive response. *F1000 Research*, 7, F1000 Faculty Rev-1647.
- Rezano, A., Ridhayanti, F., Rangkuti, A. R., Gunawan, T., Winarno, G., Wijaya, I. 2021. Cytotoxicity of simvastatin in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 22(S1), 33–42.
- Richards, R. M., Sotillo, E., Majzner, R. G. 2018. CAR T cell therapy for neuroblastoma. *Frontiers in Immunology*, 9, 2380.
- Riscal, R., Skuli, N., Simon, M. C. 2019. Even cancer cells watch their cholesterol. *Molecular Cell*, 76(2), 220–231.
- Sandoval-Usme, M. C., Ordóñez, N., Umaña-Pérez, A., Fernández Pérez, L., Sánchez-Gómez, M. 2011. Anti-tumor effects of simvastatin on umr-106 osteosarcoma cell line. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 35(136), 287-294.
- Sheikholeslami, K., Ali Sher, A., Lockman, S., Kroft, D., Ganjibakhsh, M., Nejati-Koshki, K., Shojaei, S., Ghavami, S., Rastegar, M. 2019. Simvastatin induces apoptosis in medulloblastoma brain tumor cells via mevalonate cascade prenylation substrates. *Cancers (Basel)*. 11(7), 994.
- Tajan, M., Vousden, K. H. 2020. Dietary approaches to cancer therapy. *Cancer Cell*, 37(6), 767–785.
- Tomaszewski, M., Stępień, K. M., Tomaszewska, J., Czuczwar, S. J. 2011. Statin-induced myopathies. *Pharmacological Reports: PR*, 63(4), 859–866.
- Villanueva-Meyer, J. E., Mabray, M. C., Cha, S. 2017. Current clinical brain tumor imaging. *Neurosurgery*, 81(3), 397–415.
- Wang, T., Seah, S., Loh, X., Chan, C. W., Hartman, M., Goh, B. C., Lee, S. C. 2016. Simvastatin-induced breast cancer cell death and deactivation of PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling are reversed by metabolic products of the mevalonate pathway. *Oncotarget*, 7(3), 2532–2544.
- Wang, Y., Xie, Y., Ma, J., Gong, R., Yan, Z., Wang, W., Wang, Y., Xu, B., Li, X. 2017. Lovastatin induces apoptosis of HepG-2 cells by activating ROS-dependent mitochondrial and ER stress pathways. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 10(12), 11480–11488.

- Wang, J. J., Lei, K. F., Han, F. 2018. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(12), 3855–3864.
- Whittle, S. B., Smith, V., Doherty, E., Zhao, S., McCarty, S., Zage, P. E. 2017. Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 17(4), 369–386.
- Xu, X. T., Chen, J., Ren, X., Ma, Y. R., Wang, X., Ma, Y. Y., Zhao, D. G., Zhou, R. P., Zhang, K., Goodin, S., Li, D. L., Zheng, X. 2021. Effects of atorvastatin in combination with celecoxib and tipifarnib on proliferation and apoptosis in pancreatic cancer sphere-forming cells. *European Journal of Pharmacology*, 893, 173840.
- Yanae, M., Tsubaki, M., Satou, T., Itoh, T., Imano, M., Yamazoe, Y., & Nishida, S. 2011. Statin-induced apoptosis via the suppression of ERK1/2 and Akt activation by inhibition of the geranylgeranyl-pyrophosphate biosynthesis in glioblastoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 30(1), 74.
- Yen, C. S., Chen, J. C., Chang, Y. F., Hsu, Y. F., Chiu, P. T., Shiue, C., Chuang, Y. F., Ou, G., Hsu, M. J. 2016. Lovastatin causes FaDu hypopharyngeal carcinoma cell death via AMPK-p63-survivin signaling cascade. *Scientific Reports*, 6, 25082.