

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GLİOBLASTOMA (GBM) HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE
MULTİFLORAL BAL VE TEMOZOLOMİD-BAL KOMBİNE
TEDAVİSİNİN SİTOTOKSİK, ANTİMETASTATİK VE APOPTOTİK
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Deniz Evrim KAVAK

ORCID: 0000-0002-9681-4468

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR

EYLÜL 2022

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2020970167

TC.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GLİOBLASTOMA (GBM) HÜCRE HATLARI
ÜZERİNDE MULTİFLORAL BAL VE
TEMOZOLOMİD-BAL KOMBİNE TEDAVİSİNİN
SİTOTOKSİK, ANTİMETASTATİK VE
APOPTOTİK POTANSİYELİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Deniz Evrim KAVAK

ORCID: 0000-0002-9681-4468

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ

ORCID: 0000-0001-7939-5153

2. Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Sevgi İRTEGÜN KANDEMİR

ORCID: 0000-0001-6160-5626

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Tıbbi Biyoloji ve Genetik **Deniz Evrim KAVAK** ‘**GLİOBLASTOMA (GBM) HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE MULTİFLORAL BAL VE TEMOZOLOMİD-BAL KOMBİNE TEDAVİSİNİN SİTOTOKSİK, ANTİMETASTATİK VE APOPTOTİK POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**’ konulu Yüksek Lisans tezinitarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ

ORCID: 0000-0001-7939-5153

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

BAŞKAN

Doç.Dr. Zeynep Yüce

ORCID: 0000-0001-5417-2471

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

ÜYE

Doç.Dr. Melek PEHLİVAN

ORCID: 0000-0001-8755-4812

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi

Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu

Tıbbi Laboratuvar Teknikleri

ÜYE

Prof.Dr. Hakkı Ogün SERCAN

ORCID: 0000-0003-4423-4821

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı

YEDEK ÜYE

Dr. Öğr. Üyesi Uğur ŞEKER

ORCID: 0000-0002-7106-6301

Harran Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim
Dalı

YEDEK ÜYE

BEYAN

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum “Glioblastoma (GBM) hücre hatları üzerinde Multifloral Bal ve Temozolomid-Bal kombine tedavisinin sitotoksik, anti metastatik ve apoptotik potansiyelinin araştırılması” başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri , belgesel akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun sunduğumu , tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi , tezimin özgün olduğunu , tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarımı kabullendiğimi beyan ederim.

Deniz Evrim KAVAK

05/09/22

TEŞEKKÜR

Öncelikli teşekkürü; bu süreçte benden desteğini esirgemeyen danışmanlarım, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Sefa Kızıldağ ve Dicle Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Sevgi Irtegun Kandemir'e ediyorum.

Bilginin gücünü kırılmaz bir asa gibi bana kazandıran, lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca yardım, bilgi ve tecrübelerini eksiksiz ve sabırla anlatarak beni çekirdekten yetiştiren, her ne olmuşsam ve olacaksam kendisine borçlu olduğum, bu süreçte beni bir danışmandan öte abla gibi destekleyen, ahlakını, çalışma prensiplerini, dürüstlüğü, azmini ve çalışkanlığını örnek aldığım **Doç.Dr. Sevgi İRTEGÜN KANDEMİR**'e kelimelerle ifade edemeyeceğim kadar minnettarlığımı sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, her koşulda çalışmaya teşvik ederek kendisinden önce bizim çıkarlamızı düşünen, kendisine ne zaman danışsam bana zamanını ayırıp elinden gelenden fazlasını sunan, yanına çekinmeden gidebildiğim, anlayışını ve samimiyetini benden esirgemeyen **Prof.Dr. Sefa KIZILDAĞ**'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın hiçbir aşamasında beni yalnız bırakmayan Khayala RASULOVA' ya, yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olan değerli hocalarım; Dr. Öğr. Üyesi Uğur ŞEKER ve Dr. Öğr. Üyesi Israt JAHAN'a ve bana sabırla yardım eden değerli arkadaşlarım; Fatma Zehra DOKUMACI, Feysel ÇAKMAK, Umut Özerk ÖNKOL, Belma NAİBANT, Berfin NAS' a

Tezimde büyük emeği geçmiş; meslektaşım, sırdaşım ve en yakın arkadaşım ablam Fikriye Fulya KAVAK' a; eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, aldığım her kararda beni destekleyen, hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan değerli ailem; Mine KAVAK ve Mehmet Tahir KAVAK' a en büyük ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deniz Evrim KAVAK

İzmir-2022

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	
TABLOLAR DİZİNİ	i
ŞEKİLLER DİZİNİ	ii
KISALTMALAR	iv
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Sinir Sistemi Morfolojisi	2
2.1.1.Nöron	3
2.1.2. Glia (Nöroglia) ve Çeşitleri	4
2.1.2.1. Merkezi Sinir Sistemindeki Glia Hücreleri	6
2.2.Kanser Tanımı ve Özellikleri	12
2.2.1.Beyin Tümörleri	14
2.2.1.1.Beyin Kanserlerinin Sınıflandırılması	14
2.2.1.2.Glioblastoma Multiforme	20
2.3 Apoptoz	25
2.4 Bal	31
2.4.1 Balın antikanser özellikleri	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Araştırmanın Tipi	34
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	34
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi,	34
3.4. Çalışma Materyali	34
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	34
3.6. Veri Toplama Araçları	35
3.6.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller	35
3.6.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları	35
3.6.1.2. Çalışmada Kullanılan Malzemeler ve Markaları	
3.6.2 Kullanılan Metotlar	
3.6.2.1 Hücre Hattının Uygun Ortam Koşullarında İnkübe Edilmesi	
3.6.2.2 Hücre Hatlarının Pasajlanması ve Dondurulması	
3.6.2.3. Bal ve Temozolomid ‘in GBM Hücrelerine Sitotoksik Etkisinin Araştırılması ve IC50 değerinin bulunması	41
3.6.2.4 Bal ve Bal-TMZ kombine tedavisinin Apoptoz ilişkili genlerde mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırılması (RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Kantitatif Real-Time PCR)	44
3.6.2.5 Bal ve TMZ’ nin sinyal yolları ile olan etkileşiminin Western Blot yöntemiyle araştırılması	50
4. BULGULAR	56
4.1. MTT Sitotoksikite Deney Bulguları	56
4.1.1. U-118 MG Hücre Hattının MTT Deneyi ve IC50 Değerinin Hesaplanması	56
4.1.2. T98G Hücre Hattının MTT Deneyi ve IC50 Değerinin Hesaplanması	59
4.1.3. U-87 MG Hücre Hattının MTT Deneyi ve IC50 Değerinin Hesaplanması	62

4.2. Bal ve Bal-TMZ kombine tedavisinin Apoptoz ilişkili genlerde mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırılması	65
4.2.1. Bal ve Bal+TMZ Uygulamasının U-118 MG Hücre Hattına Etkisi	65
4.2.2. Bal ve Bal-TMZ Uygulamasının T98G Hücre Hattına Etkisi	67
4.2.3. Bal ve Bal-TMZ Uygulamasının U-87 MG Hücre Hattına Etkisi	68
4.3. Bal ve Bal-TMZ kombine tedavisinin Apoptoz ilişkili genlerde protein ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırılması	69
4.3.1. Bal ve Bal-TMZ Uygulamasının U-118 MG Hücre Hattına Etkisi	69
4.3.2. Bal ve Bal+TMZ Uygulamasının T98G Hücre Hattına Etkisi	71
4.3.3. Bal ve Bal+TMZ Uygulamasının U-87 MG Hücre Hattına Etkisi	73
4.4 Bal ve Bal+TMZ Uygulamasının Migrasyon Etkisi	75
4.4.1. Bal ve Bal-TMZ Uygulamasının U-118 MG Hücrelerinde Migrasyona Etkisi	75
4.4.2. Bal ve Bal-TMZ Uygulamasının T98G MG Hücrelerinde Migrasyona Etkisi	77
4.4.3. Bal ve Bal-TMZ Uygulamasının U-87 MG Hücrelerinde Migrasyona Etkisi	78
5.TARTIŞMA	80
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	85
7. KAYNAKÇA	86
8. EKLER	98
Ek 3. Arbis Özgeçmiş	98
Ek 4. Etik Kurul Onayı	100

TABLolar DİZİNİ

TABLO 1. U-118 MG HÜCRE HATLARI İÇİN MTT PLATE DÜZENEGİ	42
TABLO 2. T98G HÜCRE HATLARI İÇİN MTT PLATE DÜZENEGİ	42
TABLO 3. U-87 MG HÜCRE HATLARI İÇİN MTT PLATE DÜZENEGİ	43
TABLO 4. MTT SONUÇLARININ GRAPHPAD PRISM 7 ANALİZİ İLE BELİRLENEN IC50 SONUÇLARI	45
TABLO 5. CDNA SENTEZ KİTİ BİLEŞENLERİ	46
TABLO 6. PRİMER DİZAYN BİLGİLERİ	47
TABLO 7. RT-PCR KİT BİLEŞENLERİ VE MİKTARLARI	48
TABLO 8. GBM HÜCRELERİNİN UYGULAMA GRUPLARI	51
TABLO 9. ARAŞTIRMA PLANI	54



SEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL 1. MERKEZİ VE PERİFERİK SİNİR SİSTEMİ: MSS BEYİN VE OMURİLİĞİ İÇERİKEN, PSS SİNİRLERİ İÇERİR	3
ŞEKİL 2. NÖRON ANATOMİSİ	4
ŞEKİL 3. GLİAL HÜCRE ÇEŞİTLERİ .	5
ŞEKİL 4. ASTROSİTLER. SEREBRAL KORTEKSTEN GOLGİ İLE BOYANMIŞ BÖLÜMLERİN FOTOMİKROGRAFLARI.	7
ŞEKİL 5. PROTOPLAZMİK ASTROSİTLERİN HİPOKAMPUS (A) VE KORTEKSTE (B) GLİAL FİBRİLER ASİDİK PROTEİN (GFAP) BOYAMASININ EŞ ODAKLI KONFOKAL GÖRÜNTÜLERİ	8
ŞEKİL 6. HÜCRENİN TAM YAPISINI ORTAYA ÇIKARAN Dİİ İLE ETİKETLENMİŞ İNSAN FİBRÖZ ASTROSİT.	9
ŞEKİL 7. MİYELİNİZASYON.	11
ŞEKİL 8. KANSERİN TEMEL ÖZELLİKLERİ	13
ŞEKİL 9. HİSTOLOJİK VE GENETİK ÖZELLİKLERE DAYALI OLARAK YAYGIN GLİOMALARIN SINIFLANDIRILMASI İÇİN BASİTLEŞTİRİLMİŞ BİR ALGORİTMA	16
ŞEKİL 10. GLİOMALAR İÇİN BASİTLEŞTİRİLMİŞ TANISAL KARAR AĞAC	17
ŞEKİL 11. MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ TÜMÖRLERİNİN 2016 DÜNYA SAĞLIK ÖRGÜTÜ SINIFLANDIRMASI	18
ŞEKİL 12. MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ TÜMÖRLERİNİN 2016 DÜNYA SAĞLIK ÖRGÜTÜ SINIFLANDIRMASI DEVAMI.	19
ŞEKİL 13. GLİOBLASTOMUN MANYETİK REZONANS GÖRÜNTÜLEMESİ.	22
ŞEKİL 14. MRI GÖRÜNTÜLEME – MRI PERFÜZYONU. BİR İNSULAR GLİOBLASTOMA İÇİN GÖRECELİ SEREBRAL KAN HACMİ (RCBV)	23
ŞEKİL 15. TEMOZOLOMİD’ İN ETKİ MEKANİZMASI.	25
ŞEKİL 16. APOPTOZ YOLAKLARI	27
ŞEKİL 17. SİNYAL İLETİMİ VE KANSER (74).	30
ŞEKİL 18. BAL ÜRÜNLERİNİN ANTİKANSER VE ANTİTÜMÖR AKTİVİTELERİNDEN SORUMLU MOLEKÜLER MEKANİZMALAR.	33
ŞEKİL 19. GLİOBLASTOMA HÜCRE HATLARININ İNKÜBE EDİLDİĞİ CO2 İNKÜBATÖR	39
ŞEKİL 20. DENEY UYGULAMALARININ YAPILDIĞI BİYOGÜVENLİKLİ LAMİNER KABİN	40
ŞEKİL 21. GBM HÜCRELERİNİN 96 WELL PLATE DÜZENİNE EKİMİ VE MTT GÖRÜNTÜLERİ	43
ŞEKİL 22. REAL TIME PCR İÇİN HAZIRLANAN DENEY DÜZENEKLERİ	44
ŞEKİL 23: REAL TIME PCR ISIL KOŞUL TABLOSU	49
ŞEKİL 24: REAL TIME PCR PİK GÖRÜNTÜLERİ	50
ŞEKİL 25. WESTERN BLOT PROTEİN AYIRMA, TRANSFER VE GÖRÜNTÜLEME AŞAMALARI	52
ŞEKİL 26. U-118 MG HÜCRE HATTININ 24 VE 48 SAATE GÖRE % HÜCRE CANLILIĞI, MTT SONUCU	57
ŞEKİL 27. U-118-MG HÜCRE HATTININ 24 VE 48 SAATE GÖRE HESAPLANMIŞ IC50 DEĞERLERİ,	57
ŞEKİL 28. KONTROL, BAL, TMZ VE BAL-TMZ GRUP DOZLARIYLA 24 (A) VE 48 (B) SAAT İNKÜBASYONDAN SONRAKİ U-118 MG ‘NİN % CANLILIĞI.	58
ŞEKİL 29.T98G HÜCRE HATTININ 24. VE 48. SAATE GÖRE % HÜCRE CANLILIĞI, MTT SONUCU	59
ŞEKİL 30.T98G HÜCRE HATTININ 24 VE 48 SAATE GÖRE HESAPLANMIŞ IC50 DEĞERLERİ	60
ŞEKİL 31. KONTROL, BAL, TMZ VE BAL-TMZ GRUP DOZLARI İLE 24 (A) VE 48 (B) İNKÜBASYONDAN SONRAKİ T98G ‘NİN % CANLILIĞI.	61
ŞEKİL 32.U-87 MG HÜCRE HATTININ 24. VE 48. SAATE GÖRE % HÜCRE CANLILIĞI, MTT SONUCU	62
ŞEKİL 33. U-87 MG HÜCRE HATTININ 24 VE 48 SAATE GÖRE HESAPLANMIŞ IC50 DEĞERLERİ,	63
ŞEKİL 34. KONTROL, BAL, TMZ VE BAL-TMZ GRUP DOZLARI İLE 24 (A) VE 48 (B) İNKÜBASYONDAN SONRAKİ U-87 MG ‘NİN % CANLILIĞI..	64
ŞEKİL 35. KONTROL, BAL, TMZ VE BAL-TMZ GRUP DOZLARI İLE 48 SAAT BOYUNCA TEDAVİ EDİLEN U-118 MG HÜCRE SERİSİ ÜZERİNDE ANTİ-APOPTOTİK (BCL-2, BCL-XL) VE PRO-APOPTOTİK (BAD, BAX) GENLERİNİN RT-PCR ANALİZİ.	66
ŞEKİL 36: KONTROL, BAL, TMZ VE BAL-TMZ GRUP DOZLARI İLE 48 SAAT BOYUNCA TEDAVİ EDİLEN T98G HÜCRE SERİSİ ÜZERİNDE ANTİ-APOPTOTİK (BCL-2, BCL-XL) VE PRO-APOPTOTİK (BAD, BAX) GENLERİNİN RT-PCR ANALİZİ.	67

ŞEKİL 37: KONTROL, BAL, TMZ VE BAL-TMZ GRUP DOZLARI İLE 48 SAAT BOYUNCA TEDAVİ EDİLEN U-87 MG HÜCRE SERİSİ ÜZERİNDE ANTI-APOPTOTİK (BCL-2, BCL-XL) VE PRO-APOPTOTİK (BAD, BAX) GENLERİNİN RT-PCR ANALİZİ.	69
ŞEKİL 38: KONTROL, BAL, TMZ VE BAL-TMZ GRUP DOZLARI İLE 48 SAAT BOYUNCA TEDAVİ EDİLEN U-118 MG HÜCRE SERİSİ ÜZERİNDEKİ ETKİNİN BAX, BCL-2 VE ERK ANTİKORLARIYLA WESTERN BLOT YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ.	70
ŞEKİL 39: BAL, TMZ VE BAL+ TMZ İLE 48 SAAT BOYUNCA TEDAVİ EDİLEN T98G HÜCRE SERİSİ ÜZERİNDEKİ ETKİNİN BAX, BCL-2 VE ERK ANTİKORLARIYLA WESTERN BLOT YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ.	72
ŞEKİL 40. KONTROL, BAL, TMZ VE BAL-TMZ GRUP DOZLARI İLE 48 SAAT BOYUNCA TEDAVİ EDİLEN U-87 MG HÜCRE SERİSİ ÜZERİNDEKİ ETKİ	74
ŞEKİL 41: KONTROL, BAL, TMZ VE BAL-TMZ GRUP DOZLARIYLA MUAMELE EDİLEN U-118 MG HÜCRELERİNİN MİGRASYON GÖRÜNTÜLERİ	75
ŞEKİL 42: YARA İYİLEŞME PROTOKOLÜ İLE HÜCRE GÖÇÜNÜN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ KULLANILARAK YAPILDI. ORTALAMA $\pm$ STANDART SAPMA (N = 3) GÖSTERİLDİ.	76
ŞEKİL 43: KONTROL, BAL, TMZ VE BAL-TMZ GRUP DOZLARIYLA MUAMELE EDİLEN T98G HÜCRELERİNİN MİGRASYON GÖRÜNTÜLERİ	77
ŞEKİL 44: YARA İYİLEŞME PROTOKOLÜ İLE HÜCRE GÖÇÜNÜN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ.	78
ŞEKİL 45: KONTROL, BAL, TMZ VE BAL-TMZ GRUP DOZLARIYLA MUAMELE EDİLEN U-87 MG HÜCRELERİNİN MİGRASYON GÖRÜNTÜLERİ	79
ŞEKİL 46: YARA İYİLEŞME PROTOKOLÜ İLE HÜCRE GÖÇÜNÜN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ KULLANILARAK YAPILDI.	79
ŞEKİL 47: GBM' DE DOĞAL MADDELER TARAFINDAN MODÜLE EDİLEN ANA YOLLAR.	84

KISALTMALAR

BT Bilgisayarlı Tomografi

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

Ct Eşik eğrisi

Dk dakika

DNA Deoksiribonükleik asit

DSÖ Dünya Sağlık Örgütü

DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO Dimetil sülfoksit

EGF Epidermal büyüme faktörü

FBS Fetal Bovine Serum

GBM Glioblastoma Multiform

GFAP Glial fibriler asidik protein

IDH İzositrat DeHidrogenaz

mRNA mesajcı RNA

MSS Merkezi Sinir Sistemi

MRI Manyetik Rezonans Görüntüleme

MTT 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür

PBS Fosfat tamponlu salin

PS Periferik Sinir Sistemi

PCR Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PI3K Fosfoinositid-3 Kinaz

RNA Ribonükleik asit

Real Time PCR Gerçek Zamanlı PCR

RTK Reseptör Tirozin Kinazlar

SNX27 Nexin 27 proteini içeren hetero kompleksler

OPC Oligodendrosit Progenitor Hücre

Tm erime eğrisi

TMZ Temozolomid

TERT Telomeraz Ters Transkriptaz Enzimi

° C Santigrat

μl mikrolitre

μg mikrogram

μm mikrometre



**GLİOBLASTOMA (GBM) HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE MULTİFLORAL
BAL VE TEMOZOLOMİD-BAL KOMBİNE TEDAVİSİNİN SİTOTOKSİK,
ANTİMETASTATİK VE APOPTOTİK POTANSİYELİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı**

Balçova İzmir Türkiye, denizevrin08@gmail.com

ÖZET

Malign glioma (glioblastoma veya GBM) en yaygın ve agresif primer beyin tümörüdür. Temozolomid (TMZ), glioblastoma tedavisinde birinci basamak olarak kullanılmaktadır. Çoğu glioblastoma hastası, cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi müdahalelerine rağmen, tanıdan sonraki 1-2 yıl içinde ölmektedir.

Bal, eski çağlardan beri yiyecek ve geleneksel bir ilaç olarak kullanılmıştır. Balın tümör hücre proliferasyonu, apoptozis ve metastaz gibi kanser progresyonu ile ilişkili birçok hücresel mekanizmaları regüle ettiği rapor edilmiştir. Çalışmada; balın, TMZ ile kombine kullanımının GBM hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi ve mekanizmalarının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda insan GBM (U-118 MG, T98G, U-87 MG) hücre hatlarında, balın ve bal + TMZ'nin kombine kullanımının sitotoksik etkileri MTT analizi kullanılarak değerlendirildi. Bal, TMZ ve bal + TMZ gruplarının GBM hücrelerinin sitotoksitesinde rol alan sinyal yollarına ait gen ifadeleri seviyeleri kantitatif ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ve protein ekspresyonundaki değişiklikler Western Blot yöntemiyle araştırıldı.

Çalışmamızda, balın çeşitli mekanizmalarla hücre canlılığını azalttığını gösterdik. U-118 MG, U-87 MG ve T98G hücre hatlarının üçünde de bal+ TMZ uygulanan gruplarda doza bağımlı sitotoksik etki gözlemlendi. T98G ve U-87 MG hücre hatlarında %5 bal-TMZ dozu, %5 baldan daha sitotoksik bir etki göstererek bal ve TMZ arasında sinerjik bir etki olabileceğinin göstergesi oldu.

U-118 MG hücrelerinde Bal+TMZ uygulaması sonucunda pro-apoptotik Bax mRNA seviyesi ve protein ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış gözlemlendi. Ayrıca hayatta kalım ilişkili ve GBM de ilaç direncinde önemli rol oynayan ERK sinyal yolağı baskılandı. T98G MG hücre hattında, bal uygulanması sonucunda pro-apoptotik Bax'ın mRNA ve protein ekspresyonunda artış gözlenirken, anti-apoptotik Bcl-2 proteininin mRNA ve protein ekspresyonunun azalma olduğu tespit edildi. Aynı zamanda Bal+TMZ ve TMZ uygulanan gruplarda ise ERK sinyal yolağını baskılandı. U-87 MG hücrelerinde Bal+TMZ uygulanan kombinasyon dozu sinerjistik etki göstererek pro-apoptotik Bax'ın hem mRNA hem de protein ekspresyonunda anlamlı derecede artış sağlarken, anti-apoptotik Bcl-2' nin mRNA ve protein ifadesini sinerjistik olarak azalttı. Migrasyon deneylerinde U-118 MG, T98G ve U-87 MG hücrelerinin hepsinde IC50 Bal+TMZ dozu uygulamaları hücre göçünü anlamlı derecede inhibe etmiştir.

GBM' de tümör oluşması ve progresyonu ile ilişkili moleküler ve biyokimyasal mekanizmaları anlamak yeni potansiyel terapötiklerin gelişmesine olanak sağlaması öngörülmektedir. Sonuç olarak doğal arı balını, beyin tümörleri için umut verici bir doğal bileşik kaynağı ve diyet ürünü olarak öneriyoruz.

Anahtar kelimeler: Glioblastoma, Bal, Apoptoz, Kanser, Temozolomid

Tezin sayfa adedi: 119

Danışman: Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ

**Investigation of the cytotoxic, anti-metastatic and apoptotic potential of
Multifloral Honey and Temozolomide-Honey combined treatment on
glioblastoma (GBM) cell lines.**

**Dokuz Eylul University Health Sciences Institute, Department of Medical
Biology and Genetics**

Balcova- Izmir/ Turkey, denizevrin08@gmail.com

ABSTRACT

Malignant glioma (glioblastoma or GBM) is the most common and aggressive primary brain tumor. Temozolomide (TMZ) is used as a first-line treatment for glioblastoma. Most glioblastoma patients die within 1-2 years of diagnosis, despite surgical, radiotherapy, and chemotherapy interventions.

Honey has been used as food and a traditional medicine since ancient times. It has been reported that honey regulates many cellular mechanisms associated with cancer progression, such as tumor cell proliferation, apoptosis, and metastasis. The aim of this study was to investigate the cytotoxic effect and mechanisms of the combined use of honey with TMZ in GBM cell lines.

For this purpose, the cytotoxic effects of the combined use of honey and honey + TMZ in human GBM (U-118 MG, T98G, U-87 MG) cell lines were evaluated using MTT analysis. The gene expression levels of the signaling pathways involved in the cytotoxicity of GBM cells in honey, TMZ and honey + TMZ groups were investigated by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) and changes in protein expression by Western blot method.

In our research, we showed that honey reduces cell viability by various mechanisms. A dose-dependent cytotoxic effect was observed in the honey + TMZ applied groups in all three of the U-118 MG, U-87 MG, and T98G cell lines. In T98G and U-87 MG cell lines, a 5% honey-TMZ dose showed a more cytotoxic effect than 5% honey, indicating that there may be a synergistic effect between honey and TMZ.

A statistically insignificant increase in pro-apoptotic Bax mRNA level and protein expression was observed as a result of Bal+TMZ application in U-118 MG cells. In addition, the ERK signaling pathway, which is associated with survival and plays an important role in drug resistance in GBM, was suppressed. As a result of honey application, an increase was observed in mRNA and protein expression of pro-apoptotic Bax as a result, while mRNA and protein expression of anti-apoptotic Bcl-2 protein were decreased. At the same time, the ERK signaling pathway was suppressed in the groups treated with Honey+TMZ and TMZ. The combination dose of Bal+TMZ applied to U-87 MG cells showed a synergistic effect, significantly increasing both mRNA and protein expression of pro-apoptotic Bax while synergistically decreasing the mRNA and protein expression of anti-apoptotic Bcl-2. Migration experiments showed that Honey+TMZ dose applications in all of the U-118 MG, T98G, and U-87 MG cells significantly inhibited cell migration.

Understanding the molecular and biochemical mechanisms underlying the formation and progression of GBM tumors is anticipated to facilitate the creation of novel potential therapeutics. We conclude that natural bee honey is a promising source of natural compounds and dietary supplements for the treatment of brain tumors.

Keywords: Glioblastoma, Honey, Apoptosis, Cancer, Temozolomide

Thesis pages number: 119

Supervisor: Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ

1.GİRİŞ VE AMAC

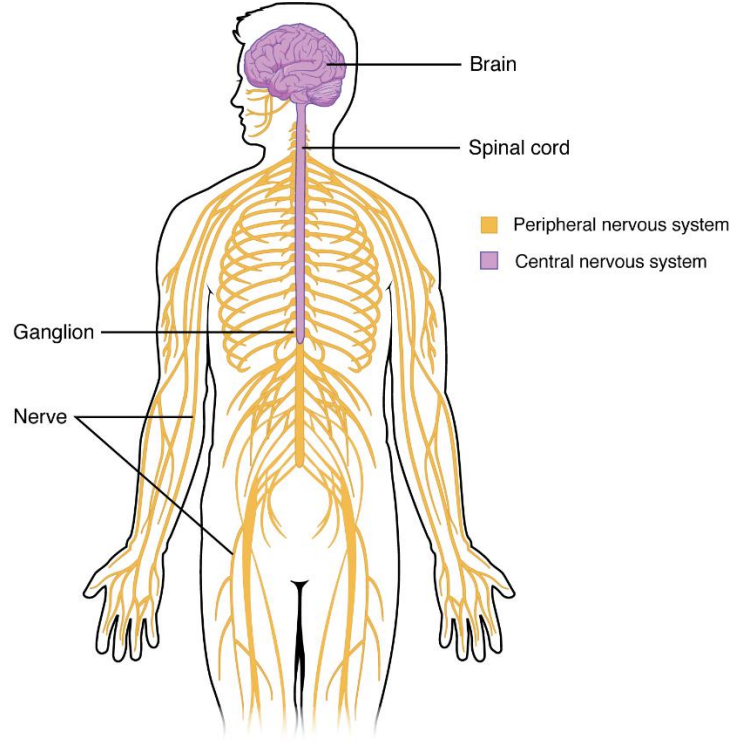
Malign glioma (glioblastoma veya GBM) en yaygın ve agresif primer beyin tümörüdür. Glioblastoma multiforme (GBM) insidansı 100.000 kişide 0.59-5 arasında değişmektedir; bununla birlikte, insidansta artış olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. En invaziv form olan glioblastomlar, en kötü prognoza sahiptir.5 Temozolomid (TMZ), glioblastoma tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve birincil tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir. Buna rağmen çoğu glioblastoma hastası, cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi müdahalelerine rağmen, tanıdan sonraki 1-2 yıl içinde ölmektedir. Birçok sinyal molekülü GBM' nin gelişmesi, ilerlemesi ve agresivitesi ile ilişkilidir.

Bal, bal arısı *Apis mellifera* tarafından toplanan ve modifiye edilen nektardan elde edilir ve eski zamanlardan beri yiyecek ve geleneksel bir ilaç olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte, son zamanlarda birçok araştırmacı, balın antioksidan, anti-proliferatif, anti-inflamatuar ve diğer özellikleri üzerinde yoğunlaşmaktadır. Çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalar balın antimikrobiyal, antiviral, anti-fungal, antikanser ve antidiyabetik aktivitesini göstermiştir. Bu çalışmada insan GBM hücre hatlarında balın proliferatif ve/veya anti-apoptotik etkisi olup olmadığı ve balın hangi moleküler sinyal yollarını indüklediği araştırılacaktır. Ek olarak balın Temozolomid' in antikanser aktivitesinin bal ile güçlendirilmesine aracılık etme potansiyeli değerlendirilecektir. Bu amaçla Multifloral balın GBM hücre hatları üzerindeki etkisini görmek için belirli konsantrasyonlarda uygulama yapıp hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri araştırılacak ve hücre göçü tayini testi gerçekleştirilecektir. Sonraki aşamada ise balın ve TMZ-Bal kombinasyonunun GBM hücre proliferasyonunda rol alan ana sinyal yollarında bulunan mediatörler ile olan etkileşimi Western Blot yöntemiyle araştırılıp, ardından relatif kantitasyon ile apoptotik ve anti-apoptotik genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Sinir Sistemi Morfolojisi

Sinir sistemi, bir organizmanın çevresiyle etkileşime girmesini sağlayan karmaşık bir ağıdır. Çevresel uyaranları algılayan duyuşal bileşenler ve iskelet, kalp ve düz kas kontrolü ile glandüler sekresyonların kontrolünü sağlayan motor bileşenler, alınan uyaranlara veya duyuşal girdilere uygun motor yanıtları sağlamak için bir sistem içinde koordine edilir (1). Sinir sistemini anatomik olarak, beyin ve omurilikten oluşan merkezi sinir sistemi (MSS) ve MSS'yi reseptörler ve efektörlere bağlayan periferik sinir sistemi (PSS) olmak üzere iki ana bölgeye ayrılmaktadır. Beyin, kafatasının kranial boşluğunda bulunur ve omurilik, vertebral kolonun vertebral kanalı içinde bulunur. Periferik sinir sistemi, periferde, yani beyin ve omuriliğın ötesinde olduğu için böyle adlandırılmıştır. PSS' nin vücudun istemli tepkilerini düzenleyen somatik sistem ve vücudun istemsiz tepkilerini düzenleyen otonom sistem olmak üzere iki ana bölümü vardır. Somatik sinir sistemi, derideki, kaslardaki ve eklemlerdeki duyuşal nöronların yanı sıra iskelet kaslarını kontrol eden motor nöron aksonlarından oluşurken, otonom sinir sistemi viseral duyumda ve düz kasların ve ekzokrin bezlerin kontrolünde yer alan nöronları ve aksonları içerir (2).

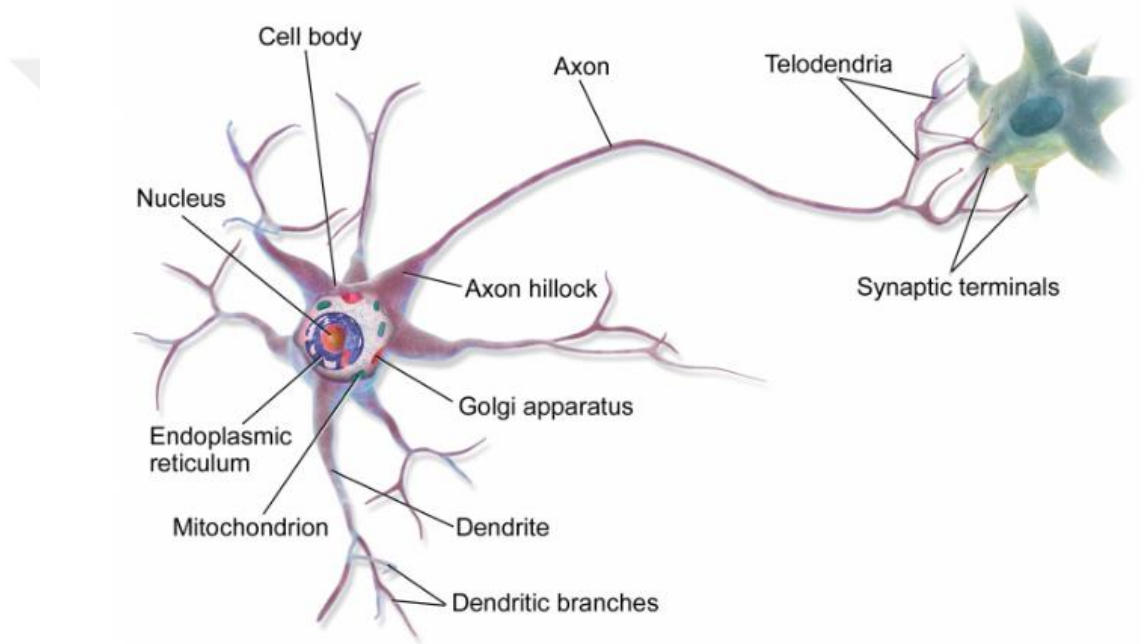


Şekil 1. Merkezi ve Periferik Sinir Sistemi: MSS beyin ve omuriliği içerirken, PSS sinirleri içerir (3).

2.1.1.Nöron

Sinir sistemi, sinir hücreleri, nöronlar ve destekleyici hücreler olan glial hücrelerden oluşur. Sinir hücreleri, sinir sistemine özgü işlevlerden sorumluyken, glial hücreler öncelikle nöronları destekleyen ve koruyan nöronal olmayan hücrelerdir. Sinir sistemi tarafından gönderilen sinyaller, sinir uyarıları adı verilen elektrik sinyalleridir ve Şekil 2' teki gibi nöronlar tarafından iletilir. Tek bir akson sinir uyarılarını diğer nöronlara veya kas hücrelerine iletirken, çoklu kısa dendritler nöronun alıcı yüzeyini genişletir.

Nöronlar, uyarılara elektrik deşarjı, sinir impulsu ve ayrıca sinir impulsunun uzun mesafelerde hızlı iletimi ile tepki verme yetenekleriyle karakterize edilir. Bu sayede sinyaller, merkezi sinir sistemi (MSS) içinde veya vücudun diğ er sistemlerindeki organlar arasında milisaniyeler içinde bir yerden baş ka bir yere iletilebilir (2).

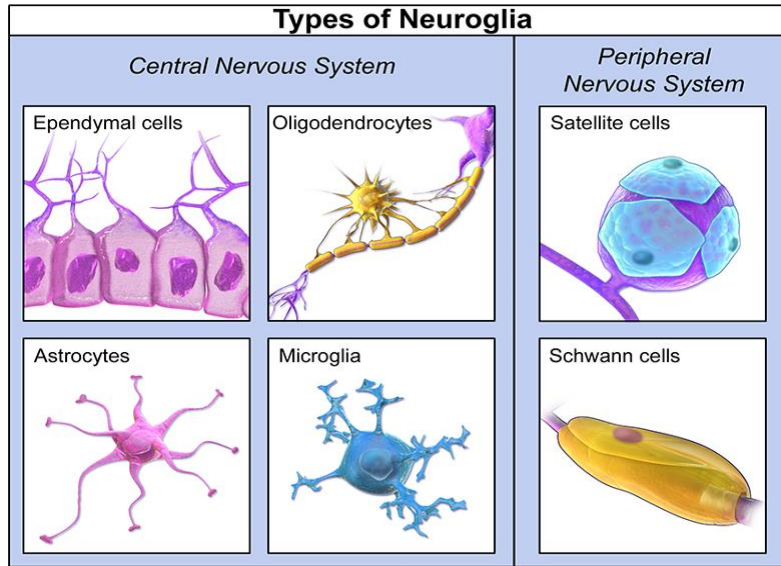


Şekil 2. Nöron Anatomisi (4).

2.1.2. Glia (Nöroglia) ve  e itleri

Rudolf Virchow 1858'de glial hücrelerin nöronları bir arada tutan bir tür yapıştırıcı görevi gördüğü fikriyle hücrelere 'Glue' (tutkal) anlamına gelen kökten 'neuroglia' adını vermiştir (5).

Glia genellikle sinir sisteminin destekleyici elemanı olarak düşünülürken, beyindeki glia hücrelerinin sayısı aslında nöronların sayısından on kat fazladır (6). Glia, aksiyon potansiyelleri üretemez, bu nedenle aksonlar, dendritler ve sinapslar dahil olmak üzere nöronlarla tanımlanan hücresel yapılardan yoksundurlar. Ancak glia, kimyasal sinyaller kullanarak birbirleriyle ve nöronlarla iletişim kurabilmektedir. Bu hücreler nörotransmitter alımı, sinyal iletimi, miyelin sentezi, nöro gelişim ve bağışıklık tepkisinde yer alan sinir sisteminin önemli bir bileşenidir (7). Genellikle altı tip glial hücre tanımlanmıştır. Dört tipi beyin ve omurilikte, ikisi periferik sinir sisteminde (PSS) bulunur. (Şekil 3)



Şekil 3. Glial Hücre Çeşitleri (8).

Astrositler ve oligodendrositler nöronlarla yakından ilişkilidir ve embriyoda nöronlarla aynı öncü hücrelerden köken almaktadır. Astrositler nöronal fonksiyonun homeostazını korurken oligodendrositler, merkezi sinir sisteminde miyelin kılıfları üreterek aksonları yalıtılmaktadır. Mikroglial hücreler, farklı bir embriyonik kök hücre soyundan köken alır ve sinir dokusunun makrofajlarıdır.

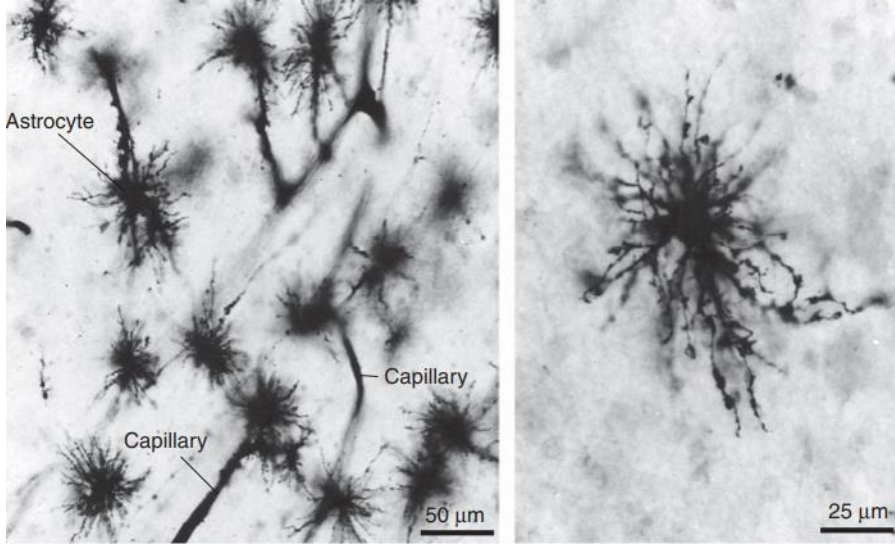
Dördüncü glial hücre tipi, ependim hücreleri, beyin ve omurilik kanalının ventriküllerinin yüzeyi boyunca radyal gliadan gelişen glial hücrelerdir. Bu hücreler beyin omurilik sıvısı (BOS) homeostazında, beyin metabolizmasında ve beyindeki atıkların temizlenmesinde kritik bir rol oynarlar. Serebral korteks içindeki glial hücrelerin %76'sı oligodendrositlerden, %17'si astrositlerden ve %7'si mikroglialardan oluşur.

PSS' nin glial hücrelerine Schwann hücreleri ve Satellit hücreleri denir. Schwann hücreleri, Oligodendrositlerin MSS' de yaptığı gibi PSS' de aynı görevi yani aksonlar ve dendritler üzerinde miyelinin yalıtkan örtüsünü sağlamaktadır. Satellit hücreleri, periferik nöronların hücre gövdelerini çevreler; işlevleri belirsizdir (6).

2.1.2.1. Merkezi Sinir Sistemindeki Glia Hücreleri

2.1.2.1.1. Astrositler

Astrosit terimi, yıldız anlamına gelen Yunanca bir kelime (astron; çoğul, astra) ile bilimsel hücre kelimesinin (Yunanca damar anlamına gelen kytos kelimesinden türetilen cyte) birleşiminden türetilmiştir (9). Astrositler MSS homeostazını korur ve kan akışını düzenleyerek nöronal sağkalımı desteklerler (10). Astrositler nöronları çevreleyen hücre dışı boşlukta uygun iyon ve nörotransmitter seviyelerini korumak için hücre dışı boşluktan hücreye iyonları ve nörotransmitterleri taşır ve aynı zamanda laktat ve glikoz vererek nöronlara fiziksel desteğin yanı sıra metabolik destek de sağlamaktadır (11).

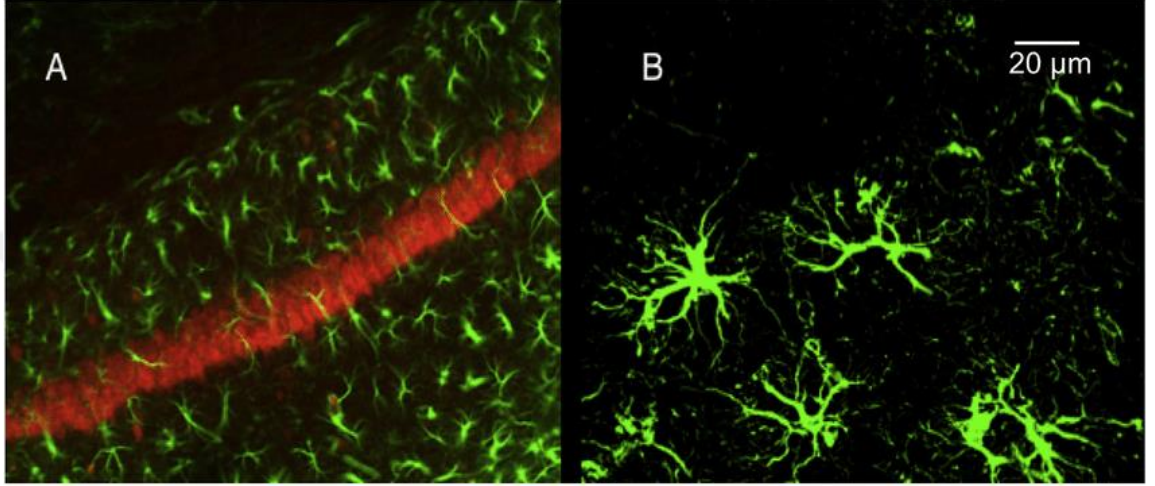


Şekil 4. Astrositler. Serebral korteksten Golgi ile boyanmış bölümlerin fotomikrografları (2).

19.yüzyılda Oberheim ve arkadaşları, ölüm sonrası insan dokularını inceleyerek insan astrositleri sınıfları, yapıları ve morfolojisi hakkında daha kapsamlı bir açıklama sağlamış ve astrositleri yıldız şeklindeki morfolojileri ve glial fibriler asidik protein (GFAP) ekspresyonu ile tanımlamışlardır (Şekil 4) (12). Yetişkin insan temporal korteksinde GFAP pozitif astrositlerin en az dört ana morfolojik alt sınıfı tanımlanmıştır ve interlaminar astrositler, protoplazmik astrositler, varikoz projeksiyonlu astrositler ve fibröz astrositler olarak sınıflandırılmıştır (13).

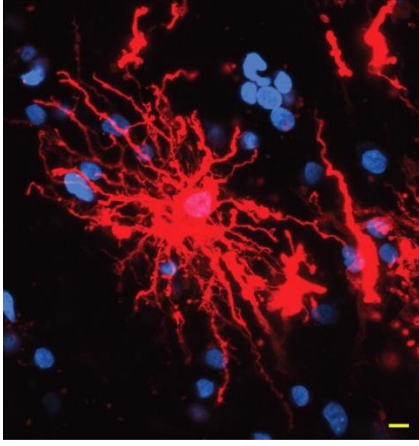
Protoplazmik antrasitler, kısa, kalın ve fazla dallı uzantıya sahiptir ve gri cevherde yaygın olarak dağılmıştır. Protoplazmik astrositlerin; iyonların, metabolitlerin ve nörotransmitterlerinin hücre dışı konsantrasyonlarını düzenlenmesi ve sinaptik fonksiyonların modülasyonu gibi önemli rolleri olduğu bildirilmiştir (14). Perivasküler ayak adı verilen uzantıları kan damarlarına uzanır ve kan beyin bariyerinin (BBB) en dış duvarı olan glial sınırlayıcı membranı oluşturmak için kan damarlarını sarar. Bu uzantılar, sinir dokusuna destek sağlamanın yanı sıra sızdırmaz bir kan-beyin bariyeri sağlamaktadır (15).

Tek bir insan protoplazmik astrositinin 270.000 ila 2 milyon sinaps kapsama alanına sahip olduğu ve bu nedenle, insan protoplazmik astrositlerinin, çok sayıda sinapstan gelen bilgileri yerel olarak entegre etme ve nöronlar arası iletişimi modüle etme potansiyeline sahip olabileceği de bildirilmiştir (16).



şekil 5. Protoplazmik astrositlerin hipokampuste (A) ve kortekste (B) glial fibriler asidik protein (GFAP) boyamasının eş odaklı konfokal görüntüleri, Hipokampuste NeuN ile boyanmış nöronal somata kırmızı ile gösterilmiştir (17).

Fibroz astrositler beyaz cevherde bulunur ve birçok düz ve uzun lif benzeri morfolojiye sahiptir. Daha büyük boyutları, daha az dallanmış ve düz morfolojileri sayesinde protoplazmik astrositlerden ayırt edilebilirler (13). Fibröz astrositlerin çoğu damar sistemiyle temas ettiğinden, metabolik destekte rolü kesin görünürken, beyaz cevherde sinapsların yokluğu göz önüne alındığında, nöronal aktiviteyi modüle etmediği düşünölmektedir (16).



Şekil 6. Hücrenin tam yapısını ortaya çıkaran DiI ile etiketlenmiş insan fibröz astrosit. (13).

İnterlaminar astrositler ilk olarak Andriezen ve Retzius tarafından üst kortikal katmanlarda bulunan ve kortikal katmanlar boyunca uzun glial hücreler olarak tanımlanmıştır (18). Down sendromu ve Alzheimer hastalığı da dahil olmak üzere çok katmanlı nöron kaybıyla ilişkili çeşitli hastalık durumlarında interlaminar fiberlerde ilerleyici bir kayıp bildirilmiştir (19).

Varikoz projeksiyonlu astrositleri, tipik protoplazmik astrositlerin gösterdiğinden daha kısa, daha dikenli morfolojileriyle karakterize edilmiştir. İnsanlara ve yüksek dereceli primatlara özgü olarak, V-VI tabakalarda seyrek olarak bulunurlar. Uzun yapıları her yöne yayılır, komşu astrositlerin etki alanlarını geçerek sıklıkla kan damarlarıyla temas etmektedirler (13) Varikoz projeksiyonlu astrositlerin interlaminar astrositlerle kombinasyon halinde serebral kortekste uzun mesafeli iletişimi düzenlediği öne sürülmüştür (20).

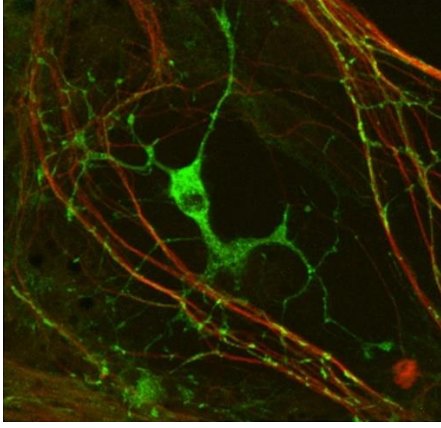
Astrosit disfonksiyonu, Multipl Skleroz, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı ve beyin tümörleri dahil olmak üzere çok sayıda hastalıkta bulunur (21). Glioblastoma multiforme (GBM), astrositik tümörlerin en sık görülen malign tipidir (22).

2.1.2.1.2.Oligodendrositler

Merkezi sinir sisteminin (MSS) miyelin oluşturan hücreleri olan oligodendrositler, embriyonik nöral tüpün ventriküler germinal bölgelerinden ortaya çıkan oligodendrosit progenitör hücrelerden (OPC) gelişir. OPC' ler çoğalır ve miyelin oluşturan oligodendrositlere farklılaşmadan önce bu bölgelerden gelişmekte olan gri ve beyaz cevhere göç ederler (23).

Oligodendrositler beyaz cevherdeki baskın hücre tipidir ve genellikle nöronal süreç grupları arasında hücre grupları halinde bulunurlar. Bunlar interfaziküler oligodendrosit olarak adlandırılır ve yakındaki nöronal süreçleri çevreleyen miyelinin oluşumunda ve korunmasında rol oynar (24). Gri maddede, oligodendrositler genellikle nöronların yakınında bulunur ve bu nedenle perinöronal satellit hücreleri olarak bilinir. Satellit oligodendrosit aksonları yalıtmaz, bunun yerine nöronların yakınında bulunur ve hücre dışı sıvıyı düzenleme işlevi görür (25).

Yetişkin MSS' de tüm aksonlar miyelinli değildir; bununla birlikte miyelinasyon, MSS' nin normal çalışması için kritik öneme sahiptir. Lokalize miyelin kaybıyla sonuçlanan hastalıklar veya yaralanmalar, fonksiyonel eksikliklere yol açarken, gelişim sırasında MSS miyelininin sistemik kaybı nihayetinde ölümcüldür (26). Oligodendrositler ayrıca histolojik çalışmalara, gen ekspresyonunun analizi ve nöro görüntüleme ile akıl hastalığı teşhisine de dahil edilir. Şizofreni ve kronik depresyonu olan kişilerin beyin dokularında bazı genler anormal derecede düşük seviyelerde ifade edilir ve bir dizi gen varyantı bu akıl hastalıkları için risk faktörleri olarak tanımlanmıştır. Bunların çoğu, oligodendrositlerde eksprese edilen veya oligodendrosit gelişiminin kontrolünde rol oynayan genlerdir. MRG beyin görüntüleme, miyelinli aksonların serebral korteksin farklı bölgelerini birbirine bağlayan büyük demetler oluşturduğu beyin bölgeleri olan beyaz cevher yollarının hacminin veya yapısının, şizofreni ve depresyonda yer aldığı bilinen kortikal bölgelerde azaldığını göstermektedir (6).



Şekil 7. Miyelinizasyon (27).

2.1.2.1.3. Mikroglialar

Mikroglia, beyin mikroçevresinde yerleşik makrofajlar olmak için merkezi sinir sistemine göç eden mezodermal/mezenkimal kökenli hücrelerdir (28). Mikroglia beyin makrofajları olarak görev yapar. Mikropların, ölü hücrelerin, gereksiz sinapsların, protein kümelerinin ve MSS'yi tehlikeye atabilecek diğer partikül ve çözünür antijenlerin ortadan kaldırılmasından sorumludurlar. Ayrıca, proinflamatuvar sitokinlerin birincil kaynağı olarak mikroglia, nöroinflamasyonun temel araçlarıdır ve geniş bir hücresel yanıt spektrumunu indükleyebilir veya modüle edebilir (29).

Aktif bir bağışıklık tepkisinin enflamatuvar koşulları altında, mikroglia ayrıca MSS' deki potansiyel hasarı hafifletmekte ve doku onarımını desteklemektedir (30). Neredeyse tüm beyin patolojilerinde düzensiz mikrogliyal aktivasyon ve mikroglia kaynaklı inflamasyon gözlenmekte olup; ortaya çıkan kanıtlar, mikroglia 'nın nöronlar üzerinde doğrudan etkiler yaparak hastalığın ilerlemesine katkıda bulunduğunu göstermektedir (31).

2.1.2.1.4.Ependim Hücreleri

Ependimal hücreler, ependim adı verilen, beynin ventriküler sistemini ve omuriliğin merkezi kanalını kaplayan epitelyal bir bariyer oluşturan siliyer glial hücrelerdir.

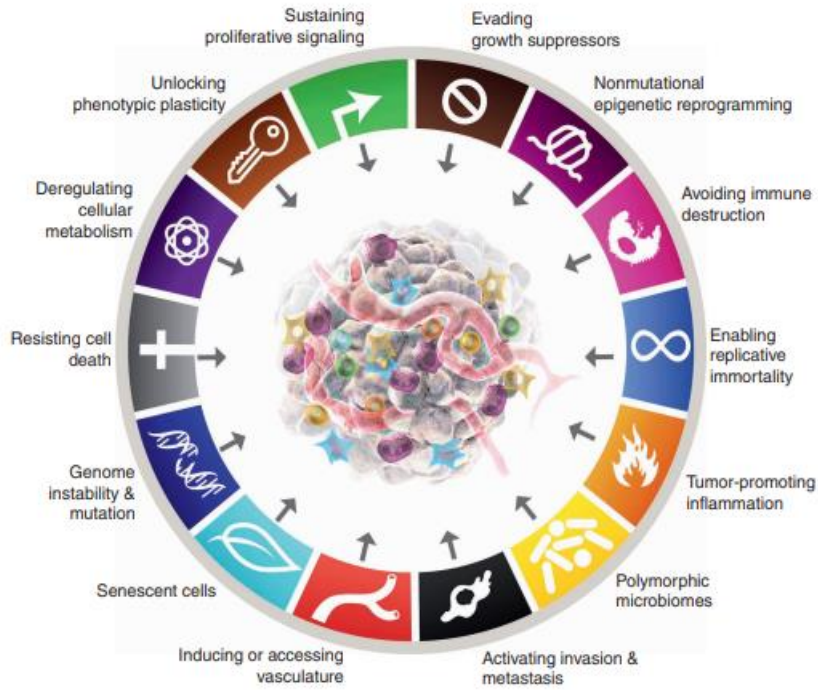
Bu hücreler nöral tüpün lümenini kaplayan erken germinal epitelden köken alır ve dolayısıyla ektodermal türevlidir. Doğum sonrası ilk günlerden başlayarak beyin ve omurilik kanalının ventriküllerinin yüzeyi boyunca radyal gliadan gelişirler, böylece yaşam boyunca parankim ve beyin omurilik sıvısı (BOS) dolu boşluklar arasında bir arayüz sağlarlar. Bu arayüz, ependimal hücrelerin, bağışıklık hücrelerinin ve çözünen maddelerin BOS ve interstisyel sıvı arasındaki çift yönlü geçişini kontrol etmesini sağlamaktadır (32).

Ventrikülde anormal BOS toplanması hidrosefaliye neden olur. Ependim hücre disfonksiyonu BOS dolaşımını engelleyebilir ve BOS üretimi ile absorpsiyon arasında bir tutarsızlığa neden olabilir. Bu nedenle ependim hücrelerinin farklılaşmalarındaki anormallikler veya fonksiyon eksikliği hidrosefaliye yol açabilmektedir (33). 2016 yılında Wang ve arkadaşları SNX27 delesyonu ile ependimal hücre tabakası oluşumundaki kusurların, nöral progenitör hücre farklılaşmasının, terminal ependim hücre tiplerine ciddi şekilde bozulmasına bunun da patolojik ventrikül disfonksiyonu ve hidrosefaliye yol açtığını bildirmişlerdir (34).

2.2.Kanser Tanımı ve Özellikleri

Kanser, vücuttaki hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve gelişmesidir. İnsan vücudunun etkilenen doku veya organına göre kategorize edilen 100'den fazla farklı kanser türü vardır. Her yıl dünya çapında 12 milyondan fazla kişiye kanser teşhisi konmaktadır ve 7 milyondan fazla insan kanserden ölmektedir. Bu değer her yıl dünyadaki tüm nedenlere bağlı toplam 56 milyon ölümün %13'üne tekabül etmektedir. Bu nedenle dünya çapında en yaygın on kanser de önde gelen ölüm nedenleri arasındadır (35). Kanser tedavileri cerrahi, kemoterapi ve radyasyon tedavisinin yanı sıra girişimsel radyoloji ve immünoterapi gibi daha yeni tekniklerle gerçekleştirilmektedir. Şimdiye kadar kanser tedavilerindeki gelişmelere rağmen, kansere bağlı genel ölüm oranları nispeten sabit kalmıştır (36).

Kanserin temel özellikleri, insan hücreleri tarafından normallikten neoplastik büyüme durumlarına giderken kazanılan bir dizi işlevsel yetenek, daha spesifik olarak, kötü huylu tümörler oluşturma yetenekleri için gerekli olan yetenekler olarak belirlenmiştir. Kendi kendine yeten büyüme sinyalleri, büyüme karşıtı sinyallere karşı direnç, hücre ölümüne karşı direnç, replikatif ölümsüzlük, sürdürülebilir anjiyogenez, invazyon ve metastaz, hücresel metabolizmayı yeniden düzenleme ve immün yıkımdan kaçış kanserin temel özelliklerindendir (37). Son çalışmalar ile kanserin 8 temel özelliğine, genomik kararsızlık ve mutasyon, tümör teşvik eden inflamasyon, fenotipik plastisite ve bozulmuş farklılaşma, mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama, polimorfik mikrobiyomlar ve senesens temel özellikleri eklenmiş ve artık kanserin bildiğimiz 14 temel özelliği vardır (38).



Şekil 8. Kanser Temel Özellikleri (38).

2.2.1.Beyin Tümörleri

“Beyin tümörleri” terimi, iyi huyludan agresife kadar değişen derecelerde malignite derecesine sahip intrakraniyal (beyin içi) dokulardan ve meninkslerden (beyin zarları) kaynaklanan karışık bir neoplazma grubunu ifade eder (39). Beyin tümörleri primer beyin tümörü ve metastatik (sekonder) beyin tümörü olmak üzere iki gruba sınıflandırılır. Primer beyin tümörleri, yüksek morbidite ve mortalite oranları ile ilişkili heterojen bir neoplazma grubudur. Bu tümör grubu iyi huylu veya kötü huylu olarak sınıflandırılır ve merkezi sinir sistemi dışına metastaz yapmazlar (40). Metastatik beyin tümörleri, diğer vücut organlarında bulunan kanser veya sarkom gibi primer bir neoplazmdan beyne yayılan kötü huylu lezyonlardır. Beyin metastazları nörolojik fonksiyonun bozulmasına neden olma eğilimindedir ve hastaların yaşam kalitesini olumsuz etkiler (41).

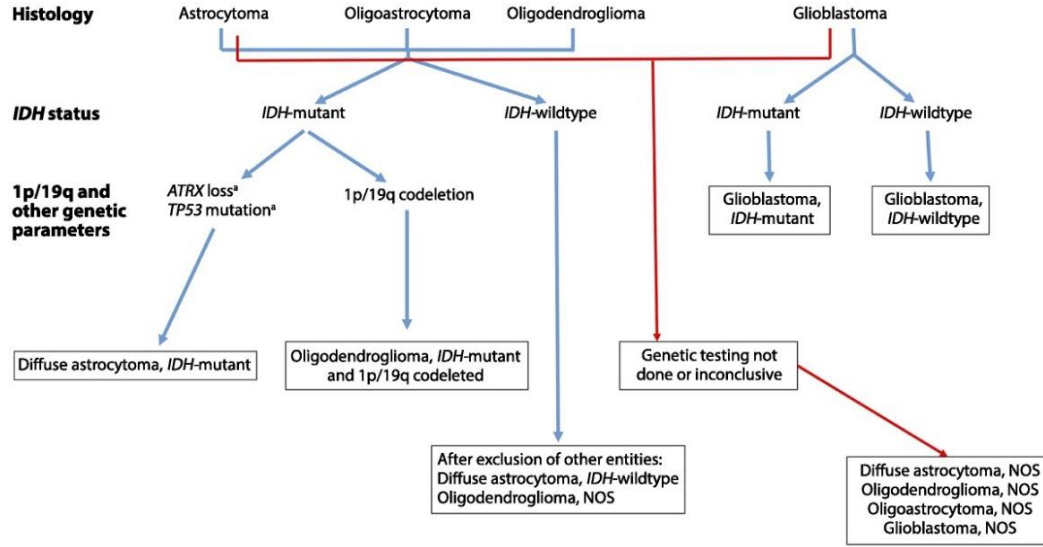
Merkezi sinir sistemi tümörleri sınıflandırması Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 2016 yılında revize edilerek moleküler özellikler histolojik derecelendirme ile birleştirilmiştir (42).

2.2.1.1.Beyin Kanserlerinin Sınıflandırılması

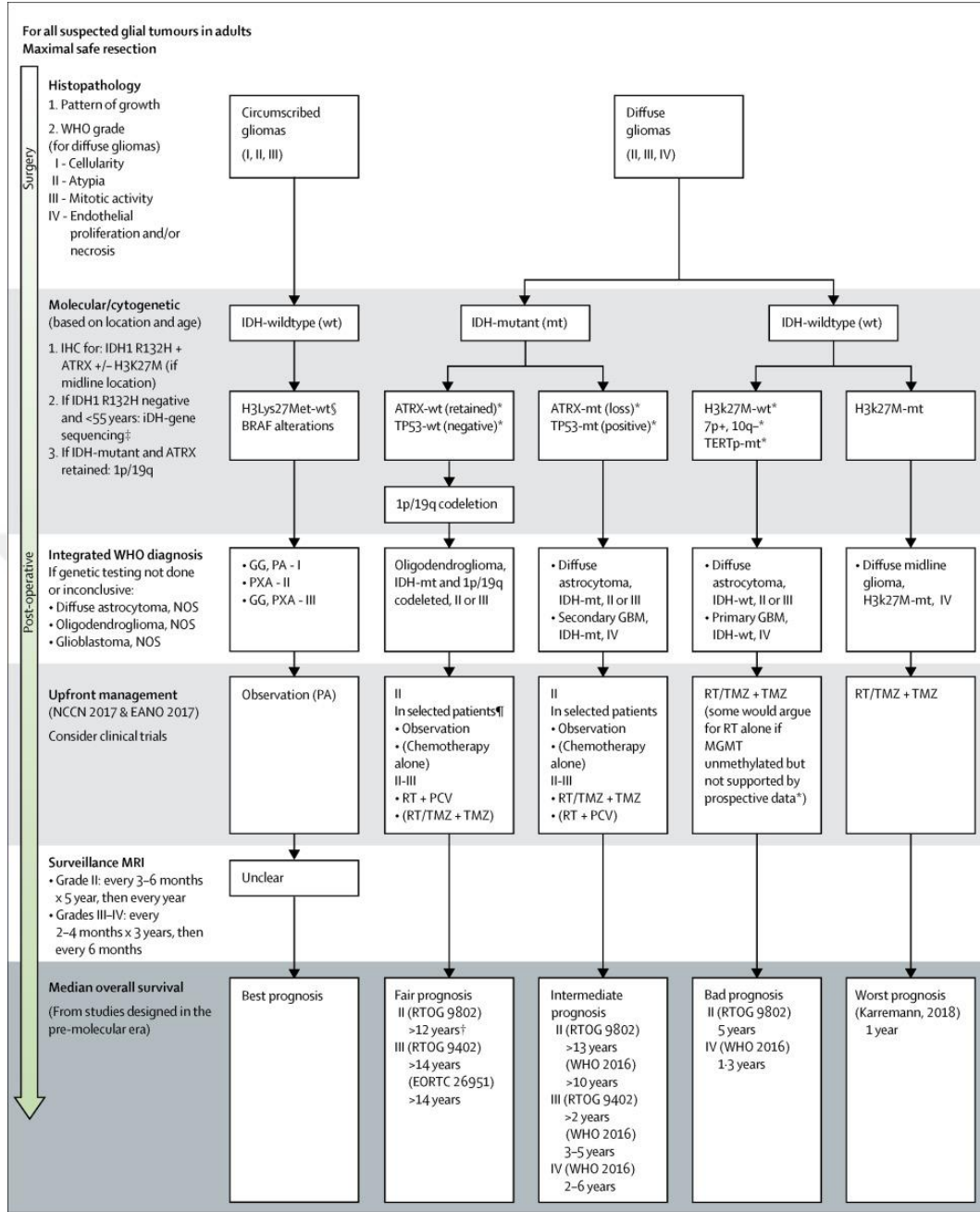
Gliomlar, Dünya Sağlık Örgütü tarafından oluşturulan histopatolojik ve klinik kriterlere göre derece I' den IV'e sınıflandırılmıştır. Moleküler biyolojideki son gelişmeler, glioma patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlamış ve klinik olarak önemli birkaç genetik değişiklik tanımlanmıştır. Bunların bir kısmı (*IDH*, 1p/19q kodlaması, H3 Lys27Met ve *RELA*-füzyonu) yenilenen 2016 DÖS MSS tümörleri sınıflandırmasında histoloji ile birleştirilmiştir. 2016 DSÖ güncellemesinden önce tüm astrositik tümörler birlikte gruplandırılmıştı. 2016 itibarıyla, gliomlar büyüme paternlerine ve *IDH* (İzositrat dehidrojenaz) mutasyonunun varlığına veya yokluğuna bağlı olarak sınırlı gliomalar ve diffüz gliomalar olarak ayrılmıştır (43).

Sınırlı gliomlar, çoğunlukla iyi huylu olarak kabul edilen ve tam rezeksiyonla tedavi edilebilen tümörleri temsil eder. Sınırlı gliomlarda *IDH* mutasyonu yoktur ancak sık *BRAF* mutasyonları ve füzyonları vardır (örn., pilositik astrositom ve pleomorfik ksantoastrositom) (44).

Tersine, diffüz gliomlar neredeyse hiçbir zaman tek başına rezeksiyonla tedavi edilemez. Diffüz gliomlar histopatolojik kriterler kullanılarak derecelendirilir ve şimdi tanısal moleküler belirteçlere göre sınıflandırılmaktadır. Histopatolojik analize dayanarak diffüz gliomalar, yaygın astrositomlar (en yaygın ve en agresif temsilcisi olarak glioblastoma), oligodendrogliomlar veya karışık astrositik ve oligodendrogliyal fenotipli tümörler (oligoastrositomlar) olarak tanımlanır. Histolojik olarak, derece II (düşük dereceli) yaygın astrositomlar nükleer atipi gösterir, derece III (anaplastik) artmış mitotik aktivite gösterir ve derece IV (glioblastomlar) ek mikrovasküler proliferasyon, nekroz veya her ikisini göstermektedir. 2016 yılında, II-III. derece gliomlar, *IDH*, *ATRX*, *1p/19* durum ve esaslarına göre üç tanısal ve prognostik alt gruba ayrılır. Derece II-III gliomaların çoğu, *IDH*'de önemli bir driver mutasyon barındırmaktadır. Karakteristik TP53 ve *ATRX* mutasyonlarına sahip gliomalara yaygın astrositom, *IDH* -mutantı denir. *IDH1* mutasyonu barındıran ancak *ATRX* mutasyonu olmayan derece II-III gliomlarda, astrositomları oligodendrogliomlardan ayırt etmek için 1p/19q kodlama durumu değerlendirmesi gereklidir (Şekil:8) (43).



Şekil 9. Histolojik ve genetik özelliklere dayalı olarak yaygın gliomaların sınıflandırılması için basitleştirilmiş bir algoritma (44).



Şekil 10. Gliomalar için basitleştirilmiş tanısal karar ağacı (43).

WHO classification of tumours of the central nervous system

Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours		Neuronal and mixed neuronal-glial tumours	
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	9400/3	Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	9413/0
Gemistocytic astrocytoma, IDH-mutant	9411/3	Gangliocytoma	9492/0
<i>Diffuse astrocytoma, IDH-wildtype</i>	<i>9400/3</i>	Ganglioglioma	9505/1
Diffuse astrocytoma, NOS	9400/3	Anaplastic ganglioglioma	9505/3
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	9401/3	Dysplastic cerebellar gangliocytoma (Lhermitte-Duclos disease)	9493/0
<i>Anaplastic astrocytoma, IDH-wildtype</i>	<i>9401/3</i>	Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	9412/1
Anaplastic astrocytoma, NOS	9401/3	Papillary glioneuronal tumour	9509/1
Glioblastoma, IDH-wildtype	9440/3	Rosette-forming glioneuronal tumour	9509/1
Giant cell glioblastoma	9441/3	<i>Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumour</i>	
Gliosarcoma	9442/3	Central neurocytoma	9506/1
<i>Epithelioid glioblastoma</i>	<i>9440/3</i>	Extraventricular neurocytoma	9506/1
Glioblastoma, IDH-mutant	9445/3*	Cerebellar liponeurocytoma	9506/1
Glioblastoma, NOS	9440/3	Paraganglioma	8693/1
Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	9385/3*	Tumours of the pineal region	
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9450/3	Pineocytoma	9361/1
Oligodendroglioma, NOS	9450/3	Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	9362/3
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9451/3	Pineoblastoma	9362/3
<i>Anaplastic oligodendroglioma, NOS</i>	<i>9451/3</i>	Papillary tumour of the pineal region	9395/3
<i>Oligoastrocytoma, NOS</i>	<i>9382/3</i>	Embryonal tumours	
<i>Anaplastic oligoastrocytoma, NOS</i>	<i>9382/3</i>	Medulloblastomas, genetically defined	
Other astrocytic tumours		Medulloblastoma, WNT-activated	9475/3*
Pilocytic astrocytoma	9421/1	Medulloblastoma, SHH-activated and TP53-mutant	9476/3*
Piloxyoid astrocytoma	9425/3	Medulloblastoma, SHH-activated and TP53-wildtype	9471/3
Subependymal giant cell astrocytoma	9384/1	Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH	9477/3*
Pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3	<i>Medulloblastoma, group 3</i>	
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3	<i>Medulloblastoma, group 4</i>	
Ependymal tumours		Medulloblastomas, histologically defined	
Subependymoma	9383/1	Medulloblastoma, classic	9470/3
Myxopapillary ependymoma	9394/1	Medulloblastoma, desmoplastic/nodular	9471/3
Ependymoma	9391/3	Medulloblastoma with extensive nodularity	9471/3
Papillary ependymoma	9393/3	Medulloblastoma, large cell / anaplastic	9474/3
Clear cell ependymoma	9391/3	Medulloblastoma, NOS	9470/3
Tanycytic ependymoma	9391/3	Embryonal tumour with multilayered rosettes, C19MC-altered	9478/3*
Ependymoma, <i>RELA</i> fusion-positive	9396/3*	<i>Embryonal tumour with multilayered rosettes, NOS</i>	<i>9478/3</i>
Anaplastic ependymoma	9392/3	Medulloepithelioma	9501/3
Other gliomas		CNS neuroblastoma	9500/3
Chordoid glioma of the third ventricle	9444/1	CNS ganglioneuroblastoma	9490/3
Angiocentric glioma	9431/1	CNS embryonal tumour, NOS	9473/3
Astroblastoma	9430/3	Atypical teratoid/rhabdoid tumour	9508/3
Choroid plexus tumours		<i>CNS embryonal tumour with rhabdoid features</i>	<i>9508/3</i>
Choroid plexus papilloma	9390/0	Tumours of the cranial and paraspinal nerves	
Atypical choroid plexus papilloma	9390/1	Schwannoma	9560/0
Choroid plexus carcinoma	9390/3	Cellular schwannoma	9560/0
		Plexiform schwannoma	9560/0

Şekil 11. Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin 2016 Dünya Sağlık Örgütü Sınıflandırması (45).

Melanotic schwannoma	9560/1	Osteochondroma	9210/0
Neurofibroma	9540/0	Osteosarcoma	9180/3
Atypical neurofibroma	9540/0		
Plexiform neurofibroma	9550/0	Melanocytic tumours	
Perineurioma	9571/0	Meningeal melanocytosis	8728/0
Hybrid nerve sheath tumours		Meningeal melanocytoma	8728/1
Malignant peripheral nerve sheath tumour	9540/3	Meningeal melanoma	8720/3
Epithelioid MPNST	9540/3	Meningeal melanomatosis	8728/3
MPNST with perineurial differentiation	9540/3		
Meningiomas		Lymphomas	
Meningioma	9530/0	Diffuse large B-cell lymphoma of the CNS	9680/3
Meningothelial meningioma	9531/0	Immunodeficiency-associated CNS lymphomas	
Fibrous meningioma	9532/0	AIDS-related diffuse large B-cell lymphoma	
Transitional meningioma	9537/0	EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma, NOS	
Psammomatous meningioma	9533/0	Lymphomatoid granulomatosis	9766/1
Angiomatous meningioma	9534/0	Intravascular large B-cell lymphoma	9712/3
Microcystic meningioma	9530/0	Low-grade B-cell lymphomas of the CNS	
Secretory meningioma	9530/0	T-cell and NK/T-cell lymphomas of the CNS	
Lymphoplasmacyte-rich meningioma	9530/0	Anaplastic large cell lymphoma, ALK-positive	9714/3
Metaplastic meningioma	9530/0	Anaplastic large cell lymphoma, ALK-negative	9702/3
Chordoid meningioma	9538/1	MALT lymphoma of the dura	9699/3
Clear cell meningioma	9538/1		
Atypical meningioma	9539/1	Histiocytic tumours	
Papillary meningioma	9538/3	Langerhans cell histiocytosis	9751/3
Rhabdoid meningioma	9538/3	Erdheim-Chester disease	9750/1
Anaplastic (malignant) meningioma	9530/3	Rosai-Dorfman disease	
		Juvenile xanthogranuloma	
		Histiocytic sarcoma	9755/3
Mesenchymal, non-meningothelial tumours		Germ cell tumours	
Solitary fibrous tumour / haemangiopericytoma**		Germinoma	9064/3
Grade 1	8815/0	Embryonal carcinoma	9070/3
Grade 2	8815/1	Yolk sac tumour	9071/3
Grade 3	8815/3	Choriocarcinoma	9100/3
Haemangioblastoma	9161/1	Teratoma	9080/1
Haemangioma	9120/0	Mature teratoma	9080/0
Epithelioid haemangioendothelioma	9133/3	Immature teratoma	9080/3
Angiosarcoma	9120/3	Teratoma with malignant transformation	9084/3
Kaposi sarcoma	9140/3	Mixed germ cell tumour	9085/3
Ewing sarcoma / PNET	9364/3		
Lipoma	8850/0	Tumours of the sellar region	
Angiolipoma	8861/0	Craniopharyngioma	9350/1
Hibernoma	8880/0	Adamantinomatous craniopharyngioma	9351/1
Liposarcoma	8850/3	Papillary craniopharyngioma	9352/1
Desmoid-type fibromatosis	8821/1	Granular cell tumour of the sellar region	9582/0
Myofibroblastoma	8825/0	Pituicytoma	9432/1
Inflammatory myofibroblastic tumour	8825/1	Spindle cell oncocytoma	8290/0
Benign fibrous histiocytoma	8830/0		
Fibrosarcoma	8810/3	Metastatic tumours	
Undifferentiated pleomorphic sarcoma / malignant fibrous histiocytoma	8802/3		
Leiomyoma	8890/0		
Leiomyosarcoma	8890/3		
Rhabdomyoma	8900/0		
Rhabdomyosarcoma	8900/3		
Chondroma	9220/0		
Chondrosarcoma	9220/3		
Osteoma	9180/0		

The morphology codes are from the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) [742A]. Behaviour is coded /0 for benign tumours; /1 for unspecified, borderline, or uncertain behaviour; /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia; and /3 for malignant tumours. The classification is modified from the previous WHO classification, taking into account changes in our understanding of these lesions.

*These new codes were approved by the IARC/WHO Committee for ICD-O. /Italics: Provisional tumour entities. **Grading according to the 2013 WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone.

Şekil 12. Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin 2016 Dünya Sağlık Örgütü Sınıflandırması devamı (45).

2.2.1.2.Glioblastoma Multiforme

Malign glioma (glioblastoma veya GBM) en yaygın ve agresif primer beyin tümörüdür. Glioblastoma multiforme (GBM) insidansı 100.000 kişide 0.59-5 arasında değişmektedir; bununla birlikte, insidanda artış olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (46,47). GBM esas olarak daha ileri yaşlarda teşhis edilir ve medyan tanı yaşı 64'tür. 0 ila 19 yaşları arasında bildirilen tüm beyin ve MSS tümörlerinin sadece yaklaşık %3'ünü oluşturan bu kanser türü çocuklarda nadirdir. İnsidans, artan yaşla birlikte artmaya devam etmektedir, insidans 75 ila 84 yaşlarında zirve yapar ve 85 yaşından sonra düşmektedir (48). Hastalar genellikle tanıdan 12 ila 18 ay sonra hastalığa yenik düşer. Şu anda, güvenli rezeksiyon artı adjuvan kemo radyoterapi uygulanan hastalarda sunulabilecek en iyi genel medyan sağkalımı 14 aydır. Sağkalıma dahil olan prognostik faktörler arasında yaş, belirteçler (MGMT metilasyonu, IDH1, IDH2 veya TERT mutasyonu, 1p19q kodlaması, EGFR' nin aşırı ekspresyonu vb.) ve muhtemelen rezeksiyonun boyutu yer almaktadır (49).

Gliomaların isimlendirilmesi ve teşhisi için uluslararası standart, GBM'nin 4. derece kanser olduğu Dünya Sağlık Örgütü sınıflandırmasıdır. 2016'dan itibaren gliomaların DSÖ sınıflandırması, bu neoplazmanın dört tipinin ayırt edildiği histopatolojik kriterler tarafından belirlenen malignite derecesine dayanmaktadır (45).

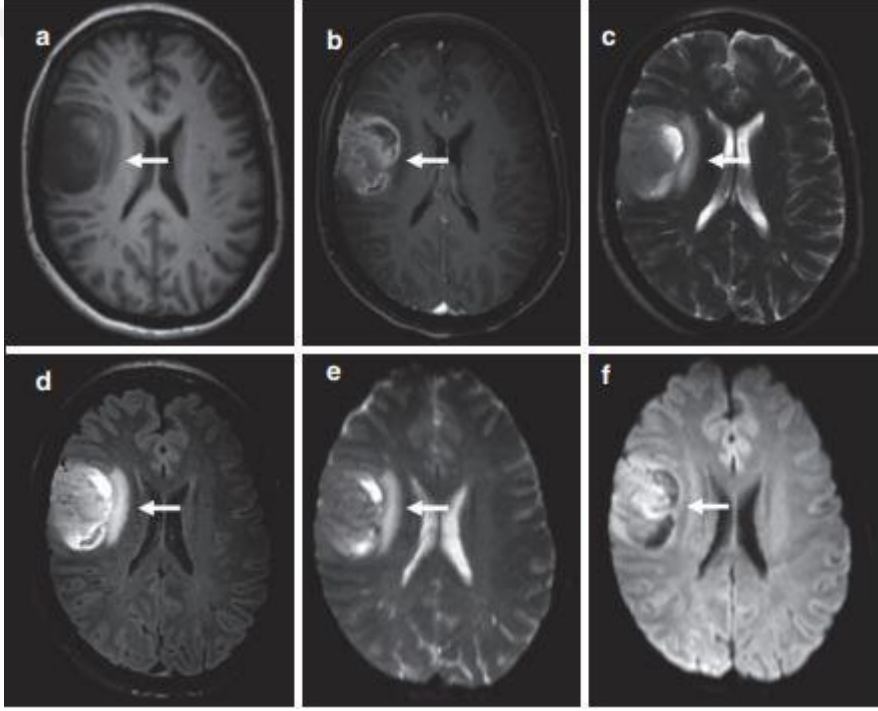
Glioblastoma, izositrat dehidrojenaz *IDH* vahşi tip (vakaların %90'ı), yaklaşık 60 yaşında de novo olarak gelişmektedir. Glioblastoma, *IDH* mutantı (vakaların %10'u), genellikle daha yüksek farklılaşma gösteren gliomaları olan genç hastalarda gelişen sekonder GBM (DSÖ derece I-III) olarak adlandırılır ve vahşi tip *IDH*'den önemli ölçüde daha iyi bir prognoz taşır. Glioblastoma aksi belirtilmedikçe (Not Otherwise Specified), test için histolojik veya moleküler tanı eksikliği nedeniyle IDH mutasyon durumu belirlenemeyen gruptur. Başka yerde sınıflandırılmamış (Not Elsewhere Classified) Glioblastoma, son yıllarda ayırt edilen dördüncü kategoridedir ve tümörün sınıflandırılması ile ilgili gerekli tespitler yapılmıştır, ancak sonuçlar, tümörün 2016 DSÖ bölümünün kategorilerinin herhangi biriyle eşleşmemektedir.

Bu durum, tümörün klinik, histolojik, immünohistolojik ve genetik özellikleri arasında uyumsuzluk olması durumunda ortaya çıkabilir. Henüz DSÖ bölümünde sınıflandırılmamış, bilinmeyen bir özellik kombinasyonuna sahip bir GBM alt biriminin var olma olasılığı da vardır (50).

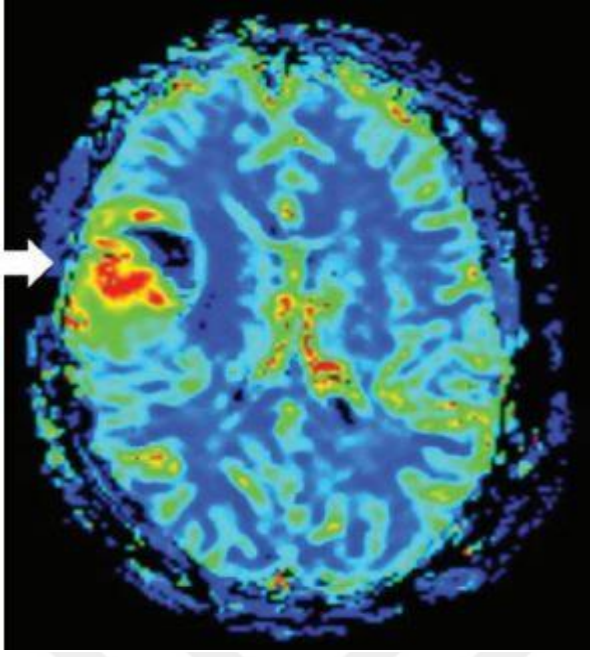
Gliomaların 2016 sınıflandırmasının sadece tümörün histolojik sınıflandırmasını değil, aynı zamanda hücrelerdeki moleküler değişiklikleri de hesaba katılmıştır. Glioblastomaların sınıflandırılmasında kilit rol oynayan İzositrat dehidrojenaz 1 (*IDH1*) ve İzositrat dehidrojenaz 2 (*IDH2*) enzimleridir. *IDH1* ve *IDH2*'nin mutasyonu, enzim izositrat dehidrojenazın standart substrat olan izositrat için afinitesini azaltır ve alfa-ketoglutarata karşı afinitesini artırır. Bu durum a-ketoglutarat bağımlı dioksijenazların hücre farklılaşmasının inhibisyonunda rol oynayan oncometabolit 2-hidroksiglutarat'a dönüştürülmesiyle sonuçlanır. Böylelikle dioksijenaz fonksiyonlarının bloke edilmesi (DNA ve histon demetilasyonunu) tetiklenir ve hipoksi ile indüklenebilir faktör 1'in (HIF-1) aktivasyonuna yol açar. Artık bu epigenetik değişikliklerin esas olarak düşük dereceli gliomların oluşumunda rol oynadığı kabul edilmektedir (51).

GBM' nin etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Gösterilen en tutarlı ilişkiler, kafaya iyonize radyasyon maruziyetinden sonra artan risk ve alerji veya atopik hastalık öyküsü ile azalan risktir (52). Sigara içimi, alkol tüketimi, uyuşturucu kullanımı veya azotlu bileşiklere diyetle maruz kalma gibi yaşam tarzı özellikleri ile GBM ilişkisine dair önemli bir kanıt yoktur (53). Üç büyük prospektif kohortu bir araya getiren bir araştırma, herhangi bir gıda grubu, besin maddesi veya diyet düzeninin tüketimi ile glioma riski arasında bir ilişki göstermemiştir (54). Kahve ve çay alımı birkaç kanser riskinin azalması ile ilişkilendirilmiştir, ancak glioma risk ilişkileri ile ilgili olarak incelendiğinde büyük ölçüde geçersiz olmuştur (55).

Glioblastomlu hastanın yeni başlayan nörolojik defisit, nöbetler veya artmış kafa içi basıncının klinik belirtilerini takiben ilk olarak acil servise kabul edilmesi yaygındır. Bu nedenle, bu semptomları araştırmak için genellikle ilk radyolojik görüntüleme kontrastlı veya kontrastsız bir bilgisayarlı tomografisidir (BT). BT'yi takiben veya hasta ilk olarak ayaktan konsültasyonda değerlendirilmişse standart bakım olarak gadolinyumla güçlendirilmiş manyetik rezonans görüntüleme (MRI) istenir. Tümör tipi ve derecesini belirlemek için görüntüleme tekniklerinden sonra biyopsi, moleküler ve histopatolojik tanıları koymak için gerekli bir prosedürdür (56).



Şekil 13. Glioblastomun manyetik rezonans görüntülemesi (beyaz ok). Farklı dizilerde eksenel rekonstrüksiyon. (a) T1 ağırlıklı manyetik rezonans görüntüleme (b) T1 ağırlıklı gadolinyum ile güçlendirilmiş MRG (c) T2 ağırlıklı dizi. (d) FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery) görüntüleme (e) DWI (Diffusion-weighted imaging) görüntüleme (f) Iso DWI görüntüleme (52).



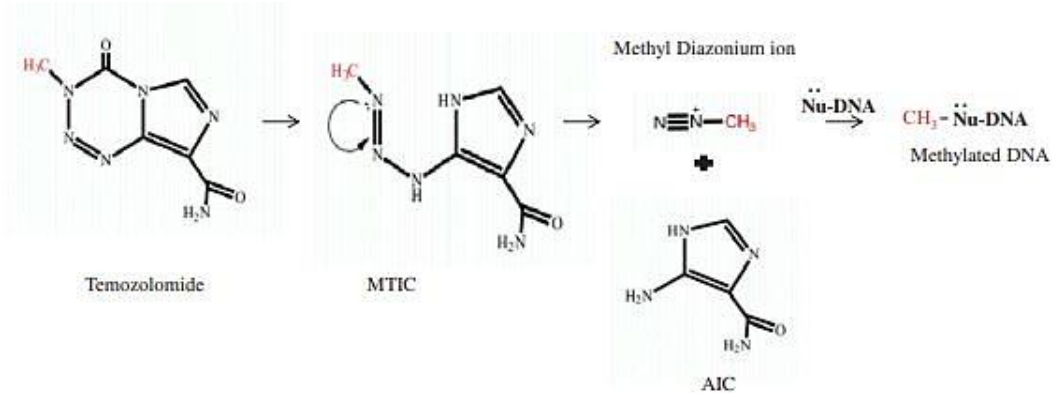
Şekil 14. MRI görüntüleme – MRI Perfüzyonu. Bir insular glioblastoma için göreceli serebral kan hacmi (rCBV) ölçümünü gösteren manyetik rezonans spektroskopisi (52).

Gliomaların ekstrakraniyal metastazları çok nadir olmasına rağmen, çoğu glioblastoma hastası, cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi müdahalelerine rağmen, tanıdan sonraki 1-2 yıl içinde ölmektedir (57). GBM'lerin tedavisinin temeli cerrahidir ve ardından süreci radyasyon ve kemoterapi takip eder. Ameliyatın birincil amacı, nörolojik fonksiyon için gerekli olan normal beyin dokusuna zarar vermeden tümörün mümkün olduğu kadar fazlasını çıkarmaktır. Cerrahi, beyindeki solid tümör doku miktarını azaltma, tümörün merkezinde radyasyona ve/veya kemoterapiye dirençli olabilecek hücreleri uzaklaştırma ve kafa içi basıncını düşürme yeteneği sağlamaktadır. Radyasyon tedavisinin amacı, çevreleyen normal beyin dokusuna sızmış olan kalan tümör hücrelerini seçici olarak öldürmektir. Harici ışın radyasyon terapisinde, tümör bölgesine sızan tümör hücrelerinin bölgesini tedavi etmek için bir marjın yanı sıra çok sayıda standart doz radyasyon "fraksiyonları" seansı verilir. Her tedavi hem sağlıklı hem de normal dokuya zarar vermektedir.

Radyo cerrahi, sıklıkla MRS veya PET taramalarından elde edilen ek bilgiler kullanılarak, tümör nüksü için seçilmiş vakalarda kullanılabilir. GBM'nin başlangıç tedavisinde nadiren kullanılır. Kemoterapi gören hastalara tümör hücrelerini öldürmek için tasarlanmış özel ilaçlar verilir. Temozolomid ilacı ile kemoterapi, GBM için mevcut tedavi standardıdır (58).

2.2.2 TEMOZOLOMİD

Temozolomid (TMZ), anti tümör aktivitesinin ilk olarak 1987'de keşfedildiği bir oral alkilleyici ajandır (59). FDA' nin Mart ayında etkinliğini onaylamasından bu yana GBM hastalarının tedavisi için etkili bir birinci basamak kemoterapötik ajan olarak yaygın bir şekilde uygulanmaktadır (60). Alkilleyici bir ajan olan TMZ, DNA'nın en kritik bölgesindeki guanin' in O6 pozisyonuna metil grubu ekleyerek hasar oluşturur. Bu hasarlar kanser hücrelerinin G2/M hücre döngüsünün durdurulmasını sağlayarak apoptosize yol açar (61). TMZ şu anda GBM' ye karşı mücadelede birinci basamak ilaç haline gelmiş ve 2 yıllık sağkalım oranını %10,4'ten %26,5'e çıkarmıştır. Elde edilen bu oranlara rağmen kanıtlar, GBM' nin klinikte kullanılan ilaçlara karşı dirençli hale gelerek artan doz ihtiyacına yol açtığını göstermiştir. Buna bağlı olarak, tedavide uygulanan ilaç dozunun artışı sistemik toksisite nedeniyle önemli yan etkiler göstermektedir (62). TMZ direncine katkıda bulunan moleküler yolların düzensizliği, TMZ direncinin temel taşıdır. Özellikle, yolağın başlatıcı reseptör tirozin kinazlarının (RTK' ler) yaygın mutasyonu ve amplifikasyonu nedeniyle PI3K/ Akt yolağı GBM' de kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (60).



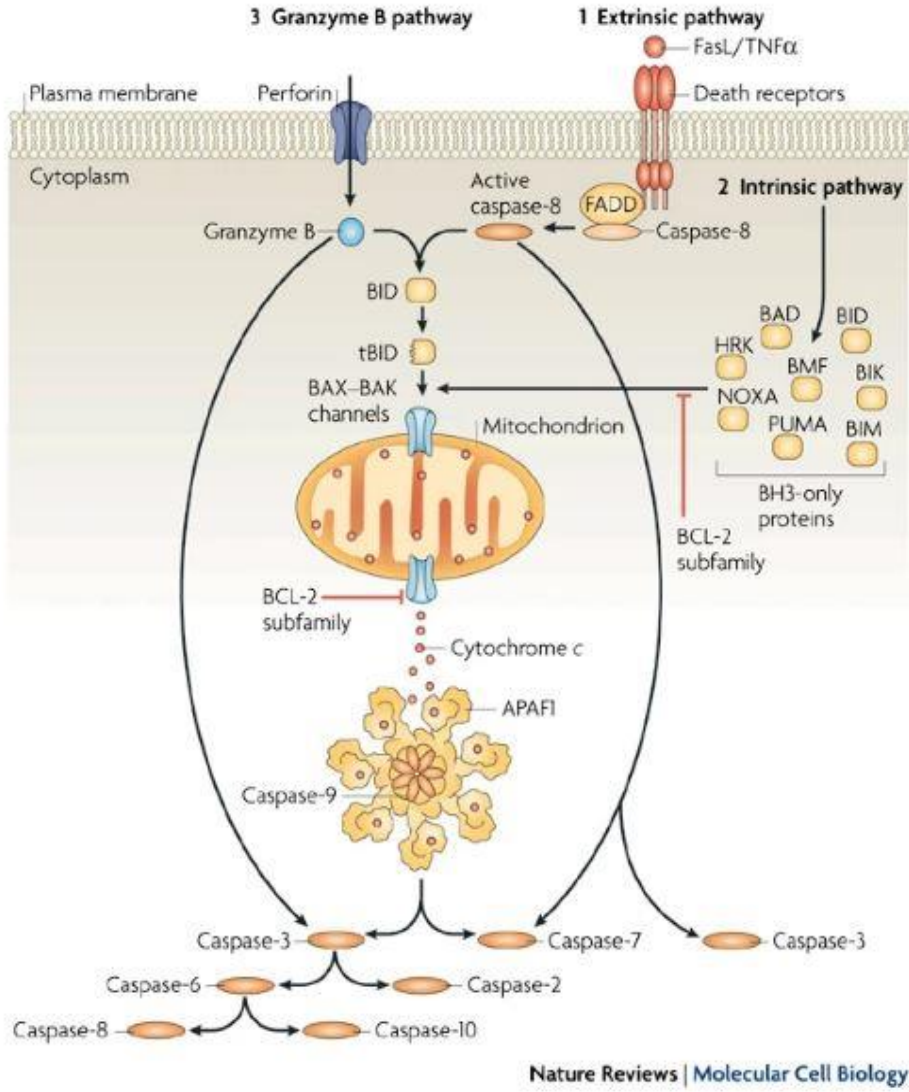
Şekil 15. Temozolomid' in etki mekanizması. Temozolomid asidik pH'ta stabildir. Fizyolojik pH'da kimyasal olarak 5-(3-metiltriazol-1-il) imidazol-4-karboksamide (MTIC, aktif bileşik, MTIC) dönüştürülür. MTIC ayrıca 5-amino-imidazol-4-metil Amide (AIC) hidrolize edilir ve Metildiazolyum Metildiazo iyonları DNA ile reaksiyona girer ve metil grubunu serbest bırakır (63).

2.3 Apoptoz

Genel olarak kanser gelişiminin nedeni, hücre döngüsünü düzenleyen bir veya daha fazla proteindeki genetik bir hasardır. Kanser gelişmesi için bir mutasyon birikimi gereklidir ve genelde kanser gelişiminde hem kalıtsal hem de çevresel faktörler bir arada rol oynar (64). Örneğin; oksidatif stres veya UV radyasyonu gibi çevresel faktörlerden etkilendiğinde hücrenin DNA'sı hasar görür, onarım mekanizmaları devreye girerek hasarı onarmaya çalışırlar. Onarım mekanizmaları hasarı yeterince onaramıyorsa hücre ölüm sinyalleri devreye girer. Ancak, bu mekanizmalar bozulursa, mutasyona uğramış hücreler çoğalabilir ve hatta zamanla ve mutasyonların birikmesiyle kanserli bir tümör oluşturur (65). Hücre ölüm sinyallerinin etkilerine karşı direnç ve ölümsüzlük, kanserli hücrelerin en önemli özelliklerinden biridir.

Programlanmış hücre ölümünün üç ana kategorisi vardır: apoptoz, otofajik hücre ölümü ve nekroz programlı hücre ölümü; kanser hücresinin kaderini birlikte belirleyebilirler (66).

Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz süreci, genellikle farklı morfolojik özellikler ve enerjiye bağlı biyokimyasal mekanizmalarla karakterize edilir. Apoptoz, normal hücre döngüsü, bağışıklık sisteminin gelişimi ve işleyişi, embriyonik gelişim ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü gibi çeşitli süreçlerin hayati bir bileşeni olarak kabul edilir. Apoptoz, normal olarak gelişme ve yaşlanma sırasında ve dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizma olarak ortaya çıkar. Apoptozu tetikleyebilen hem fizyolojik hem de patolojik çok çeşitli uyaran ve koşullar olmasına rağmen, tüm hücreler aynı uyarana yanıt olarak mutlaka ölmeyecektir (67). Apoptoz, “kaspazlar” olarak adlandırılan bir grup sistein proteazın aktivasyonunu ve başlatıcı uyaranları hücrenin nihai ölümüne bağlayan karmaşık olaylar dizisini içeren koordineli ve genellikle enerjiye bağlı bir süreçtir.



Şekil 16. Apoptoz Yolakları

Ekstrinsik yolak (yolak 1), hücre yüzeyinde tümör nekroz faktörü (TNF) ailesi ölüm reseptörlerinin ligasyonu ile tetiklenir. Reseptör ligasyonu, Fas ile ilişkili ölüm alanı proteini (FADD) gibi adaptör proteinlerin alınımı tetikler, bu da pro-kaspaz-8 moleküllerini bağlamak suretiyle kaspaz-8'in oto proteolitik işlenmesine ve aktivasyonunun gerçekleşmemesine izin verir.

Aktif kaspaz-8 daha sonra kaspaz-3 ve -7'yi proteolitik olarak işler ve aktive eder, substrat proteolizi ve hücre ölümü ile sonuçlanan başka kaspaz aktivasyon olaylarını tetikler.

Bazı durumlarda, ekstrinsik ölüm sinyalleri, yalnızca BH3 proteini BID' in (BH3 etkileşimli alan ölüm agonisti) kaspaz-8 aracılı proteolizi yoluyla intrinsik yol ile çapraz iletişim kurabilir. Kesik BID (tBID), mitokondriyal sitokrom c salınımını ve apoptozomun birleştirilmesini teşvik edebilir. *İntrinsik yolakta (yolak 2)*, hücre stresini veya hasarını tetikleyen çeşitli uyaranlar tipik olarak sadece BH3 protein ailesinin bir veya daha fazla üyesini aktive eder. Yalnızca BH3 proteinleri, çeşitli uyaranlar için yola özgü sensörler olarak işlev görür ve farklı şekillerde düzenlenir. Önemli bir eşğin üzerindeki yalnızca BH3 protein aktivasyonu, anti-apoptotik B hücreli lenfoma-2 (Bcl -2) aile üyelerinin inhibe edici etkisinin üstesinden gelir ve Bak-Bax oligomerlerinin mitokondriyal dış zarlar içinde birleşmesini destekler. Bu oligomerler, sitokrom c gibi zarlar arası boşluk proteinlerinin sitozole akışına izin verir. Mitokondriden salındığında, sitokrom c apoptozom düzeneği tetiklenebilir. Aktif kaspaz-9 daha sonra başka kaspaz aktivasyon olaylarının bir proteolitik kaskadını yayar. *Kaspaz aktivasyonuna yönelik granzim B'ye bağlı yolak (yolak 3)*, bu proteazın sitotoksik T lenfositlerden veya doğal öldürücü (NK) hücrelerden salınan özel granüller yoluyla hedef hücreye verilmesini içerir. Sitotoksik T lenfositleri ve NK granülleri, çok sayıda granzimin yanı sıra, granzimlerin girişine izin vermek için hedef hücrelerin zarlarında oligomerize olan gözenek oluşturuvcu bir protein olan perforin içerir. Granzyme B, kaspazlara benzer şekilde, Asp kalıntılarından sonra substratlarını ayırır ve apoptozu başlatmak için kaspaz-3 ve -7'nin yanı sıra BID' i işleyebilir (68).

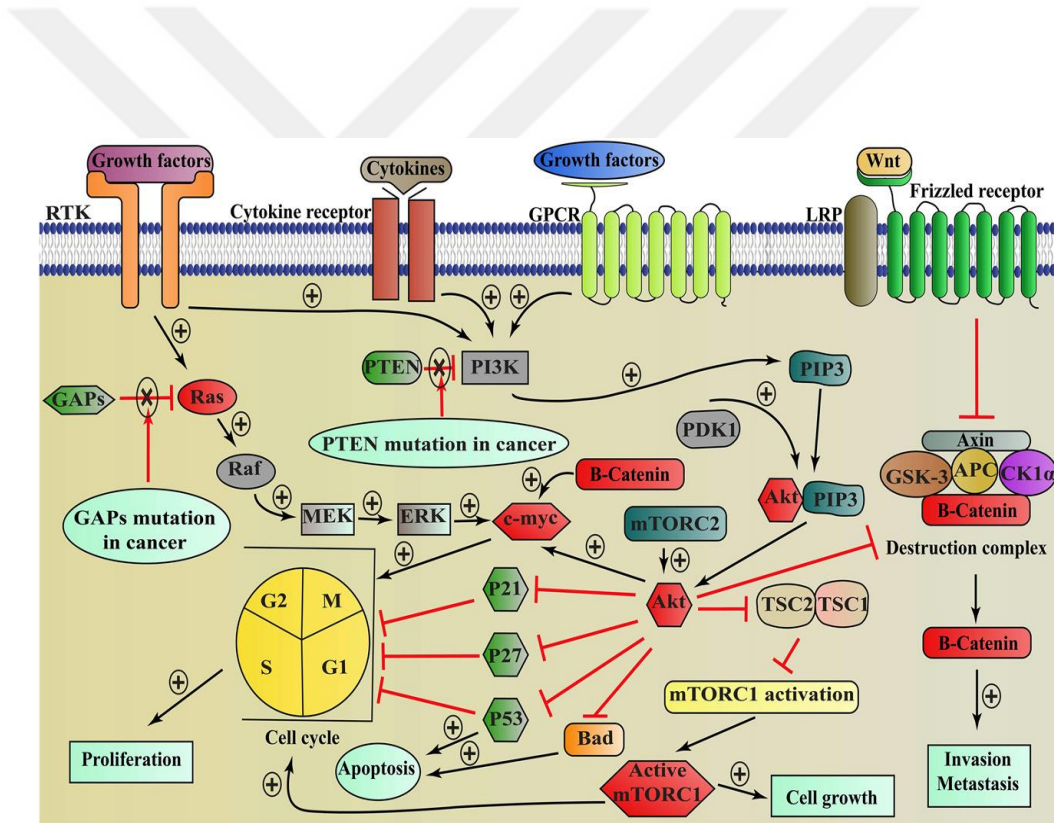
Apoptozun özel bir önemi vardır ve kanser tedavisi ile ilgili çalışmalar kanser hücrelerinde apoptozu indüklemeye yollarına odaklanmıştır. Fonksiyon açısından, kanserin gelişimi ve ilerlemesinde rol oynayan genler, onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olarak kategorize edilebilir.

Onkogenler, tümör oluşumunu uyaran proteinleri kodlar. Öte yandan, tümör baskılayıcı genler, tümörlerin gelişimini engeller. p53, hücre döngüsünün kontrolünde ve apoptoz indüksiyonunda rol oynayan en önemli tümör baskılayıcı genler arasındadır. K-RAS, B-RAF ve c-MYC de en önemli onkogenlerdir (69). Genel olarak kanserlerde, proliferasyonun uyarılması ve ölümsüzlük gibi farklı etkilere neden olan genetik ve epigenetik değişiklikler meydana gelir bu genetik ve epigenetik değişiklikler kanser gelişimine aracılık eden sinyal yollarında meydana gelmektedir. Ras/ERK, AKT/PI3K–mTOR sinyal yolları tümör oluşumunda. rol oynayan en önemli sinyal yolları arasındadır. Bu bağlamda, tipik olarak kanserlerde mutasyona uğrayan önemli sayıda gen, bu sinyal yollarının mutant bileşenlerini kodlar. Bu sinyal yolları, büyüme faktörleri gibi farklı ligandlar tarafından fizyolojik koşullar altında aktive edilir. Bu yolların aktivasyonu bir ligandın varlığını gerektirmesine rağmen kanserli hücrelerde meydana gelebilecek gen mutasyonları nedeniyle bu sinyal yolları büyüme faktörlerinin yokluğunda da aktif olabilir. Bu nedenle kanserli hücreler kontrolsüz bir şekilde büyüyebilir ve çoğalabilir (70).

MAPK/ERK sinyal yolu, kanserlerde önemli bir diğer sinyal yoludur. Epidermal büyüme faktörü (EGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi farklı büyüme faktörleri MAPK/ERK sinyal yolunu aktive edebilir. Bu büyüme faktörlerinin tirozin kinaz özelliği taşıyan reseptörlerine bağlanması, Ras adlı küçük bir G proteininin aktivasyonuna yol açan olayları başlatır. Bu protein, çoğalma, farklılaşma, apoptoz ve göç gibi hücrel olayların düzenlenmesinde önemlidir (71).

Ras, Raf aktivasyonu ve nihayetinde ERK aktivasyonu ile sonuçlanan olayları başlatır. ERK, farklı molekülleri hedefler ve genellikle hücre proliferasyonu üzerinde uyarıcı etki gösterir. ERK' nin hedeflerinden biri, myc olarak adlandırılan iyi bilinen proto-onkogendir (72).

Rapamisinin memeli hedefi (mTOR), çoklu hücre içi ve çevresel sinyalleri algılamak ve entegre etmek için yapısal ve işlevsel olarak farklı iki protein kompleksi, mTOR kompleksi 1 (mTORC1) ve mTOR kompleksi 2 (mTORC2) aracılığıyla hareket eden bir serin/treonin kinazdır. mTOR sinyali genellikle hücre sağkalımı, hücre büyümesi, hücre metabolizması, protein sentezi ve otofajinin yanı sıra homeostazın düzenlenmesinde rol oynar. Sinyal zincirinin farklı düzeylerindeki genetik değişikliklerden kaynaklanan anormal mTOR sinyalleri, çeşitli kanser türlerinde yaygın olarak gözlenir. Hiperaktivasyon üzerine, mTOR sinyali, tümörün başlamasına ve ilerlemesine katkıda bulunan hücre çoğalmasını ve metabolizmasını destekler (73).



Şekil 17. Sinyal İletimi ve Kanser (74).

2.4 Bal

Bal, şeker, su, proteinler, vitaminler, mineraller, polifenolik bileşikler ve bitki türevleri dahil olmak üzere 180- 200 farklı maddeden oluşan karmaşık bir gıda maddesidir (75). Balın bileşimi ve kalitesi arıların ortamındaki bitki florası, bölgesel iklim, hasat, işleme, depolama ve çiçek kaynaklarına göre değişir. Bu farklılıklar balın farmakolojik aktivitesi ve potansiyelini de belirler.

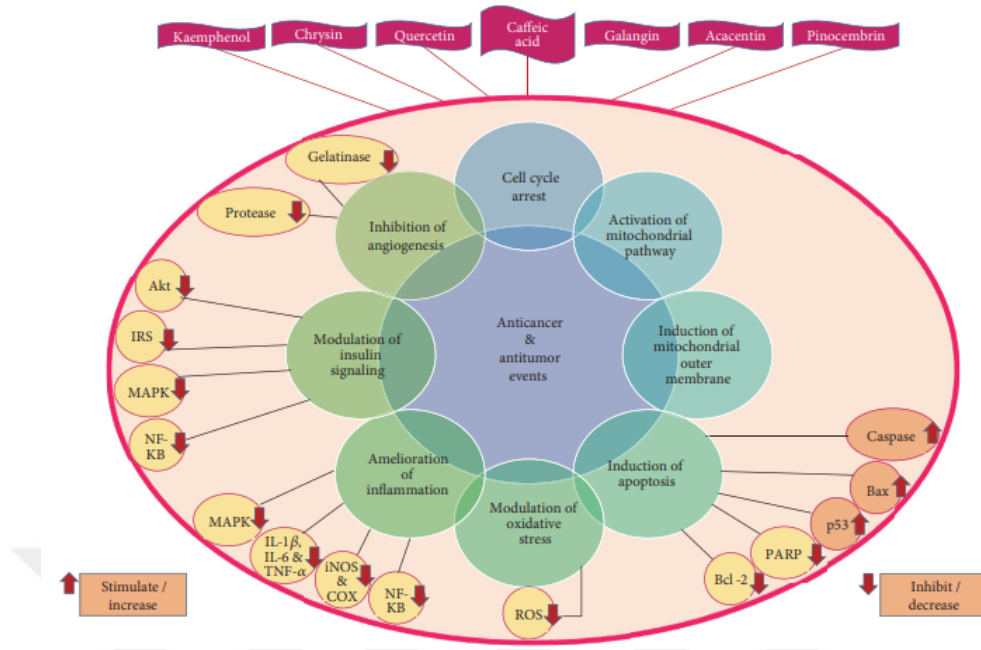
Balın genel bileşiminde karbonhidratlar, balın kuru ağırlığının yaklaşık %95'ini oluşturan ana bileşenlerdir. Bal kabaca %0,5 protein, başlıca enzimler ve serbest amino asitler içermektedir. 0,3-25 mg/kg kolin ve 0,06 ila 5 mg/kg asetilkolin içerir. Kolin, kardiyovasküler ve beyin fonksiyonlarının yanı sıra hücresel membran bileşimi ve onarımı için gereklidir, asetilkolin ise bir nörotransmitter görevi görür (76).

Polifenoller balın görünümü ve fonksiyonel özellikleri açısından bir diğer önemli bileşik grubudur. Farklı bal türlerinde 56 ila 500 mg/kg toplam polifenol bulunmuştur (77). Baldaki polifenoller başlıca flavonoidlerdir (örn. kersetin, luteolin, kaempferol, apigenin, chrysin, galangin), fenolik asitler ve fenolik asit türevleridir (78).Eski zamanlardan beri bal sadece bir gıda veya tatlandırıcı olarak görülmekle kalmamış, aynı zamanda yaranın iyileşmesini, doku yenilenmesini teşvik etmek ve mide-bağırsak rahatsızlıkları, diş eti iltihabı gibi çeşitli patolojileri hafifletmek için bir ilaç olarak da kullanılmıştır. Balın terapötik etkisi, flavonoidler ve fenolik asitler gibi fenolik bileşikler dahil olmak üzere çeşitli antioksidan moleküllerin varlığından kaynaklanmaktadır (79).

2.4.1 Balın antikanser özellikleri

Çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar balın antimikrobiyal, antiviral, anti-fungal, antikanser ve antidiyabetik aktivitesini göstermiştir (80). Balın pro-apoptotik ile anti-proliferatif etkisi; meme kanseri, kolorektal kanser, melanom kanseri ve glioblastoma gibi birçok kanser türünde kanıtlanmıştır. Bu etki pro-apoptotik kaspaz-9, kaspaz-3 ve Bax' ın yukarı regülasyonu ve anti-apoptotik protein Bcl-2'nin aşağı regülasyonu ile apoptozu indüklemesiyle gerçekleşmiştir (81).

Bal, eski zamanlardan beri geleneksel bir ilaç olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte, son zamanlarda birçok araştırmacı, balın antioksidan, anti-proliferatif, anti-inflamatuar ve diğer özellikleri üzerinde yoğunlaşmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda bal ve balın flavonoid bileşenlerinin GBM hücre hatları üzerindeki antikanser etkisi araştırılmış, sonuç olarak da balın anti-proliferatif, anti-metastatik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (82,83). Bu çalışmalardan birinde Polonya'dan gelen farklı balların Glioblastoma Multiforme U-87 MG hücre hattı üzerinde zamana ve doza bağlı bir şekilde güçlü bir anti-proliferatif etkiye sahip olduğu, ayrıca 48 saat sonra bal ile Temozolomid kombinasyonunun, tek başına bal örneklerinden önemli oranda daha yüksek bir inhibitör etki gösterdiği kanıtlanmıştır (82). Bir diğer çalışmada ise arı ürünlerinin kullanımının U-87 MG'de TMZ'nin sitotoksik etkisini arttırdığı, ek olarak kanser invazyonunda önemli rol oynayan MMP-9 ve MMP-2 sekresyonunda önemli bir azalış gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Bu nedenle, doğal arı balı, beyin tümörleri için umut verici bir adjuvan tedavi olarak kabul edilebileceği öngörülmüştür (84).



Şekil 18. Bal ürünlerinin antikanser ve antitümör aktivitelerinden sorumlu moleküler mekanizmalar .IRS—insülin reseptör substratı, MAPK—mitojenle aktive olan protein kinaz, NF-κB—nükleer faktör kappa B, IL-1β—interlökin-1 beta, IL-6—interlökin-6, TNF α—tümör nekroz faktör alfa, iNOS —uyarılabilir nitrik oksit sentaz, COX—siklooksijenaz, ROS—reaktif oksijen türleri, Bcl-2—B hücre lenfoma-2 ve PARP—poli (ADP-riboz) polimerazlar (85).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Deneysel, kontrollü bir araştırma yapılmıştır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu çalışma Dicle Üniversitesi ve Dokuz Eylül Üniversitesi'nde gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın hücre kültürü çalışmaları, sitotoksik test (MTT) ve Western Blot deneyleri Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma Laboratuvarı'nda, qRT-PCR Analiz ve migrasyon deneyleri ise Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi,

Bu çalışma Glioblastoma (U-118 MG, T98G ve U-87 MG) hücre hatları üzerinde çalışılacaktır.

3.4. Çalışma Materyali

Bu çalışmada yer alan Glioblastoma hücreleri U-118 MG, T98G ve U-87 MG ATCC'den temin edilmiştir.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişken, *BCL-XL*, *BCL-2*, *BAD*, *BAX* ve *GAPDH* gen ifadeleri Bağımsız değişken; *Bal*, *Temozolomid* olarak kabul edilmiştir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller

Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar, sarf malzemeler, diğer malzemeler markalarıyla aşağıda belirtilmiştir.

3.6.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları

Laminar Akışlı Biyogüvenlik Kabini (Thermo SAFE 2020 1.2 CLAS II)

Karbondioksit İnkübatör (Thermo Scientific Steri Cycle 370 CO₂ Incubator)

CO₂’ Li İnkübatör (Thermo Steri-Cycle 371)

Faz-Kontrast Mikroskop (Carl Zeiss Primo Vert)

Su Banyosu (Stuart Swb24d)

Otomatik Pipet Seti (Eppendorf)

Mikroplate Okuyucu (Multi Scan Go, Thermo)

Bio Drop (Biodrop-Duo)

Thermal Cyclers (Eppendorf Mastercycler Nexus Sx1)

Real Time Pcr Cihazı (Rotor Gene Q, Qiagen)

Vorteks (Scilogex)

Manyetik Karıştırıcı (İka C-Mag Hs 7)

Hassas Elektronik Tartı (Denver Instrument)

4°C Buzdolabı (Ariston)

-20°C Derin Dondurucu (Indesit)

-80°C Derin Dondurucu (Thermo)

Su Banyosu (Stuart Swb24d)

Ph Metre (Hanna)

Platform Rocker (Stuart Ssl3)

Ultra Saf Su Cihazı (Direct-Q® 3 Uv Water)

Mini-Protean Tetra Cell (Biorad)

Görüntüleme Sistemi (Chemidoc™, Biorad)

Trans-Blot Turbo Transfer Sistemi (Biorad)

Soğutmalı Santrifüj (Eppendorf)

Santrifüj (Sl8, Thermo)

Isı Bloğu (Vwr)

3.6.1.2. Çalışmada Kullanılan Malzemeler ve Markaları

Penisilin/Streptomisin (Gibco™)

Trypsin (Gibco™, Trypsin-Edta (0.25%), Phenol Red)

Dmem- Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma-Aldrich)

Fbs (Fetal Bovine Serum) (Serox)

Filtre Kapaklı Hücre Kültürü Flaskları (25cm² -75 Cm², Cellstar)

Dmso (Dimetil Sülfoksit) (Sigma-Aldrich)

Pbs (Dpbs W/O: Ca And Mg)

96, 6 Well Kültür Platerleri (Thermo)

Serolojik Pipet 5 Ml,10 Ml ve 25 Ml (Isolab)

15 Ml'lik ve 50 Ml'lik Santrifüj Tüpleri (Isolab)

4-Tüplü Şerit ve Kapaklar 0.1 Ml (Abt L13-01-10)

Kryojenik Vial (Tarsons 523021)

PCR Tüpü (Isolab)

Cdna Sentez Kiti (Applied Biosystems™ High-Capacity Rna-To-Cdna™ Kit)

Rna İzolasyon Kiti (High Pure Rna Isolation Kit- Roche Life Science)

Rt-PCR Kiti (Applied Biosystems™ High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit)

MTT Formazan Tozu (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide- Sigma-Aldrich)

Bca Protein Assay Kiti (Thermo Scientific Pierce)

Tgx Stain-Free Fast Cast Acrylamid Jel (Bio-Rad)

Ecl Görüntüleme Solüsyonu (Bio-Rad)

Transfer Paketi (Bio-Rad, Transblot Turbo Transfer System)

Anti-ERK 1/2, Anti-Phospho- ERK 1/2 Antikor (Cell Signaling)

Anti-Bax, Anti-Bcl-2, Anti-B-Actin (Santa Cruz)

Sekonder Antikor Anti-Mouse ve Anti-Rabbit (Abcam)

Tris Baz (Merck, Sigma-Aldrich)

Glycine (Merck, Sigma-Aldrich)

Sds (Sodium Dodecyl Sulfate, Invitrogen)

Sodyum Klorür (Sigma-Aldrich)

Potassium Chloride (Sigma-Aldrich)

Disodyum Fosfat (Sigma-Aldrich)

Mono Potasyum Fosfat (Sigma-Aldrich)

Ditiotreitol (Sigma-Aldrich)

Bromophenol Blue (Sigma-Aldrich)

Protein Markerı (Pageruler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 To 250 Kda)

Proteaz-Fosfotaz İnhibitör Kokteyli (Thermo Fischer)

Rıpa Tampon (Sigma-Aldrich)

Nükleaz (Thermo Fischer)

Hücre Kazıyıcı (Nunc™ Cell Scrapers- Thermo Fisher)

Gliserol (Merck Millipore)

Tetrametiletildiamin (Sigma-Aldrich)

Amonyum Persülfat (Thermo Fisher Scientific)

Temozolomide (Tc1 America™ Cat: T2744500mg)

3.6.2 Kullanılan Metotlar

3.6.2.1 Hücre Hattının Uygun Ortam Koşullarında İnkübe Edilmesi

Glioblastoma hücre serisi U-118 MG, T98G ve U-87 MG hücreleri %10' luk FBS, 2mM L-Glutamine ve 100 units/ml penisilin/streptomisin içeren DMEM besiyeri ile hücre kültürü ortamında çoğaltıldı. Hücre kültürleri, 37 °C, %5' lik CO₂' li nemli ortamda (Thermo Steri-Cycle 371) tutuldu.



Şekil 19. Glioblastoma Hücre hatlarının inkübe edildiği CO2 inkübatör

3.6.2.2 Hücre Hatlarının Pasajlanması ve Dondurulması

İnkübatördeki flasklar invert mikroskopta gözlemlendikten sonra konfluensi oranı belirlendi. Flaskın %70'inin dolduğu görülünce pasajlama yapıldı. Özetle; flask içindeki ortam pompa yardımıyla aspire edildi. T25 flaş için 5 ml PBS flaskta eklendi. Hücrelerin tutunduğu yüzey yıkandıktan sonra pompa flasktaki sıvı aspire edildi. Ardından T25 flask için 1 ml tripsin enzimi eklendi ve flask yüzeyinde iyice gezdirildikten sonra 37°C'de 3-5 dk arası bekletildi. 4 dakika sonunda inkübatörden alınan flask invert mikroskopta gözlemlendi ve hücrelerin yuvarlak ve yüzeyden ayrılmış olduğu görüldü. Flaskta tripsini inaktive etmesi için 2 katı miktarda besin ortamı eklendi. 150 g' de 7 dakika santrifüj edilip hücreler steril kabin içerisinde 1×10^6 hücre/ml miktarda seyreltilerek pasajları yapıldı. Ayrıca, glioblastoma hücrelerinin ileride yapılacak olası çalışmalar sebebiyle saklanması için 2×10^6 hücre, %70 DMEM 1640, %20 FBS ve %10 Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich) içeren soğutulmuş solüsyon içerisinde 1 gün -80 °C' de bekletildikten sonra sıvı azotta muhafaza edildi.



Şekil 20. Deney uygulamalarının yapıldığı biyogüvenlikli laminar kabin

3.6.2.3. Bal ve Temozolomid 'in GBM Hücrelerine Sitotoksik Etkisinin Araştırılması ve IC50 değerinin bulunması

3.6.2.3.1 Bal ve Temozolomid Konsantrasyonlarının Belirlemesi

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda multifloral bal için konsantrasyonların %5, %10, %15, %20 (w/v) uygulanması ve farklı deney setinin kurulması planlandı. (86–88) Ticari olarak alınan bal +4'te saklandı. Çözücü olarak FBS içermeyen DMEM besiyeri kullanıldı.

Konsantrasyon olarak; gliomlu hastaların beyinlerinde TMZ miktarına en yakın değer olan ve aynı zamanda yapılan çalışmalarda sık kullanılan 20 µM seçilmiştir (89).

3.6.2.3.2 Sitotoksisite Deneyi

GBM (U-118 MG, T98G ve U-87 MG) hücreleri, yeterli sayıda hücre elde etmek için DMEM (Zenginleştirilmiş) %5 CO₂ inkübatöründe 37 °C'de 75 cm²'lik flasklarda kültürlendi.

Ardından üç hücre hattından her bir kuyucuğa 1x10⁴ hücre olacak şekilde 96 well platelere ekim yapıldı ve 37°C, %5' lik CO₂' li nemli ortamda hücreler 24 saat inkübe edildi. Ertesi gün hücrelere, tablo 1' deki belirlenen konsantrasyon ve düzende bal (%5, %10, %15 ve %20) ve TMZ (20 µM) eklendi. %5 CO₂ içeren nemli bir atmosferde 37 °C' de 24 ve 48 saat inkübe edildi. MTT tahlili, tedavilerden 24 ve 48 saat sonra yapıldı. Her kuyucuğa 10 µl 5 mg/ml MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide- Sigma-Aldrich) solüsyonu ilave edildi ve hücreler, %5 CO₂ içeren nemli bir atmosferde 37 °C' de 3 saat inkübe edildi. 3 saat sonra ortam, 100 µl DMSO ile değiştirildi.

Plateler, 15 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıya (Stuart SSL3) konuldu ve kuyucukların optik yoğunluğu (OD), bir plate okuyucu (Multi Scan Go, Thermo) kullanılarak 540 nm dalga boyunda belirlendi. Kontrol grubu, bal çözücüsü olarak kullandığımız FBS içermeyen DMEM besiyeri ve TMZ çözücüsü olarak kullandığımız ultra saf su kullanıldı. Tüm deneyler üç kez tekrarlandı. Veriler ortalama değer $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. Tüm veriler, değer anlamlılığını hesaplamak için T testi kullanılarak Graphpad Prism 7, programı ile analiz edildi. P <0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 1. U-118 MG Hücre hatları için MTT plate düzeneği

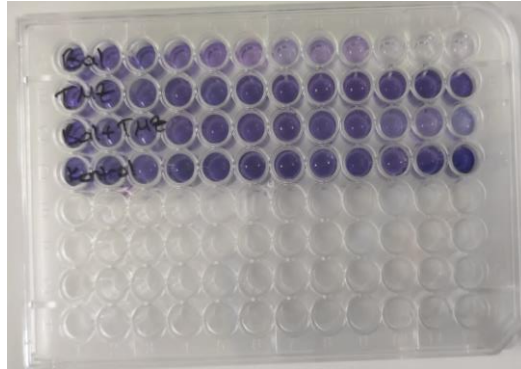
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	U118 %5 BAL	U118 %5 BAL	U118 %5 BAL	U118 %10 BAL	U118 %10 BAL	U118 %10 BAL	U118 %15 BAL	U118 %15 BAL	U118 %15 BAL	U118 %20 BAL	U118 %20 BAL	U118 %20 BAL
B	U118 TMZ (10 μ M)	U118 TMZ (10 μ M)	U118 TMZ (10 μ M)									
C	U118 %5 BAL- TMZ	U118 %5 BAL- TMZ	U118 %5 BAL- TMZ	U118 %10 BAL-TMZ	U118 %10 BAL-TMZ	U118 %10 BAL-TMZ	U118 %15 BAL-TMZ	U118 %15 BAL-TMZ	U118 %15 BAL-TMZ	U118 %20 BAL-TMZ	U118 %20 BAL-TMZ	U118 %20 BAL-TMZ
D	U118 KONTROL	U118 KONTROL	U118 KONTROL									

Tablo 2. T98G Hücre hatları için MTT plate düzeneği

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T98G %5 BAL	T98G %5 BAL	T98G %5 BAL	T98G %10 BAL	T98G %10 BAL	T98G %10 BAL	T98G %15 BAL	T98G %15 BAL	T98G %15 BAL	T98G %20 BAL	T98G %20 BAL	T98G %20 BAL
B	T98G TMZ (10 μ M)	T98G TMZ (10 μ M)	T98G TMZ (10 μ M)									
C	T98G %5 BAL- TMZ	T98G %5 BAL- TMZ	T98G %5 BAL- TMZ	T98G %10 BAL-TMZ	T98G %10 BAL-TMZ	T98G %10 BAL-TMZ	T98G %15 BAL-TMZ	T98G %15 BAL-TMZ	T98G %15 BAL-TMZ	T98G %20 BAL-TMZ	T98G %20 BAL-TMZ	T98G %20 BAL-TMZ
D	U118 KONTROL	U118 KONTROL	U118 KONTROL									

Tablo 3. U-87 MG Hücresel hatları için MTT plate düzeni

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	U87MG %5 BAL	U87MG %5 BAL	U87MG %5 BAL	U87MG %10 BAL	U87MG %10 BAL	U87MG %10 BAL	U87MG %15 BAL	U87MG %15 BAL	U87MG %15 BAL	U87MG %20 BAL	U87MG %20 BAL	U87MG %20 BAL
B	U87MG TMZ (10 µM)	U87MG TMZ (10 µM)	U87MG TMZ (10 µM)									
C	U87MG %5 BAL- TMZ	U87MG %5 BAL- TMZ	U87MG %5 BAL- TMZ	U87MG %10 BAL-TMZ	U87MG %10 BAL-TMZ	U87MG %10 BAL-TMZ	U87MG %15 BAL-TMZ	U87MG %15 BAL-TMZ	U87MG %15 BAL-TMZ	U87MG %20 BAL-TMZ	U87MG %20 BAL-TMZ	U87MG %20 BAL-TMZ
D	U87MG KONTROL	U87MG KONTROL	U87MG KONTROL									



Şekil 21. GBM hücrelerinin 96 well plate düzenine ekimi ve MTT görüntüleri

3.6.2.4 Bal ve Bal-TMZ kombine tedavisinin Apoptoz ilişkili genlerde mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırılması (RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Kantitatif Real-Time PCR)

Kısaca, 1×10^4 GBM hücresi 12-well platelere yerleştirildi ve 37 °C, %5' lik CO₂' li nemli ortamda hücreler 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra hücreler MTT deneyinde belirlenen sitotoksik olmayan bal, Bal+TMZ dozu (Tablo 4) ve TMZ (20 µM), kontrol grubu olarak muamele edilip 48 saat süreyle 37 °C, %5' lik CO₂' li nemli ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra hücreler PBS ile yıkandıktan sonra yerinden kaldırıldı.



Şekil 22. Real Time PCR için hazırlanan deney düzenekleri

Tablo 4. MTT sonuçlarının Graphpad Prism 7 analizi ile belirlenen IC50 sonuçları

Hücre hattı	Bal için IC50 Değeri	Bal+TMZ için IC50 Değeri
U-118 MG	%6,9	%17,30
T98G	%11,56	%16,90
U-87 MG	%10,68	%19,09

Hücrelerden total RNA' lar, high pure RNA isolation kit (Roche) kullanılarak ve firmanın kullanım talimatlarına uyularak izole edildi. Kısaca; hücreler santrifüj edilip pellet 200 µl PBS ile çözüldü. 400 µl lizis tamponu eklenip iyice pipetlendi. Lizat spin kolona aktarılıp 15 saniye 8,000 x g 'de santrifüj edildi. Her bir örnek, için 10 µl DNAaz 90 µl DNAaz inkübasyon tamponu karıştırılıp kolona eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 15 dakika sonrasında yıkama solüsyonu 1' den 500 µl alınıp eklendi ve 8,000 x g' de 15 saniye santrifüj edildi. Atık tüpteki sıvı uzaklaştırılıp kolona 500 µl yıkama solüsyonu 2' den eklendi ve 13,000 x g' de 2 dakika santrifüj edildi. Son olarak 60 µl elüsyon tamponu eklenip 8,000 x g' de 1 dakika satrifüj edildi. Elde edilen RNA' ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik yöntemle (nanodrop) belirlendi.

Ortalama 0.5- 1 µg RNA örnekleriyle, cDNA sentez kiti (Applied Biosystems™ High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit) kullanılarak ve firmanın kullanma talimatlarına uyularak cDNA elde edildi. Kısaca; Tablo 4’ teki oranlarda karışım hazırlandı. Karışım pipetlenip spinlendi. Reaksiyon 37 °C' de 60 dakika inkübe edildi ardından reaksiyon 5 dakika 95 °C ısıtılarak durduruldu ve 4°C'de tutuldu.

Tablo 5. cDNA Sentez Kiti Bileşenleri

Bileşenler	Bir örnek için bileşen hacimleri
2x RT Tampon Karışımı	10 µl
20x Enzim Karışımı	1,0 µl
Rna Örneği	5 µl
PCR Grade Su	3 µl
Toplam Hacim	20 µl

Anti-apoptotik ve pro-apoptotik genlerin ekspresyon seviyelerinin saptanması için Real Time PCR yöntemi (RotorGene cihazı ile) kullanıldı. Primerler firma tarafından Tablo 5’ te sekansları belirtildiği şekilde sentezlendikten ve HPLC yöntemiyle saflaştırıldıktan sonra liyofilize halde satın alındı.

Tablo 6. Primer Dizayn Bilgileri

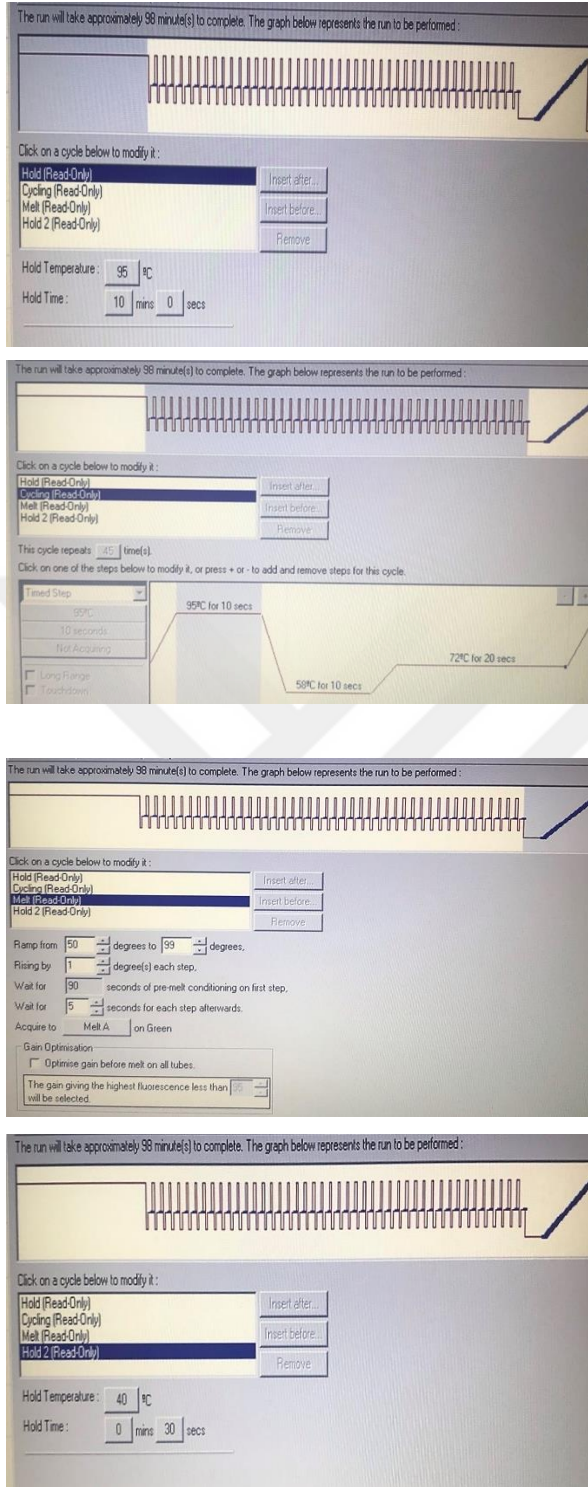
GAPDH	İleri Primer	5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3'
	Geri Primer	5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'
BAX	İleri Primer	5'-AAGAAGCTGAGCGAGT-3
	Geri Primer	5'-GCCCCATGATGGTTCTG-3'
BCL-XL	İleri Primer	5'-GCTGGTGGTTGACT-3'
	Geri Primer	5'-GGATGGGTTGCCATTGA-3'
BCL-2	İleri Primer	5'-TCAGGCTGCTTGGGATAAAGATG-3'
	Geri Primer	5'-GGCTTCTGGAGGACATTTGGA-3'
BAD	İleri Primer	5'-GAGGTCCTGAGCCGACAG-3'
	Geri Primer	5'-CTTCCTCTCCCACCGTAGC-3'

Örnekler cDNA protokolünden sonra 1:10 sulandırılarak RT-PCR işlemine hazırlandı. Tablo 6' daki oranda (Applied Biosystems™SYBR™ Green PCR Master Mix) kit içerikleri kullanılarak örnekler deneye hazır hale getirildi.

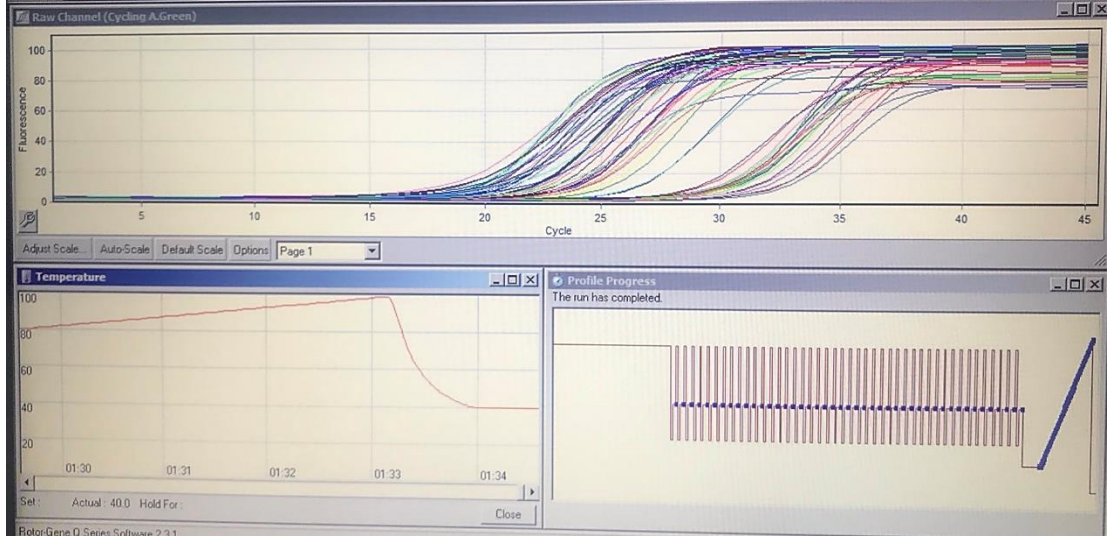
Tablo 7. RT-PCR Kit Bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Bir örnek için bileşen hacimleri
PCR dereceli su	10,3 µl
10x Taqman RT Buffer	1,0 µl
25 m M MgCl ₂	2,2 µl
DNTP Karışımı	2,0 µl
Random Hexamer	0,5 µl
Ters Transkriptaz Enzimi	0,25 µl
cDNA örneği	5,0 µl

Real Time PCR reaksiyonu hazırlanırken bütün işlemler soğuk blok üzerinde yapıldı. Saflığı ve miktarı belirlenen total RNA' nin q-PCR reaksiyonunda hedef genler Bax, Bcl-xL, Bcl-2 ve Bad genleri ve hedef genlerin ifade profilinin normalizasyonunda Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) referans gen (housekeeping) olarak kullanıldı. PCR tüpleri cihaza (RotorGene) yerleştirildikten sonra q-PCR program bilgileri bilgisayarda yazıldı. Hedef genlerin Ct değerleri ile referans GAPDH geninin Ct değerinin karşılaştırılması için gerekli hesaplamalar yapıldı. Her gen 3 tekrarlı şekilde çalışıldı. Bağımsız olarak deneyler üç kez tekrar edildi. Veriler Gerçek Zamanlı PCR analizi sonunda Ct verilerine göre ΔCt ve $\Delta\Delta Ct$ formülü ile hesaplandı ve kat sayıları değerlendirildi.



Şekil 23: Real Time PCR ısııl koşul tablosu



Şekil 24: Real Time PCR Pik Görüntüleri

3.6.2.5 Bal ve TMZ' nin sinyal yolları ile olan etkileşiminin Western Blot yöntemiyle araştırılması

2.1×10^6 GBM hücre hatları T-75 flasklara ekildi ve 37 °C, %5' lik CO₂' li nemli ortamda hücreler 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra hücreler Tablo 8' de belirtilen düzende ve MTT deneyinde belirlenen sitotoksik olmayan Bal, Bal-TMZ dozuyla (Tablo 4) muamele edilip 48 saat süreyle 37 °C, %5' lik CO₂' li nemli ortamda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler hücre kazıyıcı (Nunc™ Cell Scrapers - Thermo Fisher) yardımıyla flasktan uzaklaştırıldı ve 15 ml falkon tüp içerisine alındı. Hücreler 5000 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Daha sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve yıkama işlemi için tüplere 10 ml PBS eklenerek santrifüjlendi. Hücre peleti bulunan tüpler buz üzerine taşındı ve sonraki tüm aşamalar buz üzerinde gerçekleştirildi. PBS uzaklaştırıldıktan sonra pelet üzerine proteaz-fosfotaz inhibitör kokteyli (Thermo Fischer) ve nükleaz (Thermo Fischer) içeren soğuk RIPA buffer (300 µl) (Sigma Aldrich) eklendi. Önce pipet ile sonra vortekslenerek karıştırılan örnekler buzun üzerinde 60 dk bekletilerek liziz edildi. Protein karışımı içindeki toplam protein miktarı BCA protein assay kiti (Thermo Scientific Pierce) kullanılarak ölçüldü.

Tablo 8. GBM hücrelerinin uygulama grupları

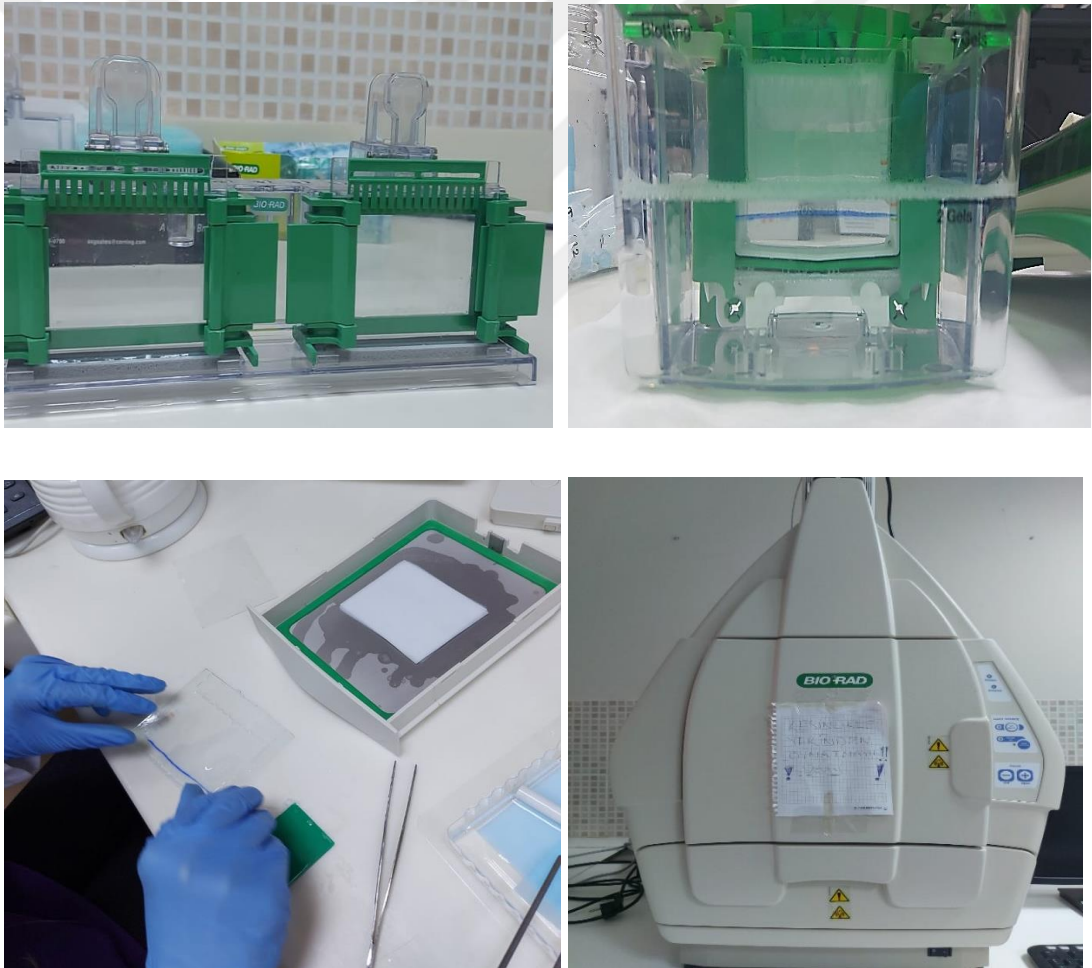
U-118 MG	T98G	U-87 MG
Bal	Bal	Bal
Bal-TMZ	Bal-TMZ	Bal-TMZ
Kontrol	Kontrol	Kontrol
TMZ	TMZ	TMZ

Protein örneklerinin jelde ayrımı %10 ‘luk TGX stain-free fast cast acrylamid jel (Bio-Rad) ile Mini Protean Tetra Cell apparatus sistemi (Bio-Rad) kullanılarak gerçekleştirildi. (Şekil 22) Protein örnekleri 1× SDS loading buffer [%2 (w/v) SDS, %5 (v/v) glycerol, %0.01 (w/v) bromophenol blue, %8 (w/v) DTT içinde hazırlandı ve 95 °C de beş dakika ısıtıldı. Eşit miktar (30 µg) ve eşit hacimli (20 µl) proteinler %10 ‘luk TGX stain-free fast cast acrylamid jel üzerine yüklendi ve 300 V’ da 20 dk SDS running buffer (2.4 mM Tris, 19.2 mM glycine, %0.01 (w/v) SDS) içerisinde elektroforez edildi.

Ayrılmış proteinler jelden Trans blot turbo (Bio-Rad) hızlı tranfer sistemi kullanılarak PVDF membrana transfer edildi. (Şekil 22) Membranlar %5’ lik PBS-Tween içerisinde hazırlanmış yağsız süt tozuyla çalkalayıcı (Stuart SSL3) üzerinde 1 saat oda sıcaklığında bloke edildi. Bloke edilen membranlar %5 ’lik süt tozu PBS-Tween içerisinde veri föyünde önerilen aralığa göre hazırlandı. Primer antikorlar (anti-ERK 1/2, anti-phospho- ERK 1/2 Antikor (Cell Signaling), anti-Bax, anti-Bcl-2, anti-β-actin (Santa Cruz), ile çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.

Membranlar 15 dk 25 ml PBS-Tween ve 3x 5 dk 25 ml PBS-Tween ile yıkandıktan sonra 1/10000 oranında PBS-Tween içinde hazırlanmış sekonder antikorlar (Sekonder antikor anti-mouse ve anti-rabbit (Abcam) ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

PBS-Tween yıkama işlemi tekrarlandı ve son olarak enhanced chemiluminiscent (ECL, Bio-Rad) metoduna göre görüntüleme cihazı ChemiDoc MP (Bio-Rad) kullanılarak görüntülendi. İnternal kontrol olarak β -actin antikorı kullanıldı. ImageJ yazılımı istatistiksel analizleri yapmak için kullanıldı.



Şekil 25. Western Blot Protein Ayırma, Transfer ve Görüntüleme aşamaları

3.6.2.6 Migrasyon protokolü

Hücreler 6-well plate' lere %70-80 konfluent olacak şekilde ekildi ve yaklaşık 24 saat monolayer konfluent olması için inkübe edildi. Tek tabaka halinde konfluent olan hücrelere kuyucuğun ortasına gelecek şekilde 200 µl' lik steril pipet ucuyla nazıkçe bir çizik atıldı. İkinci bir çizik ilk çizgiye dik olacak şekilde gerçekleştirdi ve her kuyucuğun ortasında + işareti oluşturuldu. Çizik işleminden sonra hücrelerin besiyeri aspire edildi ve hücreler iki kez PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra %5 FBS içeren besiyeri hücrelere eklendi. Uygulanacak maddeler belirlenen konsantrasyonları (Tablo 4) her bir kuyucuğa eklendi. Hücreler 48 saat inkübe edildi.

Fotoğraflar her zaman aynı alanı görüntüleyecek şekilde çizik atıldıktan hemen sonra t_0 ve 6 saat ve 24 saatlik inkübasyonlardan sonra Zeiss invert mikroskop kullanılarak çekildi. Her bir uygulama 3 tekrarlı olacak şekilde yapıldı. Analizler için Image J programı kullanıldı ve istatistiksel anlamlılığı, Graphpad Prism 7.0 yazılımında Student t-testi kullanılarak belirlendi.

Yara kapanma yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$[(\text{Wound area } t_0 - \text{Wound area } t) / \text{Wound area } t_0] \times 100$$

3.7. Araştırma Planı

Tablo 9. Araştırma Planı

İş Tanımı	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül
Literatür İncelemesi	X	x	x	x	x	x
Sarf malzemelerin alınması ve Hücre Kültürü Deney Setinin Kurulması		x				
U-118 MG, T98G ve U-87 MG hücrelerinin belirli konsantrasyonlardaki Bal, TMZ ve bal+ TMZ ile sitimulasyonu ve Hücre proliferasyon deneylerinin yapılması		x				

Hücre hatlarında migrasyon ve invazyon testlerinin gerçekleştirilmesi		x	x			
GBM hücrelerinin stimülasyonundan sonra balın sinyal yollarıyla olan etkileşiminin Western Blot yöntemi ile belirlenmesi			x	x		
qPCR ile ilgili Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi			x	x		
Veri Analizi ve Rapor Yazımı					x	x

4. BULGULAR

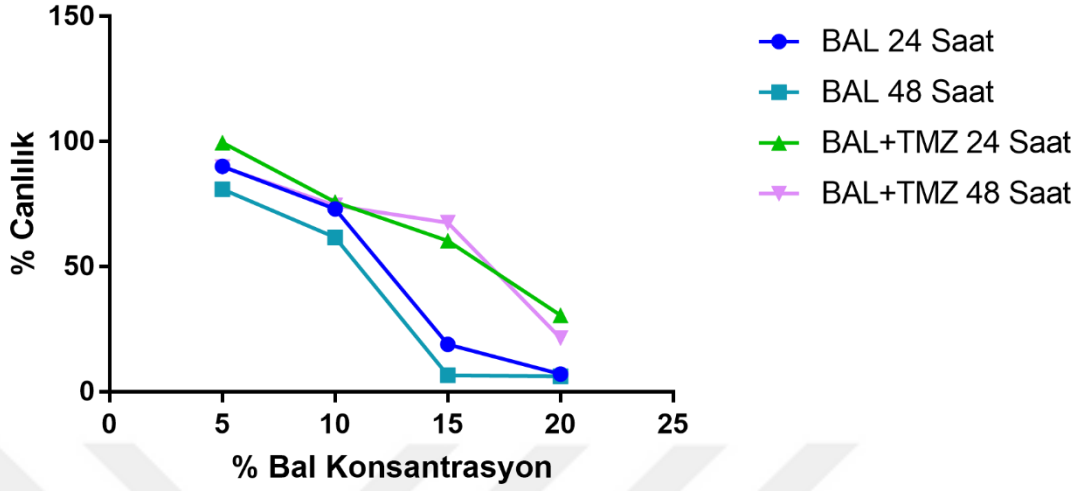
4.1. MTT Sitotoksisite Deney Bulguları

Çalışmamızda bal, TMZ, Bal+TMZ ve kontrol gruplarının U-118 MG, T98G ve U-87 MG hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. 96 well plaletere ekilen hücre hatlarına bal (%5, %10, %15, %20), TMZ (20 μ M), bal + TMZ (%5+ 20 μ M, %10 +20 μ M, %15+20 μ M, %20+20 μ M) ve kontrol gruplarının GBM hücre hatları üzerindeki etkisini saptamak için belirtilen konsantrasyon aralıklarında uygulama gerçekleştirildi. Bal ve bal+ TMZ kombinasyonunun sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlendi. Doz uygulamaları 3 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. MTT sonuçlarıyla elde edilen veriler Graphpad Prism 7.0 yazılımı aracılığı ile doza bağımlı hücre canlılığını gösteren grafiklerle değerlendirildi. gruplarının U-118 MG, T98G ve U-87 MG hücre hatlarının IC50 değerleri grafikler ile hesaplandı. Elde edilen sonuçlar, üç bağımsız deneyin standart sapma ortalaması ile açıklandı. Hücrelerin canlılık seviyelerinin istatistiksel anlamlılığı, Graphpad Prism 7.0 yazılımında Student t-testi kullanılarak belirlendi (90,91)

4.1.1. U-118 MG Hücre Hattının MTT Deneyi ve IC50 Değerinin Hesaplanması

MTT sonuçları Bal ve Bal+TMZ gruplarının U-118 MG hücrelerinde doza bağımlı olarak hücre canlılığında azalma olduğunu gösterdi. İnkübasyonun 24. saatinde %15 bal uygulanan grubun hücre canlılığı %18,95 ($\pm$ 1,644) belirlenirken, 48. Saatte %6,517 ($\pm$ 0,1996)'e düşmüştür. %15 Bal+TMZ konsantrasyonunun 24. saatinde ise canlılık %64,57 ($\pm$ 2,091) olarak belirlenirken, bu değer 48. saatte 60,3 ($\pm$ 0,5804) olarak hesaplanmıştır. Diğer Bal+TMZ dozlarındaki canlılık seviyeleri benzer olduğundan, 24-48 saat uygulamaları arasında anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (Şekil 26). IC50 değeri ise bu değerlere paralel olarak Şekil 27' de gösterilmiştir.

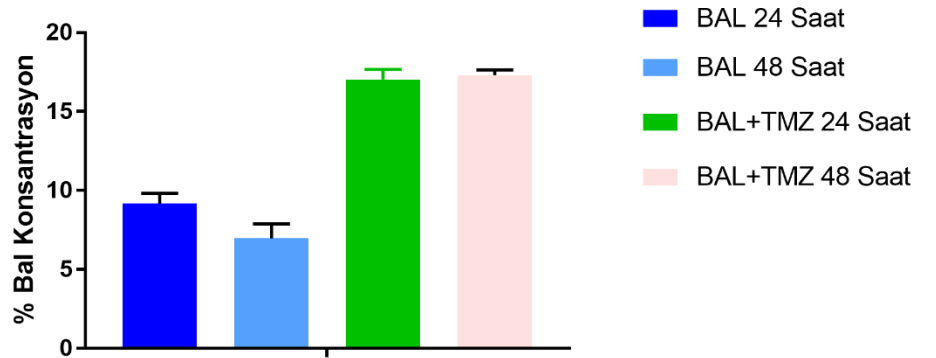
U118



Şekil 26. U-118 MG Hücre Hattının 24 ve 48 saate göre % hücre canlılığı, MTT sonucu

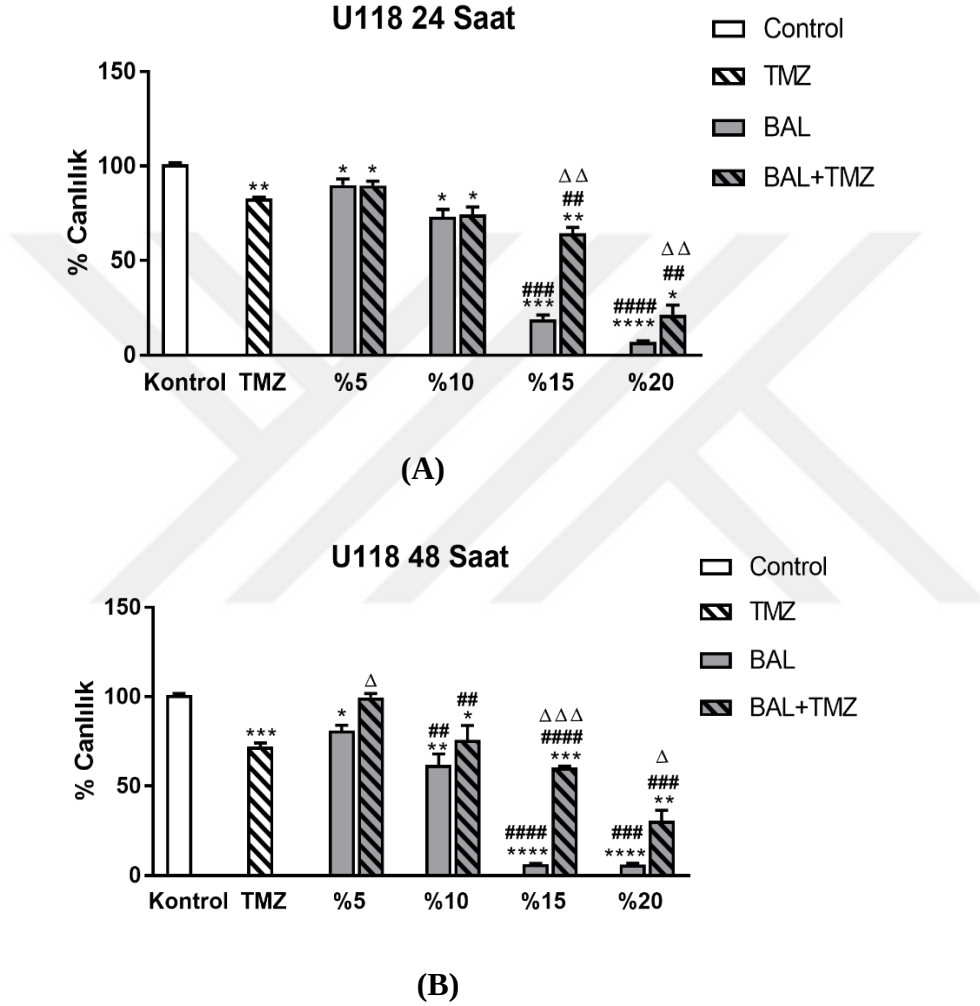
IC50 Bal 24 Saat : % $9,181 \pm 0,641$
 IC50 Bal 48 Saat : % $6,975 \pm 0,921$
 IC50 Bal+TMZ 24 Saat : % $17,047 \pm 0,624$
 IC50 Bal+TMZ 48 Saat : % $17,309 \pm 0,331$

24-48 Saat U118 IC50



Şekil 27. U-118-MG Hücre Hattının 24 ve 48 saate göre hesaplanmış IC50 Değerleri, (Ortalama $\pm$ standart sapma (n = 3) gösterildi.)

Balın kontrol ile karşılaştırılması sonucu hücre canlılığında doza ve zamana bağlı önemli düşüşler tespit edildi. Aynı zamanda sadece bal uygulanan gruplarda, 24 saat için %15, 48 saat için %10' dan başlayan konsantrasyonlar, U-118 MG hücrelerinde TMZ'den daha güçlü bir sitotoksik etki gösterdi (Şekil 28).



Şekil 28. Kontrol, Bal, TMZ ve Bal-TMZ grup dozlarıyla 24 (A) ve 48 (B) saat inkübasyondan sonraki U-118 MG 'nin % canlılığı. Kontrol – (1), Temozolomid (2- TMZ 20 μ M), Bal (%5, %10, %15, %20) Temozolomid ile uygulanan Bal (%5 Bal + TMZ 20 μ M, %10 Bal + TMZ 20 μ M, %15 Bal + TMZ 20 μ M, %20 Bal + TMZ 20 μ M) Sonuçlar, kontrol yüzdesi olarak sunuldu. (A), (B)/; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, vs. kontrol; #p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001, vs. TMZ; Δ p < 0.05, Δ Δ p < 0.01, Δ Δ Δ p < 0.001, vs. Bal; Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama $\pm$ standart sapma (n = 3) gösterildi.

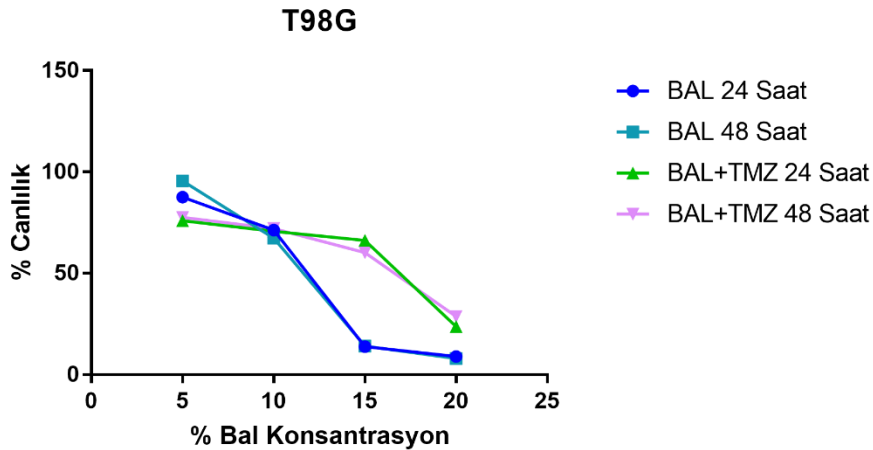
TMZ'nin sabit 20 µM dozu ve balın farklı konsantrasyonlarıyla kombine uygulanması farklı sonuçlar gösterdi. 24 saat için %15, 48 saat için %10 'dan başlayan Bal+TMZ kombinasyon dozları; tek başına TMZ'den anlamlı derecede sitotoksikti.

24 saat maruziyetten sonraki %5-%10 bal ve Bal+TMZ doz grupları, kontrolden anlamlı bir şekilde daha sitotoksik iken, tek başına TMZ ile kıyaslandığında anlamlı bir farklılık bulunmadı. 48. saatte ise balın %5 konsantrasyonu kontrole göre anlamlı bir şekilde daha sitotoksik iken, tek başına TMZ ile kıyaslandığında anlamlı bir farklılık bulunmadı. %15 ve %20 konsantrasyonlarında bal uygulaması, Bal+TMZ uygulamasından anlamlı derecede sitotoksik bulundu.

4.1.2. T98G Hücre Hattının MTT Deneyi ve IC50 Değerinin Hesaplanması

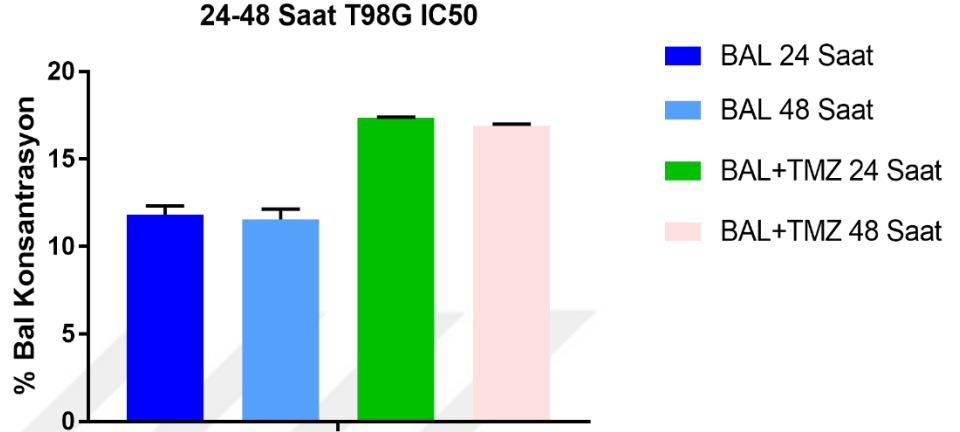
MTT sonuçları bal ve Bal+TMZ gruplarının T98G hücrelerinde doza bağımlı olarak sitotoksik etkisinin arttığını gösterdi.

İnkübasyonun 24. saatinde %10 bal uygulanan gruptaki hücre canlılığı %71,31 ($\pm 6,001$) belirlenirken, %20' de canlılık %13,76 ($\pm 0,338$) olarak dramatik bir şekilde azaldı Uygulamanın 48. saatinde ise bu canlılık seviyeleri anlamlı bir değişiklik göstermedi. %15 Bal+TMZ kombinasyonunun 24. saatinde canlılık % 66,21 ($\pm 1,235$) olarak hesaplanırken, %20 Bal+TMZ kombinasyonunda bu değer istatistiksel olarak anlamlı derecede %23,72 ($\pm 2,175$) düştüğü saptandı (Şekil 29). Uygulamanın 24. Saati ve 48. Saati arasında anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. IC50 değerleri bu değerlere paralel olarak Şekil 30' da gösterilmiştir.



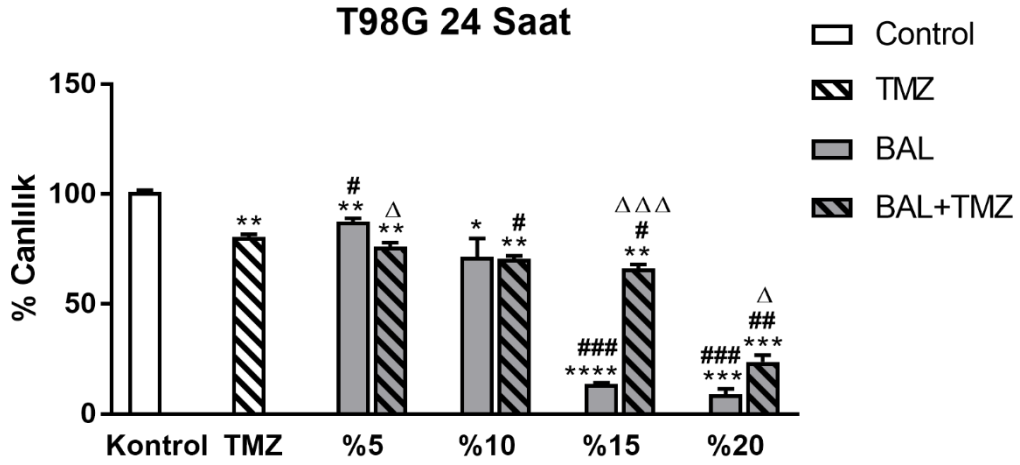
Şekil 29.T98G Hücre Hattının 24. ve 48. saate göre % hücre canlılığı, MTT sonucu

IC50 Bal 24 Saat : % 11,826 $\pm$ 0,499
IC50 Bal 48 Saat : % 11,561 $\pm$ 0,572
IC50 Bal+TMZ 24 Saat : % 17,360 $\pm$ 0,047
IC50 Bal+TMZ 48 Saat : % 16,902 $\pm$ 0,101

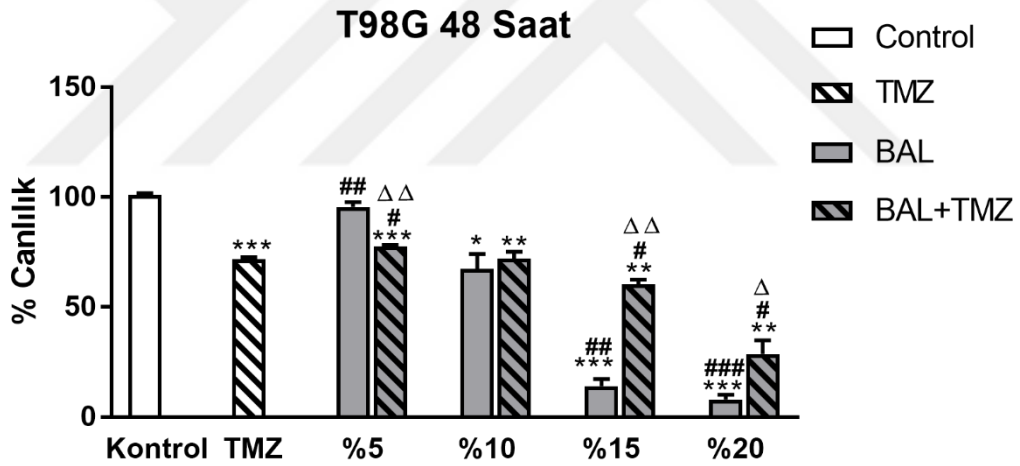


Şekil 30.T98G Hücre Hattının 24 ve 48 saate göre hesaplanmış IC50 Değerleri, (Ortalama $\pm$ standart sapma (n = 3) gösterildi.)

Bal ve Bal+TMZ kombinasyonlarının, kontrole kıyasla hücre canlılığını doza bağlı şekilde azalttığı gözlemlendi. Sadece bal uygulamalarında 24 ve 48. Saatlerde %15 ve %20 konsantrasyonları TMZ'ye kıyasla anlamlı derecede sitotoksik etki gösterirken Bal + TMZ kombinasyonları 24 ve 48. Saatlerde TMZ' ye kıyasla anlamlı bir farklılık göstermedi (Şekil 31).



(A)



(B)

Şekil 31. Kontrol, Bal, TMZ ve Bal-TMZ grup dozları ile 24 (A) ve 48 (B) inkübasyondan sonraki T98G ‘nin % canlılığı. Kontrol – (1), Temozolomid (2- TMZ 20 µM), Bal (%5, %10, %15, %20) Temozolomid ile uygulanan Bal (%5 Bal + TMZ 20 µM, %10 Bal + TMZ 20 µM, %15 Bal + TMZ 20 µM, %20 Bal + TMZ 20 µM) Sonuçlar, kontrol yüzdesi olarak sunuldu. (A)/(B); * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, vs. kontrol; #p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001, vs. TMZ; Δ p < 0.05, ΔΔ p < 0.01, ΔΔΔ p < 0.001, vs. Bal.; Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama ± standart sapma (n = 3) gösterildi.

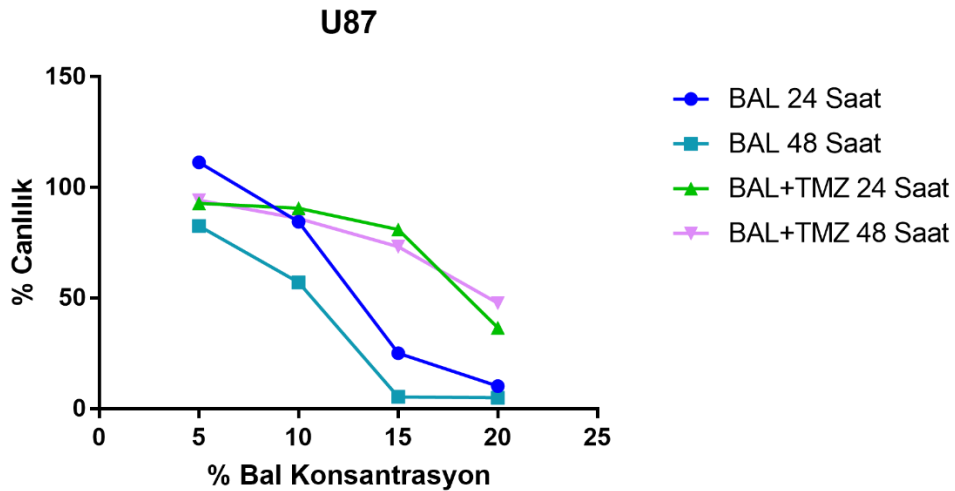
24 saatteki %5 Bal+TMZ kombinasyonunda TMZ'ye kıyasla değişiklik gözlemlenmemesine rağmen 48 saatte TMZ' ye göre az sitotoksik etki gösterdi. Bal+TMZ uygulanan gruplarda, 24 saat için %10 ve 48 saat için %15 'ten başlayan konsantrasyonlar, TMZ'ye kıyasla daha sitotoksik etki göstermiştir.

%15 ve %20 sadece bal uygulanan grupların 24 ve 48. saatindeki sitotoksosite, aynı dozlardaki bal-TMZ kombine uygulamasına oranla anlamlı derecede daha yüksekti. Ancak %5 Bal-TMZ kombine doz uygulaması, %5 bal grubundan daha sitotoksik etki gösterdi.

4.1.3. U-87 MG Hücre Hattının MTT Deneyi ve IC50 Değerinin Hesaplanması

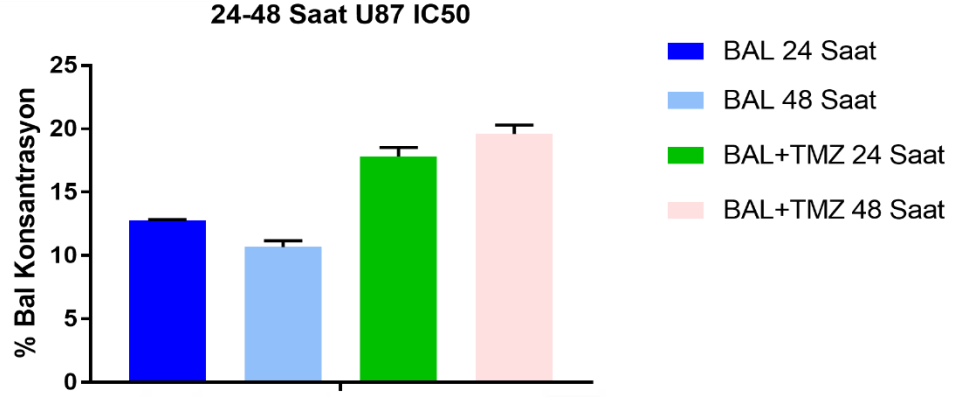
MTT sonuçları, U-87 MG hücrelerinde bal uygulamasının doza ve zamana bağımlı olarak sitotoksitesinin arttığını gösterdi. Bal ile muamelenin 24. saatinde %10 bal uygulanan hücrelerin canlılığı %79,38 ($\pm 2,153$) belirlenirken, 48. saatte canlılığın %57,05 ($\pm 3,737$)'e düştüğü gözlemlendi (Şekil 32).

%10 Bal+TMZ dozunun 24. saatinde ise canlılık %90,08 ($\pm 2,159$) olarak hesaplanırken 48. saatte %85,92 ($\pm 1,522$) olarak görüldü. Bu değerler Bal+TMZ uygulamalarında 24 ve 48. Saatler arasında anlamlı bir farklılık olmadığını gösterir. IC50 değerleri bu değerleri Şekil 33' de gösterilmiştir.



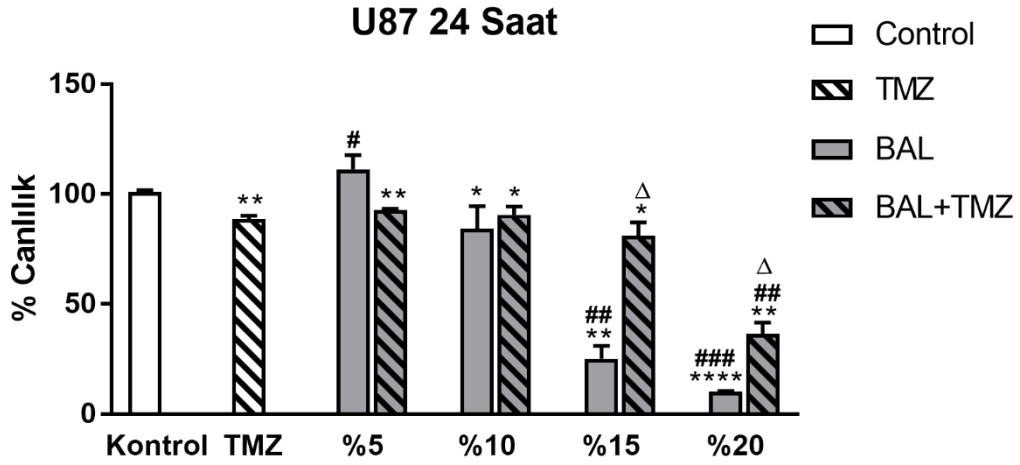
Şekil 32.U-87 MG Hücre Hattının 24. ve 48. saate göre % hücre canlılığı, MTT sonucu

IC50 Bal 24 Saat : % 12,782 $\pm$ 0,069
IC50 Bal 48 Saat : %10,684 $\pm$ 0,489
IC50 Bal+TMZ 24 Saat : % 17,824 $\pm$ 0,703
IC50 Bal+TMZ 48 Saat : % 19,094 $\pm$ 0,005

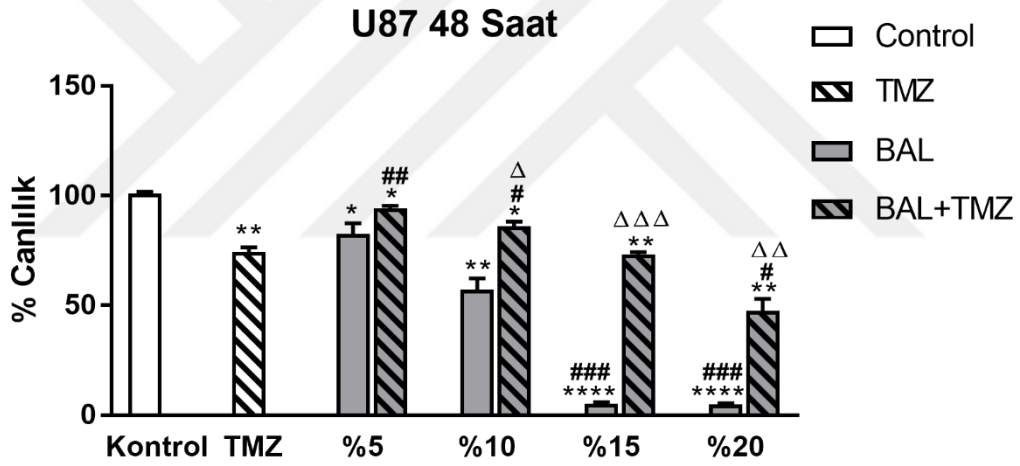


Şekil 33. U-87 MG Hücre Hattının 24 ve 48 saate göre hesaplanmış IC50 Değerleri, (Ortalama $\pm$ standart sapma (n = 3) gösterildi.)

Bal uygulamaları kontrole kıyasla hücre canlılığını doza bağlı şekilde azalttı. Bu uygulamalarda her iki zaman dilimi içinde sadece %15 ve %20 dozları TMZ'den anlamlı derecede daha sitotoksik etki gösterdi (Şekil 34).



(A)



(B)

Şekil 34. Kontrol, Bal, TMZ ve Bal-TMZ grup dozları ile 24 (A) ve 48 (B) inkübasyondan sonraki U-87 MG ‘nin % canlılığı. Kontrol – (1), Temozolomid (2-TMZ 20 μ M), Bal (%5, %10, %15, %20) Temozolomid ile uygulanan Bal (%5 Bal + TMZ 20 μ M, %10 Bal + TMZ 20 μ M, %15 Bal + TMZ 20 μ M, %20 Bal + TMZ 20 μ M) Sonuçlar, kontrol yüzdesi olarak sunuldu. (A)/(B); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ***, $p < 0.001$, vs. kontrol; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, vs. TMZ; ▲ $p < 0.05$, ▲▲ $p < 0.01$, ▲▲▲ $p < 0.001$, vs. Bal.

Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama $\pm$ standart sapma ($n = 3$) gösterildi.

24. ve 48. saatteki Bal+TMZ kombinasyonlarından sadece %20 dozunun TMZ'den daha sitotoksik olduğu saptandı. %5 bal dozunun 24. saatinde, TMZ'ye oranla hücre canlılığında anlamlı bir artış gözlemlendi. Bu durum aynı şekilde 48. saatin %5 ve %10 Bal-TMZ dozunda görüldü ve bu dozlar TMZ'ye kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir artışa neden oldu.

Bal ve Bal+TMZ kombine etkisi karşılaştırıldığında 24. saat için %15 ve %20, 48. saat için %10, %15 ve %20 bal dozları aynı konsantrasyonların bal-TMZ kombine doz uygulamasına oranla anlamlı derecede hücre canlılığını azalttı.

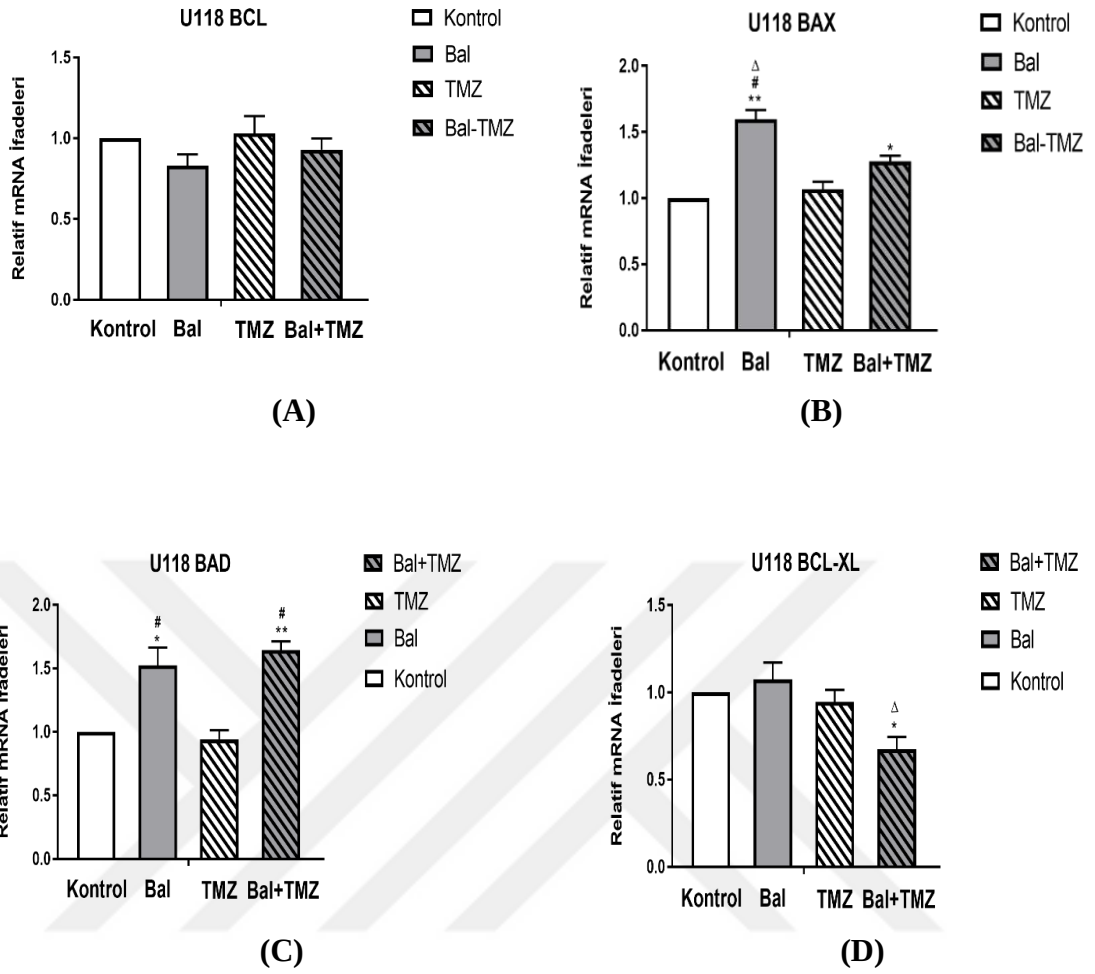
4.2. Bal ve Bal-TMZ kombine tedavisinin Apoptoz ilişkili genlerde mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırılması

Çalışmamızın RT-qPCR kısmında anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL) ve pro-apoptotik (Bad, Bax) gen ekspresyonlarının; Kontrol, Bal, TMZ ve Bal-TMZ grupları varlığındaki değişimleri araştırıldı.

4.2.1. Bal ve Bal+TMZ Uygulamasının U-118 MG Hücre Hattına Etkisi

Kontrol, Bal, TMZ ve Bal-TMZ grup dozlarıyla muamele edilen U-118 MG hücrelerinin Bcl-2, Bcl-xL, Bad ve Bax gen ekspresyon seviyeleri ve istatistiksel analizi Şekil-35'te gösterildi. Bcl-2 gen ekspresyonunun her üç grup için de istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği tespit edildi (Şekil 35.(A)). Bax gen ekspresyon seviyesinde ise; kontrole göre, bal ve Bal+TMZ gruplarında anlamlı bir artış saptandı. Gruplar arası karşılaştırmada balın Bal+TMZ grubuna oranla Bax ekspresyon seviyesini arttırdığı gözlemlendi. (Şekil 35.(B)).

Bad gen ekspresyonu kontrole göre, TMZ grubunda anlamlı bir değişiklik göstermezken; bal ve Bal+TMZ gruplarında hem kontrole hem TMZ'ye göre anlamlı derecede artış olduğu saptandı. Bcl-xL gen ekspresyonunda ise sadece Bal+ TMZ grubu, kontrole göre anlamlı bir azalma gösterdi.

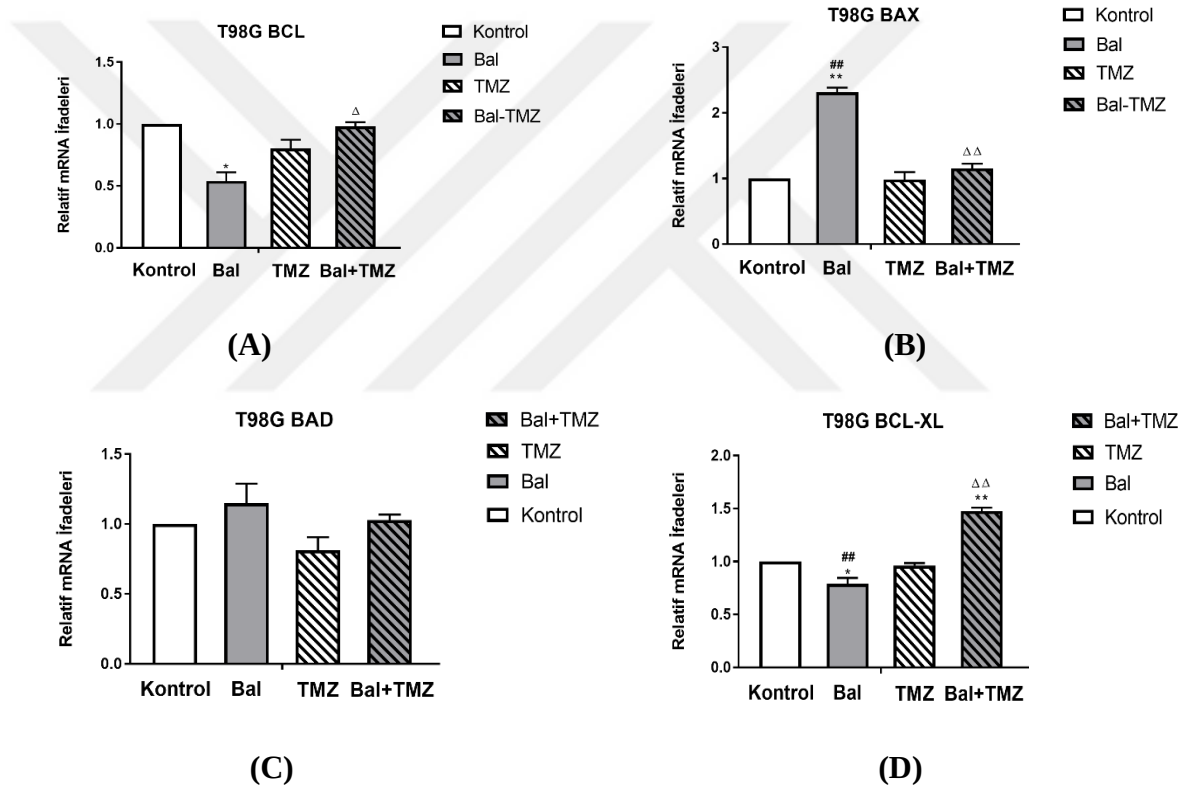


Şekil 35. Kontrol, Bal, TMZ ve Bal-TMZ grup dozları ile 48 saat boyunca tedavi edilen U-118 MG hücre serisi üzerinde anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL) ve pro-apoptotik (Bad, Bax) genlerinin RT-PCR analizi: (A) /Bcl-2, (B)/Bax, (C)/Bad ve (D)/Bcl-xL. A/B/C/D; * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, vs. kontrol; #p <0.05, ##p <0.01, ###p <0.001, vs. TMZ; ▲ p <0.05, ▲▲ p <0.01, ▲▲▲ p <0.001, vs. Bal; Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama ± standart sapma (n = 3) gösterildi.

4.2.2. Bal ve Bal-TMZ Uygulamasının T98G Hücre Hattına Etkisi

Kontrol, Bal, TMZ ve Bal-TMZ grup dozlarıyla grup dozlarıyla muamele edilen T98G hücrelerinin Bcl-2, Bcl-xL, Bad ve Bax gen ekspresyon seviyeleri ve istatistiksel analizi Şekil-36'de gösterildi.

Bcl-2 gen ekspresyonu, bal uygulanan grupta anlamlı bir şekilde azalırken Bax ekspresyonunun arttığı gözlemlendi. Baldaki Bax gen ekspresyonunun artışı, diğer gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı derecedeydi (Şekil 36 (A), (B))



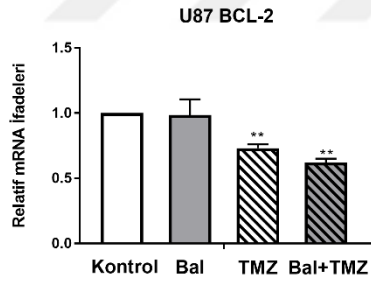
Şekil 36: Kontrol, Bal, TMZ ve Bal-TMZ grup dozları ile 48 saat boyunca tedavi edilen T98G hücre serisi üzerinde anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL) ve pro-apoptotik (Bad, Bax) genlerinin RT-PCR analizi:(A) /Bcl-2, (B)/Bax, (C)/Bad ve (D)/Bcl-xL. A/B/C/D; * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, vs. kontrol; #p <0.05, ##p <0.01, ###p <0.001, vs. TMZ; ▲ p <0.05, ▲▲ p <0.01, ▲▲▲ p <0.001, vs. Bal; Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama ± standart sapma (n = 3) gösterildi.

Bad gen ekspresyonunun her üç grup için de istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği tespit edildi (Şekil 36 (C)). Anti-apoptotik Bcl-xL gen ekspresyonunda ise kontrole oranla balda anlamlı bir azalma gözlenirken Bal+TMZ grubunda ekspresyon artışı gözlemlendi.

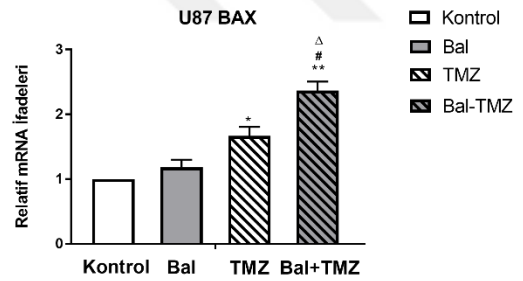
4.2.3. Bal ve Bal-TMZ Uygulamasının U-87 MG Hücre Hattına Etkisi

Kontrol, Bal, TMZ ve Bal-TMZ grup dozlarıyla muamele edilen T98G hücrelerinin Bcl-2, Bcl-xL, Bad ve Bax gen ekspresyon seviyeleri ve istatistiksel analizi Şekil-37’de gösterildi.

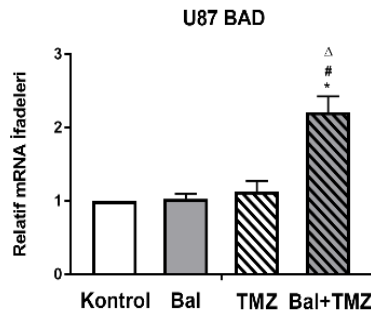
Anti apoptotik Bcl-2 gen ekspresyonu, sadece TMZ ve Bal+TMZ gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gösterdi (Şekil 37 (A)). Bu değerlere paralel olarak Bax gen ekspresyonu TMZ ve Bal+TMZ gruplarında kontrole oranla artış gösterdi. (Şekil 37 (B)).



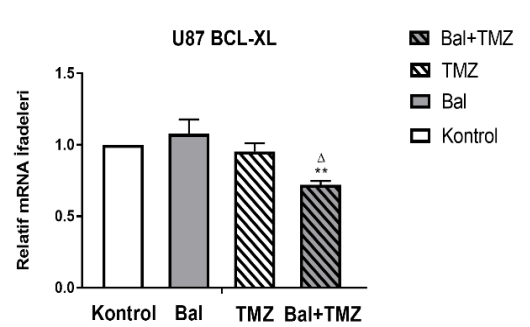
(A)



(B)



(C)



(D)

Şekil 37: Kontrol, Bal, TMZ ve Bal-TMZ grup dozları ile 48 saat boyunca tedavi edilen U-87 MG hücre serisi üzerinde anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL) ve pro-apoptotik (Bad, Bax) genlerinin RT-PCR analizi:(A) /Bcl-2, (B)/Bax, (C)/Bad ve (D) Bcl- xL. A/B/C/D; * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, vs. kontrol; #p <0.05, ##p <0.01, ###p <0.001, vs. TMZ; ▲ p <0.05, ▲▲ p <0.01, ▲▲▲ p <0.001, vs. Bal; Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama ± standart sapma (n = 3) gösterildi.

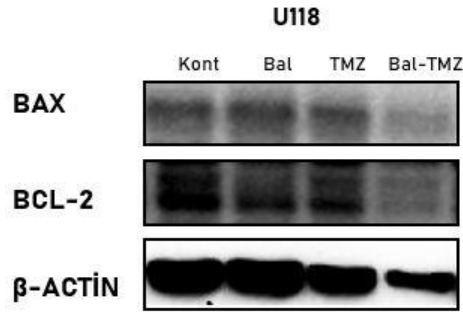
Bad gen ekspresyonunda ise sadece Bal+TMZ grubu hem kontrole hem de diğer gruplara göre anlamlı derecede bir artış gösterdi (Şekil 37 (C)). Bu grubun, pro-apoptotik Bcl-xL gen ekspresyon analizinde de kontrole ve bala göre anlamlı derecede azaldığı görüldü.

4.3. Bal ve Bal-TMZ kombine tedavisinin Apoptoz ilişkili genlerde protein ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırılması

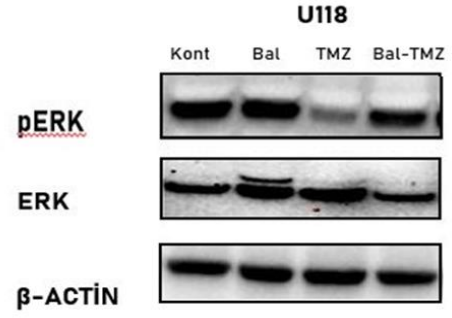
Çalışmamızda, kullandığımız Kontrol, Bal, TMZ ve Bal+TMZ grup dozlarıyla uygulamalarının ilgili sinyal yolları için işlevsel olup/olmadığını göstermek amacıyla GBM hücrelerindeki uyarıcı ve inhibe edici etkileri araştırıldı. ERK1/2, Bcl-2, ve Bax total protein ekspresyonları, bu proteinler için spesifik olan antikolar kullanılarak Western Blot yöntemiyle analiz edildi. Ayrıca tüm blotlarda yükleme kontrolü olarak B-Actin kullanıldı. ImageJ yazılım sürümü analizler için kullanıldı. Protein seviye farklılıklarının istatistiksel anlamlılığı, Graphpad Prism 7.0 yazılımında Student t-testi kullanılarak belirlendi. Veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi ve tüm deneyler üç kez tekrarlandı.

4.3.1. Bal ve Bal-TMZ Uygulamasının U-118 MG Hücre Hattına Etkisi

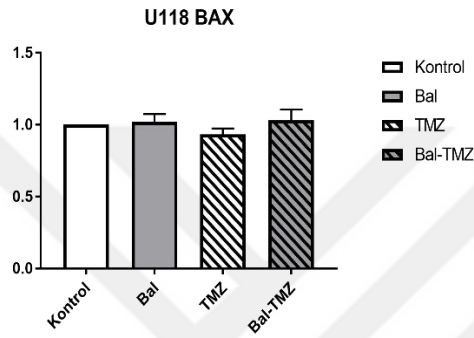
Kontrol, Bal, TMZ ve Bal-TMZ grup dozlarıyla muamele edilen U-118 MG hücrelerinin Bax, Bcl-2 ve PERK/ERK protein ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel analizi Şekil-38'te gösterildi. Bal eklenen grupta; U-118 MG hücrelerinde ERK1/2 ekspresyon düzeyinin gruplar arası benzer olduğu anti-ERK1/2 antikoru ile gösterildi. Bal ve TMZ uygulaması sonucu ERK1/2 fosforilasyonunun anlamlı derecede baskılandığı anti-phospho-ERK1/2 antikoru kullanılarak ortaya konuldu (Şekil 38 (D)).



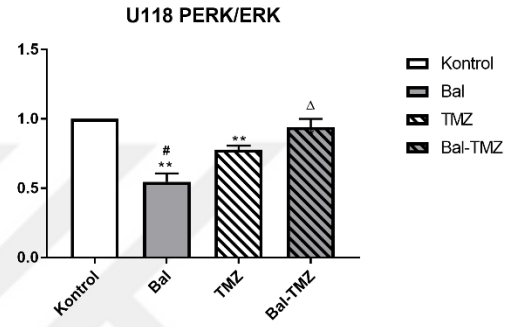
(A)



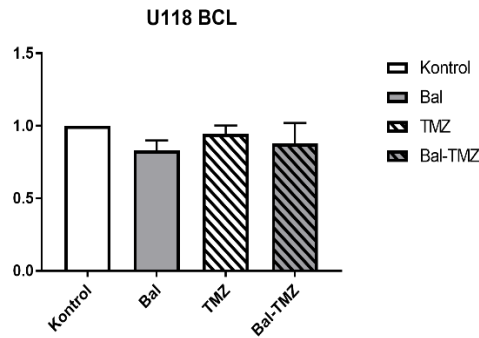
(B)



(C)



(D)



(E)

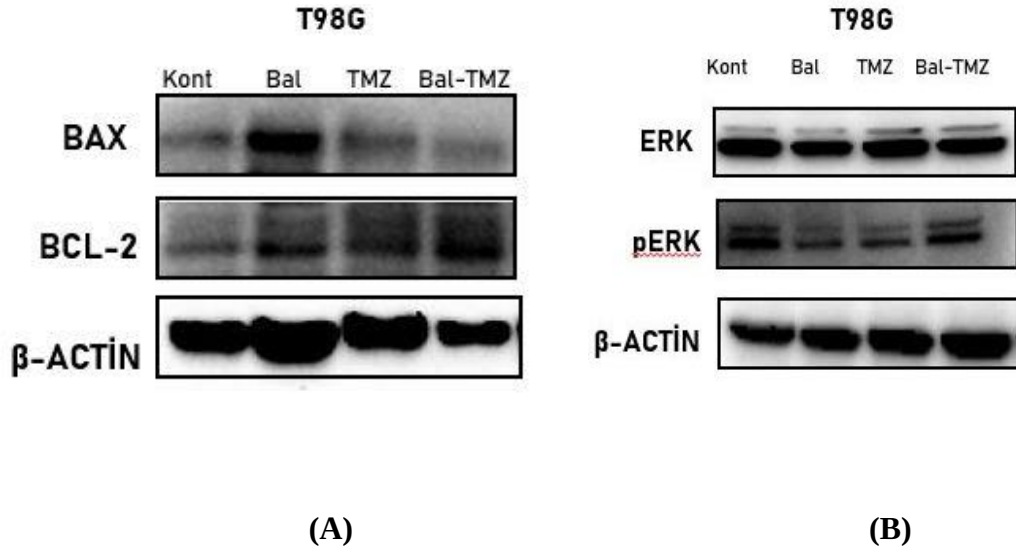
Şekil 38: Kontrol, Bal, TMZ ve Bal-TMZ grup dozları ile 48 saat boyunca tedavi edilen U-118 MG hücre serisi üzerindeki etkinin Bax, Bcl-2 ve ERK antikorlarıyla Western Blot yöntemiyle incelenmesi. PERK yoğunluğunun densitometri analizi, toplam ERK (D) seviyesine bir oran olarak sunuldu. C/D/E; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, vs. kontrol; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, vs. TMZ; ▲ $p < 0.05$, ▲▲ $p < 0.01$, ▲▲▲ $p < 0.001$, vs. Bal; tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama $\pm$ standart sapma ($n = 3$) gösterildi.

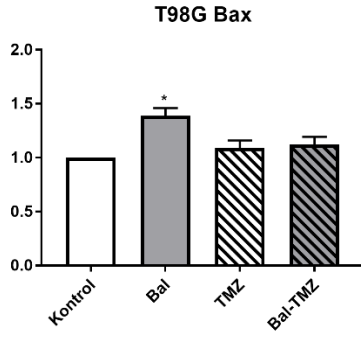
U-118 MG hücrelerinde Bcl-2, Bax protein ekspresyon düzeyinin gruplar arası benzer olduğu görülmüştür.

4.3.2. Bal ve Bal+TMZ Uygulamasının T98G Hücre Hattına Etkisi

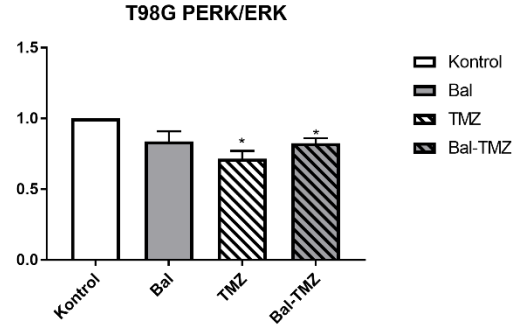
Kontrol, Bal, TMZ ve Bal-TMZ grup dozlarıyla muamele edilen T98G hücrelerinin Bax, Bcl-2 ve PERK/ERK protein ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel analizi Şekil-39'da gösterildi.

TMZ ve Bal+TMZ eklenen gruplarda; T98G hücrelerinde ERK1/2 ekspresyon seviyesinin gruplar arası benzer olduğu anti-ERK1/2 antikoruna ile gösterildi. TMZ ve Bal+TMZ uygulaması sonucu ERK1/2 fosforilasyonunun anlamlı derecede baskılandığı anti-phospho-ERK1/2 antikoruna kullanılarak ortaya konuldu (Şekil 39 (D)). Bal grubunda ERK1/2 fosforilasyonda azalma görüldü anca bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi.

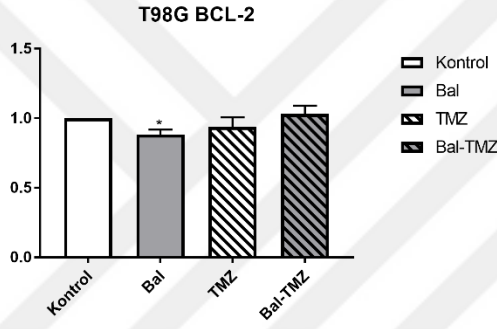




(C)



(D)



(E)

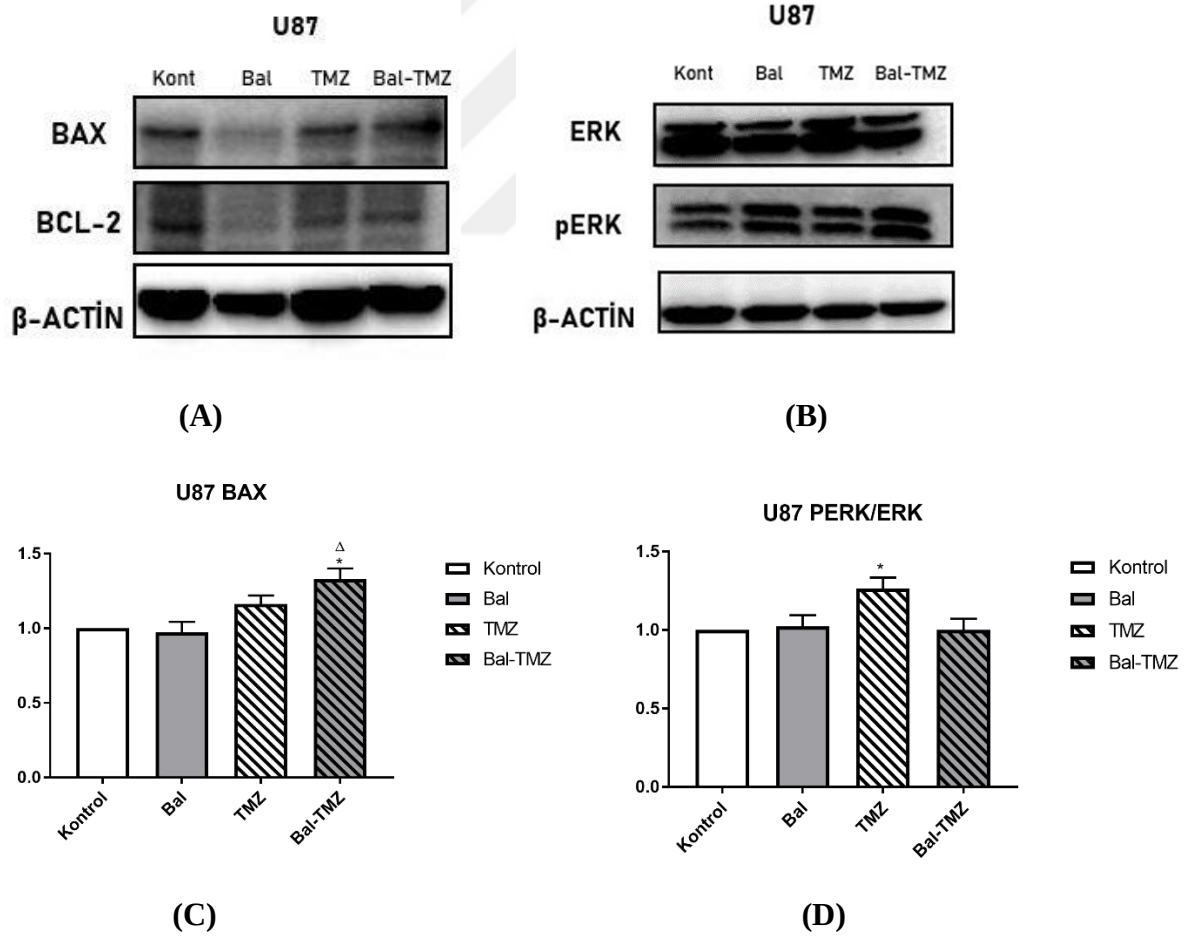
Şekil 39: Bal, TMZ ve Bal+ TMZ ile 48 saat boyunca tedavi edilen T98G hücre serisi üzerindeki etkinin Bax, Bcl-2 ve ERK antikorlarıyla Western Blot yöntemiyle incelenmesi. PERK yoğunluğunun densitometri analizi, toplam ERK (D) seviyesine bir oran olarak sunuldu. C/D/E; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ***, $p < 0.001$, vs. kontrol; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, vs. TMZ; ▲ $p < 0.05$, ▲▲ $p < 0.01$, ▲▲▲ $p < 0.001$, vs. Bal; tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama $\pm$ standart sapma ($n = 3$) gösterildi

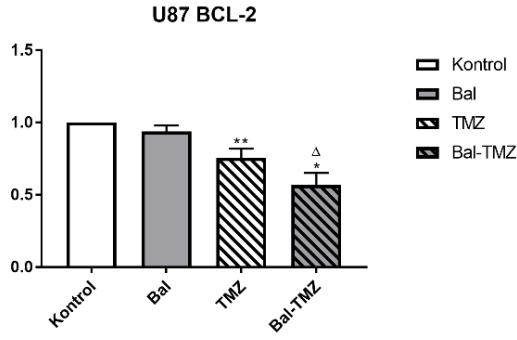
Bcl-2 ve Bax ekspresyon seviyesinin TMZ ve Bal+ TMZ grupları arası benzer olduğu buna bağlı olarak istatistiksel olarak anlam farkı olmadığı saptanmıştır. Öte yandan, bal uygulaması; Bax ekspresyon seviyesini anlamlı şekilde indüklerken ve Bcl-2'nin ekspresyon seviyesinde anlamlı derecede baskılamıştır (Şekil 39 (A), (C), (E)).

4.3.3. Bal ve Bal+TMZ Uygulamasının U-87 MG Hücre Hattına Etkisi

Kontrol, Bal, TMZ ve Bal-TMZ grup dozlarıyla muamele edilen U-87 MG hücrelerinin Bax, Bcl-2 ve PERK/ERK protein ekspresyon seviyesi ve istatistiksel analizi Şekil-40'ta gösterildi.

Bal ve Bal+TMZ uygulanan gruplarda; U-87 MG hücrelerinde ERK1/2 ekspresyon seviyelerinin gruplar arası benzer olduğu anti-ERK1/2 antikoruna ile gösterildi. Ancak TMZ uygulaması sonucu ERK1/2 fosforilasyonunun anlamlı derecede indüklendiği anti-phospho-ERK1/2 antikoruna kullanılarak ortaya konuldu (Şekil 40 (D)).





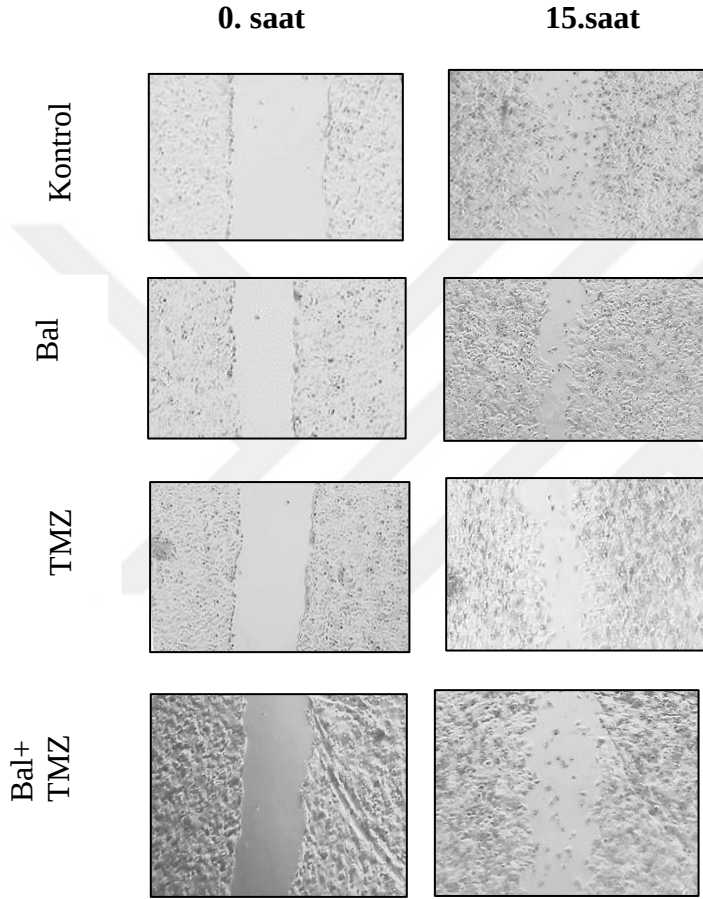
(E)

Şekil 40. Kontrol, Bal, TMZ ve Bal-TMZ grup dozları ile 48 saat boyunca tedavi edilen U-87 MG hücre serisi üzerindeki etkinin Bax, Bcl-2 ve ERK antikorlarıyla Western Blot yöntemiyle incelenmesi. PERK yoğunluğunun densitometri analizi, toplam ERK (D) seviyesine bir oran olarak sunuldu. C/D/E; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, vs. kontrol; #p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001, vs. TMZ; ▲ p < 0.05, ▲▲ p < 0.01, ▲▲▲ p < 0.001, vs. Bal; tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama ± standart sapma (n = 3) gösterildi

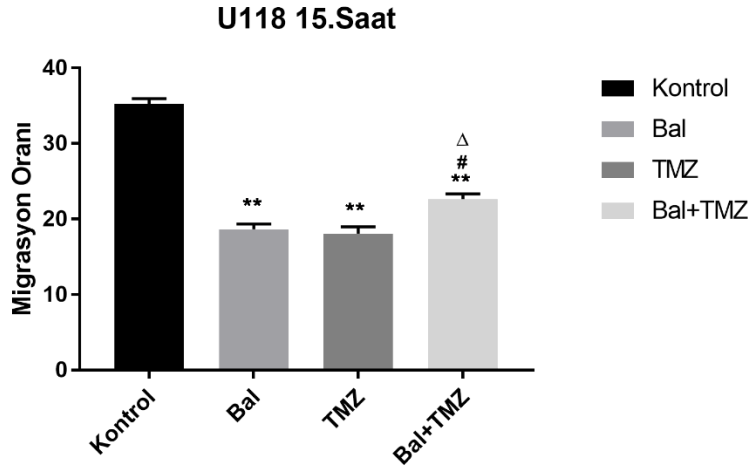
Bal+ TMZ uygulaması Bax protein ekspresyon seviyesini indüklerken, Bcl-2 protein seviyesini anlamlı derecede baskıladı. TMZ, bal gruplarında Bax protein ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak bir fark bulunmazken, TMZ grubu Bcl-2 ekspresyonunu anlamlı derecede baskıladı.

4.4 Bal ve Bal+TMZ Uygulamasının Migrasyon Etkisi

4.4.1. Bal ve Bal-TMZ Uygulamasının U-118 MG Hücrelerinde Migrasyona Etkisi



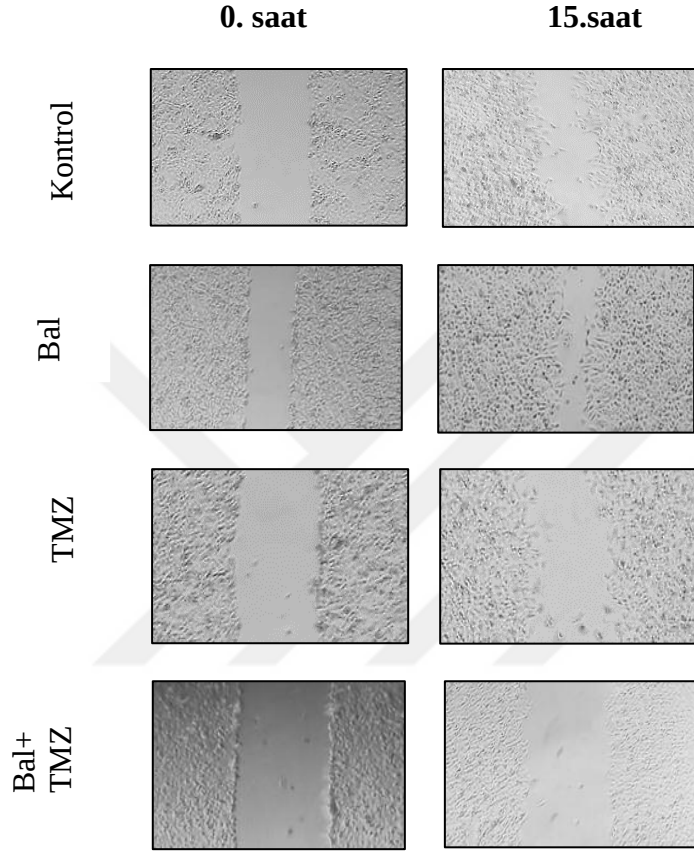
Şekil 41: Kontrol, Bal, TMZ ve Bal-TMZ grup dozlarıyla muamele edilen U-118 MG hücrelerinin migrasyon görüntüleri



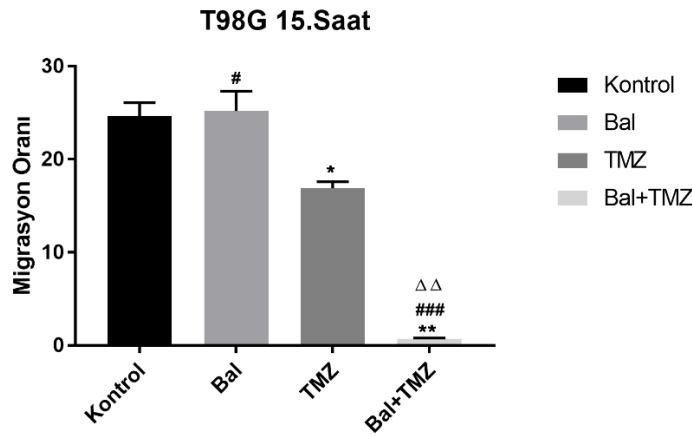
Şekil 42: Yara iyileşme protokolü ile hücre göçünün istatistiksel analizi B) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ***, $p < 0.001$, vs. kontrol; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, vs. TMZ; ▲ $p < 0.05$, ▲▲ $p < 0.01$, ▲▲▲ $p < 0.001$, vs. Bal; tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama $\pm$ standart sapma ($n = 3$) gösterildi.

U118-MG hücre hattında IC50 Bal+TMZ doz uygulaması, kontrole oranla migrasyonu inhibe etti. Bal ve TMZ doz uygulamaları ise hem kontrole hem Bal+TMZ doz uygulamalarına oranla daha güçlü migrasyonu azalttı.

4.4.2. Bal ve Bal-TMZ Uygulamasının T98G MG Hücrelerinde Migrasyona Etkisi



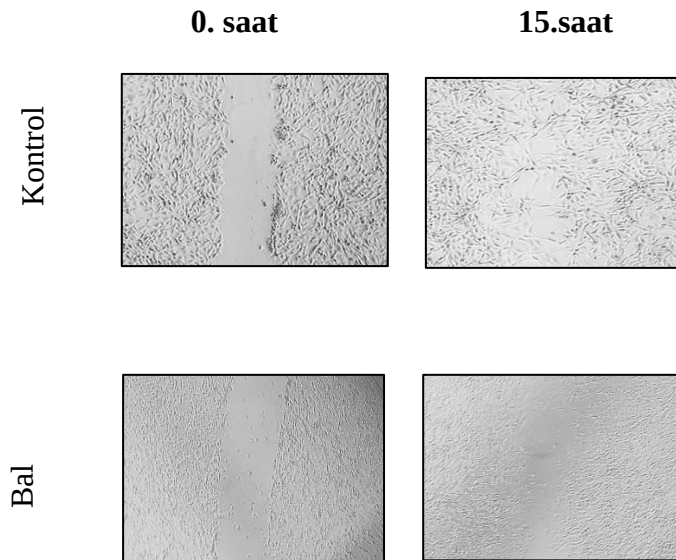
Şekil 43: Kontrol, Bal, TMZ ve Bal-TMZ grup dozlarıyla muamele edilen T98G hücrelerinin migrasyon görüntüleri

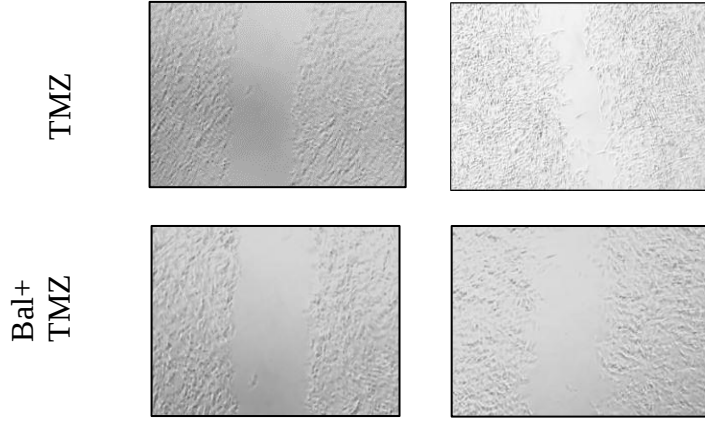


Şekil 44: Yara iyileşme protokolü ile hücre göçünün istatistiksel analizi (B) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ***, $p < 0.001$, vs. kontrol; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, vs. TMZ; ▲ $p < 0.05$, ▲▲ $p < 0.01$, ▲▲▲ $p < 0.001$, vs. Bal; tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama $\pm$ standart sapma ($n = 3$) gösterildi.

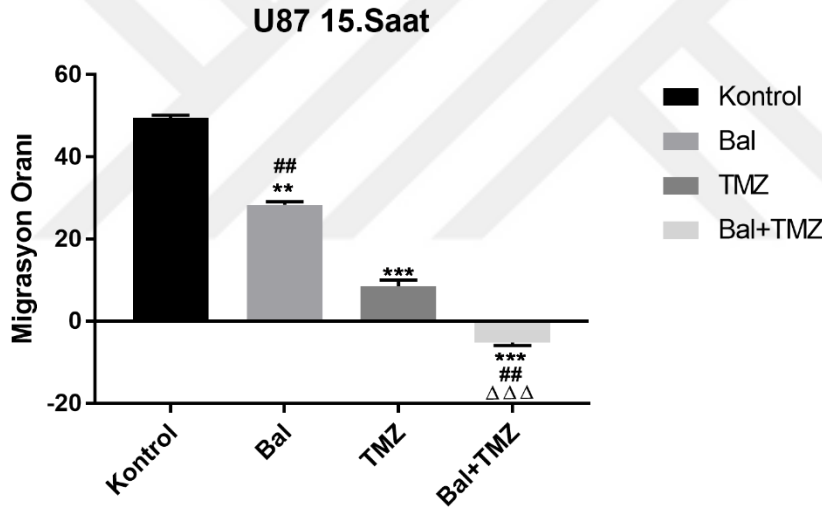
T98G hücre hattında IC50 Bal+TMZ uygulaması bütün gruplardan anlamlı derecede migrasyonu inhibe etti.

4.4.3. Bal ve Bal-TMZ Uygulamasının U-87 MG Hücrelerinde Migrasyona Etkisi





Şekil 45: Kontrol, Bal, TMZ ve Bal-TMZ grup dozlarıyla muamele edilen U-87 MG hücrelerinin migrasyon görüntüleri



Şekil 46: Yara iyileşme protokolü ile hücre göçünün istatistiksel analizi(B) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ***, $p < 0.001$, vs. kontrol; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, vs. TMZ; ▲ $p < 0.05$, ▲▲ $p < 0.01$, ▲▲▲ $p < 0.001$, vs. Bal; tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama ± standart sapma ($n = 3$) gösterildi.

Bal, TMZ ve Bal+TMZ doz uygulamalarının hepsi kontrole oranla U-87 MG hücrelerinde migrasyonu inhibe ederken, Bal+TMZ doz uygulaması baldan ve TMZ'den daha fazla migrasyonda azalma sağladı.

5.TARTIŞMA

GBM, yetişkinlerde primer astrositik beyin tümörlerinin en malign formudur. GBM' li hastalar genellikle cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi kombinasyonlarından oluşan ancak medyan sağkalım süresi bir yıldan az olan bir tedavi görürler. TMZ, GBM'li hastalar için en sık kullanılan ilaçtır ve bu ilacın prognozu iyileştirdiği kanıtlanmıştır (50). Son zamanlarda, kanser veya diğer kronik rahatsızlıklardan muzdarip birçok hasta, doğal ürünler ve alternatif tıbbın kullanımını araştırmaktadır. Bal, birçok eski kültür tarafından iyileştirici özellikleriyle tanınmıştır ve son zamanlarda bir anti-kanser ajanı olarak araştırılmıştır. Balların anti-kanser aktivitesi mesane kanseri Manitoba, renal hücreli karsinom, insan meme kanseri hücresi ve murin melanom hücresi için analiz edilmiştir (83).

Bu çalışmada, glioblastoma U-87 MG, U-118 MG, T98G hücre hatlarının büyümesi üzerine Bal ve Bal+ TMZ kombine uygulamasının etkisini araştırdık. Kemoterapi sırasında hastalar, doğal takviyelerle kendi kendine ilaç tedavisine ihtiyaç duyabilmektedir. Bazı diyet takviyelerinin antikanser ilaçlarının aktivitesini bozabileceğini gösteren veriler vardır. Bu nedenle, onkogenik hastalar tarafından kemoterapötiklerin ve halk ilaçları ürünlerinin aynı anda alınması tedavinin etkilerinin kötüleşmesine yol açabilir (92). Bu tür doğal bileşenler, hücre kültür (glioblastoma, nöronal hücreler) deneylerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (82,83,93). Çalışmamızın ana fikri, yaygın olarak tüketilen doğal bir ürün olan balın, glioma tedavisinde onaylanmış bir ilaç olan TMZ ile etkileşime girip girmediğini doğrulamak ve ek olarak balın Glioblastoma tedavisindeki rolünü aydınlatmaktır. Alkilleyici bir ajan olan TMZ, DNA'nın en kritik bölgesindeki guanin 'in O6 pozisyonuna metil grubu ekleyerek hasar oluşturur. Bu hasarlar kanser hücrelerinin G2/M hücre döngüsünün durdurulmasını sağlayarak apoptoza yol açar (61).

TMZ, hücre döngüsü aşamasından bağımsız bir şekilde hücreler üzerinde etki eder (62), DNA lezyonları üretir ve metil guanin (O6-MG) eklentisinin TMZ sitotoksitesinde önemli bir rol oynadığı düşünülür. TMZ'ye karşı glioblastoma multiform (GBM) direncinden sorumlu ana enzim, DNA'dan metil eklentilerini alan O6-MG-DNA metiltransferazdır (MGMT). MGMT gen promotörü GBM hücrelerinde tamamen metillenmesine ve proteinin saptanamayan düzeyde kalmasına rağmen bu hücreler TMZ'ye karşı kısmi bir direnç gösterir (49).

Bal ile tedavi edilen GBM hücre hatlarında, canlılığın konsantrasyona ve zamana bağlı azalma gösterdiğini bulduk. Benzer sonuçlar U-87 MG glioblastoma hücre hatlarında *Heterotrigna itama* sp. arı türünden elde edilen balın antiproliferatif özelliklerini araştıran Seerangan ve arkadaşları tarafından da elde edilmiştir (83). Araştırmalar, balın hücre döngüsü inhibisyonu ve apoptoz gibi mekanizmalarla kanser hücresi büyümesinde bir azalmaya neden olduğunu göstermektedir. Ancak balın etkileri hücre ve kanser tipine ayrıca balın üretildiği coğrafi bölgenin florası ve koşullarına göre değişiklik gösterebilir (94). 2013 yılında yapılan bir çalışmada; akasya balının etkisi büyük hücreli akciğer kanseri (NCI-H460) hücre hattında çalışılmış ve balın G0/G1 fazını durdurarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, ve ayrıca doza bağlı olarak p53 ve Bcl-2 ekspresyonunu baskıladığı bildirilmiştir (95). Maria ve arkadaşları propolisin etanolik özütünün, U-87 MG hücre proliferasyonunu engellemek için Temozolomid (TMZ) ile etkileşime girip girmediğini araştırmış ve sonuç olarak hem TMZ hem de propolis ile tedavi edilen U-87 MG hücrelerinin canlılığında konsantrasyona ve zamana bağlı azalma bulunduğunu bildirmişlerdir (90). Biz bu çalışmada, balın çeşitli mekanizmalarla U-87 MG, U-118 MG, T98G hücre canlılığını azalttığını gösterdik. U-118 MG, U-87 MG ve T98G hücre hatlarının üçünde de Bal+ TMZ gruplarında sadece doza bağımlı sitotoksik etki gözlemlendi. Ek olarak, bu üç hücre hattından U-118 MG ve U-87 MG bal grupları doza ve zamana bağlı azalma gösteren hücreler olarak belirlendi.

T98G ve U-87 MG hücre hatlarında %5 bal-TMZ dozu, %5 baldan daha öldürücü bir etki göstererek bal ve TMZ arasında sinerjik bir etki olabileceğini düşündürdü. Diğer dozların anlamlı verilerinde ise üç hücre hattında da balın toksisitesi bal+TMZ doz gruplarından daha toksik olarak tespit edildi.

Balın TMZ anti-kanser aktivitesinin etki mekanizmasının çok sayıda bileşeni olması nedeniyle bu sonucun mekanizmasının açıklanması zordur. Quercetin, CAPE veya chrysin gibi birçok aktif madde balın sitotoksik etkisine dahil olabilir ve bunların çoğu henüz tam olarak test edilmemiştir (96).

Balın çeşitli mekanizmalarla U-118 MG, T98G ve U-87 MG, hücre canlılığını azalttığını moleküler mekanizmalarla gösterdik. T98G hücre hattında, %11.57 (IC50) bal uygulanan dozda, pro-apoptotik Bax'ın mRNA ve protein ekspresyonunun artışı mitokondriyal yolak aracılığı ile apoptozu indükledi. Bu bulgu anti-apoptotik Bcl- 2 proteininin mRNA ve protein ekspresyonunun azalması ile desteklendi. Apoptozun mekanizmaları, enerjiye bağlı bir moleküler olaylar dizisini içeren oldukça karmaşık ve çok yönlüdür. Bugüne kadar araştırmalar, iki ana apoptotik yol olduğunu göstermektedir: dışsal veya ölüm reseptör yolu ve içsel veya mitokondriyal yol. Ancak, artık iki yolun bağlantılı olduğuna ve bir yoldaki moleküllerin diğerini etkileyebileceğine dair kanıtlar vardır. Araştırmacılar T-hücresi aracılı sitotoksiteyi ve hücrenin perforin-granzime bağlı olarak öldürülmesini içeren ek bir yol tanımlamışlardır. Perforin/granzim yolu, granzim B veya granzim A yoluyla apoptozu indükleyebilir (67).

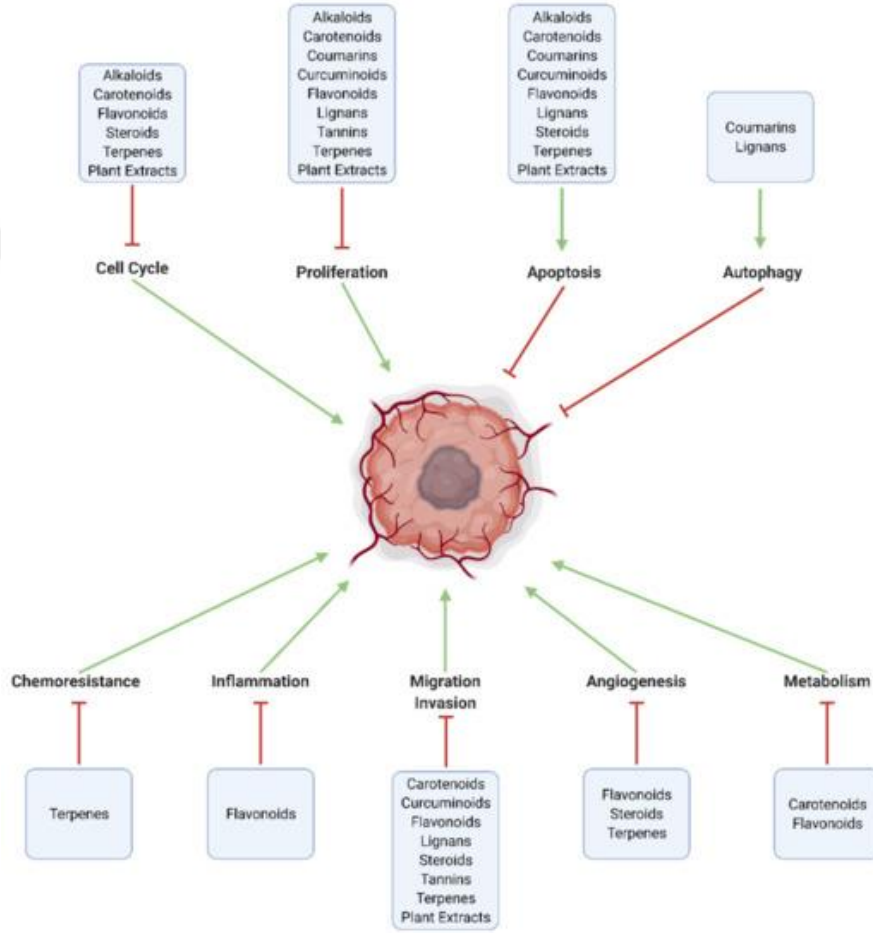
Ek olarak, %16.92 Bal+TMZ ve 20 µM TMZ doz uygulanan T98G hücrelerinde hayatta kalım ilişkili ERK sinyal yolağı baskılandı. RAF/MEK/ERK sinyal yolu hücre çoğalması, farklılaşması, hareketliliği ve hayatta kalması ile örneklediği gibi çeşitli hücresel süreçleri düzenler. Süreye, büyüklüğüne ve hücre altı lokalizasyonuna bağlı olarak, ERK aktivasyonu, çoğalma, göç, farklılaşma ve ölüm gibi çeşitli hücre yanıtlarını kontrol eder (97) ve düzensiz aktivitesi birçok kanserin ayırt edici özelliğidir. Bu nedenle, ERK yolunun bileşenleri ve düzenleyicileri, kanser için potansiyel terapötik hedefler olarak kabul edilir (98). Bunu yanında, anti-kanser özelliklerine sahip çeşitli bileşiklerin, ERK aktivasyonuna bağlı bir şekilde apoptozu indükleyebildiği de gösterilmiştir (99).

U-118 MG hücrelerinde %17,30 (IC50) Bal+TMZ uygulamasında pro-apoptotik Bax mRNA seviyesi ve protein ekspresyonunda artış gözlemlendi, ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu durum; balın, U-118 MG hücrelerindeki toksikliğini mitokondriyal yolak dışında bir yolağı etkileyerek sağlamasıyla açıklanabilir. Aynı zamanda %6,9 bal ve 20 µM TMZ uygulanan gruplarda ise hayatta kalım ilişkili ve GBM de ilaç direncinde önemli rol oynayan ERK sinyal yolağı baskılandı. U-87 MG hücrelerinde %19,09 Bal+TMZ uygulanan kombinasyon dozu sinerjistik etki göstererek pro-apoptotik Bax'ın hem mRNA hem de protein ekspresyonunda anlamlı derecede artış sağlarken anti-apoptotik Bcl-2' nin mRNA ve protein ifadesini sinerjistik olarak azalttı. U-87 MG hücrelerinin 20 µM TMZ dozunda ise ERK protein ekspresyonu anlamlı derecede artış gösterdi.

Migrasyon deneylerinde U-118 MG, T98G ve U-87 MG hücrelerinin hepsinde IC50 Bal+TMZ dozu uygulamaları hücre göçünü anlamlı derecede inhibe etmiştir. U-118 MG ve U-87 MG hücrelerinde ise sadece IC50 bal uygulamalarında kontrole oranla migrasyonda azalma göstermiştir. T98G ve U-118 MG hücre hatlarında Bal+TMZ doz uygulaması TMZ'den anlamlı derecede migrasyonu azaltmıştır. Borawska ve arkadaşları, arı ürünlerinin kullanımının U-87 MG'de TMZ'nin sitotoksik etkisini arttırdığı, ek olarak kanser invazyonunda önemli rol oynayan MMP-9 ve MMP-2 sekresyonunda önemli bir azalış gerçekleştirdiği göstermiştir. Bu deneylerde literatürle uyumlu olarak, U-87 MG hücrelerinin bal ve Bal+TMZ doz uygulamasında migrasyonun azaldığı saptanmıştır.

GBM tedavisinde kullanılan invaziv yöntemler, kemoterapi ilaçlarının yan etkileri ve direnç geliştirme potansiyelleri göz önüne alındığında alternatif doğal terapötik moleküllerin potansiyel kullanımı GBM tedavisinde değerlidir. Diyetle alınan doğal bileşikler bu konuda umut verici adaylar oluşturmaktadır; kanser karşıtı etkiler de dahil olmak üzere geniş kapsamlı biyolojik özelliklere sahiptirler (100). Bu bileşikler arasında Balda bulunan flavonoidler- polifenolik bitki ikincil metabolitleri- ilgi çekicidir. Flavonoidler kemosenstizasyon, metabolik modülasyon, metastatik inhibisyon ve apoptotik indüksiyon yoluyla anti-kanser etkileri gösterir. Kanıtlanmış aktivitelere dayanarak, balda da bulunan flavonoidler, terapötik anti-kanser ilaçlarına GBM hücre tepkilerini modüle etmede büyük potansiyele sahiptir (100).

Şekil 47 'de görüldüğü üzere doğal moleküllerin GBM üzerinden birçok rolü ve etkisi vardır. Bu nedenle, çok faktörlü aktivitenin kanser üzerinde daha karmaşık bir etki yaratabileceği düşünüldüğünden, balın tek tek bileşenleriyle çalışmak daha etkin sonuç verecektir.



Şekil 47: GBM' de doğal maddeler tarafından modüle edilen ana yollar. Etkili kemoterapötik maddeler, apoptoz ve otofaji yoluyla hücre ölümünü artırır ve proliferasyon, hücre döngüsü ilerlemesi, tümör metabolizması (Warburg etkisi), anjiyogenez, istila ve metastaz, nöro inflamasyon ve kemo rezistans ile ilgili hücre içi mekanizmaları inhibe eder (101).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

GBM, yüksek oranda tümorojenik, öldürücü ve hala tedavisi zor birincil beyin tümörleridir. Kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi ve cerrahi gibi kanser tedavileri yıllardır kanserin ilerlemesini baskılamak için kullanılsa da zayıf çözünürlük, düşük stabilite, sınırlı biyolojik dağılım, metabolizma, kemo rezistans ve toksisite nedeniyle kanser tedavisi hala sıklıkla başarısız olmaktadır. Bu nedenle, doğal bileşiklerin kanserdeki etkilerinin keşfedilmesi, doğal bileşikler dahil olmak üzere antikanser ajanların zayıf biyoyararlanımının üstesinden gelmek için nanoteknolojiler, GBM ve diğer sinir sistemi hastalıkları için alternatif veya etkili tedavilerin geliştirilmesine katkıda bulunur. Biyoaktif moleküller, anti-inflamatuar, anti-kanser ve serbest radikal süpürücü etkilere sahiptir. Kanserde etkinliği kanıtlanmış biyoaktif molekülleri nano taşıyıcı ilaç taşıyıcılarına entegre etmek, dağıtımı ve biyoyararlanımı arttırmak, yan etkileri en aza indirerek ve böylece hayatta kalanların yaşam kalitesini artırarak malign glioma hücrelerini yok etmek için şaşırtıcı bir teknik olabilir. Birçok doğal bileşik içeren balın antiproliferatif aktivitesi, GBM tedavisi için bir kemoterapötik ajan olarak yeni ve potansiyel bir aday sağlayabilir. Ek olarak Bal-TMZ kombinasyonunun çalışılan üç hücre tipinde de farklı patern göstermesine dayanarak, hücre spesifik tedaviler göz önüne alınabilmektedir. Bunun yanında bu üç hücre tipinin Bal-TMZ kombinasyonu ile anti apoptotik-pro apoptotik mRNA-protein profillerinin çıkarılması ileriki çalışmalar için ön bilgi sağlayacaktır. Balın içeriği polifenol, vitamin ve mineral gibi birçok madde içermektedir (76). Bir sonraki çalışmada bu baskılayıcı özelliği sergileyen alt bileşenler çalışılıp, mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sunmayı hedefliyoruz. Sonuç olarak doğal arı balını, beyin tümörleri için umut verici bir doğal bileşik kaynağı ve diyet ürünü olarak öneriyoruz.

7. Kaynakça;

1. Ludwig PE, Reddy V, Varacallo M. Neuroanatomy, Central Nervous System (CNS). StatPearls. 2022.
2. Brodal P. The Central Nervous System: Structure and Function. 4th editio. Oxford University Press; 2010. 165–180 p.
3. Lindsay M. Biga, Sierra Dawson, Amy Harwell, Robin Hopkins, Joel Kaufmann, Mike LeMaster, Philip Matern, Katie Morrison-Graham DQ& JR. Anatomy, Physiology, Chapter 12.1 Structure and Function of the Nervous. 2021.
4. Miller C. 8.2 Introduction to the Nervous System. In: Collins D, editor. Human Anatomy and Physiology. Thompson Rivers University; 2021.
5. Berne, Robert M.; Levy, Matthew N.; Koeppen, Bruce M. M.D.; Stanton BA. Physiology. 4th editio. Mosby Inc; 1998. 81–82 p.
6. Fields RD. Glial Cells. In: Encyclopedia of Human Behavior. Elsevier; 2012. p. 255–60.
7. Li H, Luo Y, Zhu L, Hua W, Zhang Y, Zhang H, et al. Glia-derived exosomes: Promising therapeutic targets. Life Sci. 2019 Dec;239:116951.
8. Bruce Blaus. Types of glia. Queensland Brain Institute. 2013.
9. Kimelberg HK, Nedergaard M. Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. Neurotherapeutics. 2010 Oct;7(4):338–53.
10. Guttenplan KA, Liddelow SA. Astrocytes and microglia: Models and tools. J Exp Med. 2019 Jan;216(1):71–83.
11. Glushakova OY, Glushakov A V., Mannix R, Miller ER, Valadka AB, Hayes RL. The Use of Blood-Based Biomarkers to Improve the Design of Clinical Trials of Traumatic Brain Injury. In: Handbook of Neuroemergency Clinical Trials. Elsevier; 2018. p. 139–66.

12. Nichols NR, Day JR, Laping NJ, Johnson SA, Finch CE. GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. *Neurobiol Aging*. 1993 Sep;14(5):421–9.
13. Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JHC, Wang F, et al. Uniquely Hominid Features of Adult Human Astrocytes. *J Neurosci*. 2009 Mar;29(10):3276–87.
14. Uwechue NM, Marx M-C, Chevy Q, Billups B. Activation of glutamate transport evokes rapid glutamine release from perisynaptic astrocytes. *J Physiol*. 2012 May;590(10):2317–31.
15. Tabata H. Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. *Front Neurosci*. 2015 Apr;9.
16. Vasile F, Dossi E, Rouach N. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct*. 2017 Jul;222(5):2017–29.
17. Bellot-Saez A, Kékesi O, Morley JW, Buskila Y. Astrocytic modulation of neuronal excitability through K⁺ spatial buffering. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017 Jun;77:87–97.
18. Andriezen WL. The Neuroglia Elements in the Human Brain. *BMJ*. 1893 Jul;2(1700):227–30.
19. Colombo J., Quinn B, Puissant V. Disruption of astroglial interlaminar processes in Alzheimer's disease. *Brain Res Bull*. 2002 Jun;58(2):235–42.
20. Falcone C, McBride EL, Hopkins WD, Hof PR, Manger PR, Sherwood CC, et al. Redefining varicose projection astrocytes in primates. *Glia*. 2022 Jan;70(1):145–54.
21. Phatnani H, Maniatis T. Astrocytes in Neurodegenerative Disease: Table 1. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Jun;7(6):a020628.
22. Pustchi SE, Avci NG, Akay YM, Akay M. Astrocytes Decreased the Sensitivity

- of Glioblastoma Cells to Temozolomide and Bay 11-7082. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep;21(19):7154.
23. Bergles DE, Richardson WD. Oligodendrocyte Development and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016 Feb;8(2):a020453.
 24. Koenig AM, Arvanitakis Z, Arnold SE. The Role of Insulin Resistance and Signaling in Dementia. In: *Type 2 Diabetes and Dementia.* Elsevier; 2018. p. 143–68.
 25. Waymire JC. Organization of Cell Types. In: *Cellular and Molecular Neurobiology.* McGovern Medical School; 2021.
 26. Fancy SPJ, Miller RH. Signaling pathways that regulate glial development and early migration—oligodendrocytes. In: *Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS.* Elsevier; 2020. p. 867–90.
 27. Brophy PP. Myelination: oligodendrocyte engaging with neurites. 2015.
 28. Davalos D, Akassoglou K, Cardona AE. Microglia. In: *Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS.* Elsevier; 2020. p. 995–1020.
 29. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol.* 2017 Apr;35(1):441–68.
 30. Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T. Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci.* 2013;7.
 31. Perry VH, Nicoll JAR, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.* 2010 Apr;6(4):193–201.
 32. MacDonald A, Lu B, Caron M, Caporicci-Dinucci N, Hatrock D, Petrecca K, et al. Single Cell Transcriptomics of Ependymal Cells Across Age, Region and Species Reveals Cilia-Related and Metal Ion Regulatory Roles as Major Conserved Ependymal Cell Functions. *Front Cell Neurosci.* 2021 Jul;15.

33. Ji W, Tang Z, Chen Y, Wang C, Tan C, Liao J, et al. Ependymal Cilia: Physiology and Role in Hydrocephalus. *Front Mol Neurosci*. 2022 Jul;15.
34. Wang X, Zhou Y, Wang J, Tseng I-C, Huang T, Zhao Y, et al. SNX27 Deletion Causes Hydrocephalus by Impairing Ependymal Cell Differentiation and Ciliogenesis. *J Neurosci*. 2016 Dec;36(50):12586–97.
35. Hesketh R. *Introduction to Cancer Biology: A Concise Journey from Epidemiology through Cell and Molecular Biology to Treatment and Prospects*. United States of America by Cambridge University Press, New York; 1–43 p.
36. Mun EJ, Babiker HM, Weinberg U, Kirson ED, Von Hoff DD. Tumor-Treating Fields: A Fourth Modality in Cancer Treatment. *Clin Cancer Res*. 2018 Jan;24(2):266–75.
37. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar;144(5):646–74.
38. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022 Jan;12(1):31–46.
39. McKinney PA. Brain tumours: incidence, survival, and aetiology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004 Jun;75(suppl_2):ii12–7.
40. Armstrong TS, Cohen MZ, Eriksen LR, Hickey J V. Symptom Clusters in Oncology Patients and Implications for Symptom Research in People with Primary Brain Tumors. *J Nurs Scholarsh*. 2004 Sep;36(3):197–206.
41. Shirahata M, Mishima K. [Metastatic Brain Tumors]. *Brain Nerve*. 2021 Jan;73(1):5–11.
42. Gritsch S, Batchelor TT, Gonzalez Castro LN. Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. *Cancer*. 2022 Jan;128(1):47–58.
43. Lapointe S, Perry A, Butowski NA. Primary brain tumours in adults. *Lancet*.

2018 Aug;392(10145):432–46.

44. Wen PY, Huse JT. 2016 World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors. *Contin Lifelong Learn Neurol*. 2017 Dec;23(6):1531–47.
45. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016 Jun;131(6):803–20.
46. Philips A, Henshaw DL, Lamburn G, O’Carroll MJ. Brain Tumours: Rise in Glioblastoma Multiforme Incidence in England 1995–2015 Suggests an Adverse Environmental or Lifestyle Factor. *J Environ Public Health*. 2018 Jun;2018:1–10.
47. Korja M, Raj R, Seppä K, Luostarinen T, Malila N, Seppälä M, et al. Glioblastoma survival is improving despite increasing incidence rates: a nationwide study between 2000 and 2013 in Finland. *Neuro Oncol*. 2019 Feb;21(3):370–9.
48. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006–2010. *Neuro Oncol*. 2013 Nov;15(suppl 2):ii1–56.
49. Delgado-López PD, Corrales-García EM. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. *Clin Transl Oncol*. 2016 Nov;18(11):1062–71.
50. Grochans S, Cybulska AM, Simińska D, Korbecki J, Kojder K, Chlubek D, et al. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme–Literature Review. *Cancers (Basel)*. 2022 May;14(10):2412.
51. Reiter-Brennan C, Semmler L, Klein A. The effects of 2-hydroxyglutarate on the tumorigenesis of gliomas. *Współczesna Onkol*. 2018;22(4):215–22.

52. Otero, José Javier ,Aline Paixao B. Precision Molecular Pathology of Glioblastoma. 1st Editio. Otero JJ, Becker AP, editors. Cham: Springer International Publishing; 2021. (Molecular Pathology Library).
53. Hochberg F, Toniolo P, Cole P. Nonoccupational risk indicators of glioblastoma in adults. *J Neurooncol*. 1990 Feb;8(1).
54. Kuan AS, Green J, Kitahara CM, De González AB, Key T, K. Reeves G, et al. Diet and risk of glioma: combined analysis of 3 large prospective studies in the UK and USA. *Neuro Oncol*. 2019 Jul;21(7):944–52.
55. Ogawa T, Sawada N, Iwasaki M, Budhathoki S, Hidaka A, Yamaji T, et al. Coffee and green tea consumption in relation to brain tumor risk in a Japanese population. *Int J Cancer*. 2016 Dec;139(12):2714–21.
56. Y. Shan F, Castro E, Sybenga A, Mukherjee S, Wu E, Fung K, et al. Molecular Diagnostics and Pathology of Major Brain Tumors. In: Primary Intracranial Tumors. IntechOpen; 2019.
57. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. 2009 May;10(5):459–66.
58. Prabhu VC. A Neurosurgeon Explains: Glioblastoma Multiforme. American Association of Neurological Surgeons. 2018.
59. Stevens MFG, Hickman JA, Langdon SP, Chubb D, Vickers L, Stone R, Baig G, Goddard C. Anti-tumour activity and pharmacokinetics in mice of 8-(carbamoyl)-3-methyl imidazo-[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045) - a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. *Cancer Res*. 1987;47:5846-58.
60. Nanegrungsunk D, Onchan W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Current evidence of temozolomide and bevacizumab in treatment of gliomas. *Neurol*

Res. 2015 Feb;37(2):167–83.

61. Silber JRR, Bobola MSS, Blank A, Chamberlain MCC. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: Promise and problems. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 2012 Aug;1826(1):71–82. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X12000029>
62. Michael JS, Lee B-S, Zhang M, Yu JS. Nanotechnology for treatment of glioblastoma multiforme. *J Transl Intern Med*. 2018 Oct;6(3):128–33.
63. Arora A, Somasundaram K. Glioblastoma vs temozolomide: can the red queen race be won? *Cancer Biol Ther*. 2019 Aug;20(8):1083–90.
64. Iranzo J, Martincorena I, Koonin E V. Cancer-mutation network and the number and specificity of driver mutations. *Proc Natl Acad Sci*. 2018 Jun;115(26).
65. Torgovnick A, Schumacher B. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Front Genet*. 2015 Apr;6.
66. Jain M V., Paczulla AM, Klonisch T, Dimgba FN, Rao SB, Roberg K, et al. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *J Cell Mol Med*. 2013 Jan;17(1):12–29.
67. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun;35(4):495–516.
68. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Mar;9(3):231–41.
69. Zhao M, Sun J, Zhao Z. Distinct and Competitive Regulatory Patterns of Tumor Suppressor Genes and Oncogenes in Ovarian Cancer. Semsey S, editor. *PLoS One*. 2012 Aug;7(8):e44175.
70. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol*. 2014 Apr;4.

71. Soleimani A, Rahmani F, Saeedi N, Ghaffarian R, Khazaei M, Ferns GA, et al. The potential role of regulatory microRNAs of RAS/MAPK signaling pathway in the pathogenesis of colorectal cancer. *J Cell Biochem.* 2019 Dec;120(12):19245–53.
72. Luke JJ, Ott PA, Shapiro GI. The Biology and Clinical Development of MEK Inhibitors for Cancer. *Drugs.* 2014 Dec;74(18):2111–28.
73. Tian T, Li X, Zhang J. mTOR Signaling in Cancer and mTOR Inhibitors in Solid Tumor Targeting Therapy. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb;20(3):755.
74. Vaghari-Tabari M, Ferns GA, Qujeq D, Andevvari AN, Sabahi Z, Moein S. Signaling, metabolism, and cancer: An important relationship for therapeutic intervention. *J Cell Physiol.* 2021 Aug;236(8):5512–32.
75. Bucekova M, Jardekova L, Juricova V, Bugarova V, Di Marco G, Gismondi A, et al. Antibacterial Activity of Different Blossom Honeys: New Findings. *Molecules.* 2019 Apr;24(8):1573.
76. Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. Honey for Nutrition and Health: A Review. *J Am Coll Nutr.* 2008 Dec;27(6):677–89.
77. Gheldof N, Engeseth NJ. Antioxidant Capacity of Honeys from Various Floral Sources Based on the Determination of Oxygen Radical Absorbance Capacity and Inhibition of in Vitro Lipoprotein Oxidation in Human Serum Samples. *J Agric Food Chem.* 2002 May;50(10):3050–5.
78. Shen S, Wang J, Chen X, Liu T, Ma Y, Wang L, et al. [Determination of flavonoids in honey by solid phase extraction coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method]. *Wei Sheng Yan Jiu.* 2020 Mar;49(2):259–66.
79. Al-Waili NS, Al-Waili FS, Akmal M, Ali A, Salom KY, Ghamdi AA Al. Effects of natural honey on polymicrobial culture of various human pathogens. *Arch Med Sci.* 2014;2:246–50.

80. Alvarez-Suarez J, Giampieri F, Battino M. Honey as a Source of Dietary Antioxidants: Structures, Bioavailability and Evidence of Protective Effects Against Human Chronic Diseases. *Curr Med Chem*. 2013 Jan;20(5):621–38.
81. Porcza L, Simms C, Chopra M. Honey and Cancer: Current Status and Future Directions. *Diseases*. 2016 Sep;4(4):30.
82. C.Yilmaz U, Bagca BGG, Karaca E, Durmaz A, Durmaz B, Aykut A, et al. Propolis Extract Regulates microRNA Expression in Glioblastoma and Brain Cancer Stem Cells. *Anticancer Agents Med Chem* [Internet]. 2022 Jan;22(2):378–89. Available from: <https://www.eurekaselect.com/193112/article>
83. Ahmad F, Seerangan P, Mustafa MZZ, Osman ZFF, Abdullah JMM, Idris Z. Anti-Cancer Properties of *Heterotrigma itama* sp. Honey Via Induction of Apoptosis in Malignant Glioma Cells. *Malaysian J Med Sci* [Internet]. 2019 May 31;26(2):30–9. Available from: http://www.mjms.usm.my/MJMS26022019/04MJMS26022019_OA1.pdf
84. Borawska MH, Markiewicz-Żukowska R, Naliwajko SK, Moskwa J, Bartosiuk E, Socha K, et al. The Interaction of Bee Products With Temozolomide in Human Diffuse Astrocytoma, Glioblastoma Multiforme and Astroglia Cell Lines. *Nutr Cancer*. 2014 Oct;66(7):1247–56.
85. Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1–21.
86. Mohd Salleh MA, Eshak Z, Wan Ismail WI. ACACIA HONEY INDUCES APOPTOSIS IN HUMAN BREAST ADENOCARCINOMA CELL LINES (MCF-7). *J Teknol*. 2017 Apr;79(4).
87. Samarghandian S, Nezhad M, Mohammadi G. Role of Caspases, Bax and Bcl-2 in Chrysin-Induced Apoptosis in the A549 Human Lung Adenocarcinoma Epithelial Cells. *Anticancer Agents Med Chem*. 2014 Jun;14(6):901–9.

88. Moskwa J, Borawska MH, Markiewicz-Zukowska R, Puscion-Jakubik A, Naliwajko SK, Socha K, et al. Polish Natural Bee Honeys Are Anti-Proliferative and Anti-Metastatic Agents in Human Glioblastoma multiforme U-87 MGMG Cell Line. Pizzo S V., editor. PLoS One. 2014 Mar;9(3):e90533.
89. Chen B, Chen C, Zhang Y, Xu J. Recent incidence trend of elderly patients with glioblastoma in the United States, 2000–2017. BMC Cancer. 2021 Dec;21(1):54.
90. Markiewicz-Żukowska R, Borawska MH, Fiedorowicz A, Naliwajko SK, Sawicka D, Car H. Propolis changes the anticancer activity of temozolomide in U-87 MGMG human glioblastoma cell line. BMC Complement Altern Med [Internet]. 2013 Dec 27;13(1):50. Available from: <https://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-13-50>
91. Borawska MH, Naliwajko SK, Moskwa J, Markiewicz-Żukowska R, Puścion-Jakubik A, Soroczyńska J. Anti-proliferative and anti-migration effects of Polish propolis combined with Hypericum perforatum L. on glioblastoma multiforme cell line U87MG. BMC Complement Altern Med [Internet]. 2016 Dec 20;16(1):367. Available from: <http://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-016-1351-2>
92. Cardoso SM, Ribeiro M, Ferreira IL, Cristina Rego A. Northeast Portuguese propolis protects against staurosporine and hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in primary cortical neurons. Food Chem Toxicol [Internet]. 2011 Nov;49(11):2862–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691511004145>
93. Chao R, Chow J-M, Hsieh Y-H, Chen C-K, Lee W-J, Hsieh F-K, et al. Tricetin suppresses the migration/invasion of human glioblastoma multiforme cells by inhibiting matrix metalloproteinase-2 through modulation of the expression and transcriptional activity of specificity protein 1. Expert Opin Ther Targets

- [Internet]. 2015 Oct 3;19(10):1293–306. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14728222.2015.1075509>
94. Qiao J, Chen L, Kong L, Dong J, Zhou Z, Zhang H. Characteristic Components and Authenticity Evaluation of Rape, Acacia, and Linden Honey. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2020 Sep 9;68(36):9776–88. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.0c05070>
 95. Aliyu M, Odunola OA, Farooq AD, Rasheed H, Mesaik AM, Choudhary MI, et al. Molecular Mechanism of Antiproliferation Potential of Acacia Honey on NCI-H460 Cell Line. *Nutr Cancer* [Internet]. 2013 Feb;65(2):296–304. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01635581.2013.756920>
 96. Jaganathan SK, Mandal M. Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2009;2009:1–13. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2009/830616/>
 97. Murphy LO, Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2006 May;31(5):268–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000406000867>
 98. Sugiura R, Satoh R, Takasaki T. ERK: A Double-Edged Sword in Cancer. ERK-Dependent Apoptosis as a Potential Therapeutic Strategy for Cancer. *Cells* [Internet]. 2021 Sep 22;10(10):2509. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/10/2509>
 99. Cagnol S, Chambard J-C. ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death - apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J* [Internet]. 2010 Jan;277(1):2–21. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-4658.2009.07366.x>
 100. Zhai K, Mazurakova A, Koklesova L, Kubatka P, Büsselberg D. Flavonoids Synergistically Enhance the Anti-Glioblastoma Effects of Chemotherapeutic Drugs. *Biomolecules* [Internet]. 2021 Dec 7;11(12):1841. Available from:

<https://www.mdpi.com/2218-273X/11/12/1841>

101. Zhai K, Siddiqui M, Abdellatif B, Liskova A, Kubatka P, Büsselberg D. Natural Compounds in Glioblastoma Therapy: Preclinical Insights, Mechanistic Pathways, and Outlook. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 May 12;13(10):2317. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/10/2317>



8. Ekler

Ek 3. Arbis Özgeçmiş



DENİZ EVRİM KAVAK

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

04 Mart 2021 - Şu Anda (1 yıl 6 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK (YL) (TEZLİ)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.61 / 4.0

12 Şubat 2021 - 02 Kasım 2022 (1 yıl 9 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA, TÜRKİYE
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ, TIBBİ BİYOLOJİ (YL) (TEZLİ)
Diploma Numarası: -

05 Ekim 2018 - 09 Temmuz 2020 (1 yıl 10 ay)
Ön Lisans, Açıköğretim, ANADOLU ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
AÇIKÖĞRETİM FAKÜLTESİ, TIBBİ DOKÜMANTASYON VE SEKRETERLİK PR.
(AÇIKÖĞRETİM)
Diploma Numarası: 2020-84269
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.61 / 4.0

28 Temmuz 2015 - 15 Haziran 2020 (4 yıl 11 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ,
TÜRKİYE
FEN VE EDEBİYAT FAKÜLTESİ, MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PR. (İNGİLİZCE)
Diploma Numarası: 2019/234678/0144
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.15 / 4.0

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: Orta)

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0

Ek 4. Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI
Sayın Prof.Dr. Sefa Kızıldağ

Araştırmansa ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	gonsek@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	7174-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☒ DOKTORA ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Glioblastoma (GBM) Hücre Hatları Üzerinde Multifloral Bal ve Temozolomid-Bal Kombinle Tedavisinin Sیتotoksik, Antimetastatik ve Apoptotik Potansiyelinin Araştırılması
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr. Sefa Kızıldağ Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2022/17-28	Tarih:11.05.2022			
	Prof.Dr. Sefa Kızıldağ'ın sorumlusu olduğu "Glioblastoma (GBM) Hücre Hatları Üzerinde Multifloral Bal ve Temozolomid-Bal Kombine Tedavinin Sitotoksik, Antimetastatik ve Apoptotik Potansiyelinin Araştırılması" isimli klinik araştırmaya ait araştırmacı dilekçesine ilişkin; Kurum izni ile ilgili bilgi edinilmiştir.				
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
ETİK KURUL ÜYELERİ					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlgili mi?	İmza
Prof.Dr.Mehmet Birhan Yılmaz (Başkan)	Kardiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr. Emel Çalkoğlu (Başkan Yardımcısı)	Preventif Onkoloji	Onkoloji Enstitüsü	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan	Moleküler Tıp	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr. Sana Aslısoy	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr. Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Fakültesi	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoglu Aksay	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr. Meryem Öztürk Haney	Halk Sağlığı Hemşireliği	Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr. Aylin Özgen Alpsoydan	Göğüs Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr. Aliye Akcalı	Periodontoloji	Diş Hekimliği Fakültesi	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr. Şule Özbilgin	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	DEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐ H ☒	
Dr.Öğr.Üyesi Özlenen Şimşek Papur	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Kadın	E ☐ H ☒	
Dr.Öğr.Üyesi Tolga Şahin	Spor Yönetim Bilimleri	Necat Hekim Spor Bilimleri Fakültesi	Erkek	E ☐ H ☒	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç Yüksel	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E ☐ H ☒	



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Prof.Dr. Sefa Kızıldağ

Araştırmaya ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
ÇAĞ ADRES	GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
TELEFON	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
FAKS	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
E-POSTA	0 232 412 22 43
	goaek@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	7174-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☒ DOKTORA ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Glioblastoma (GBM) Hücre Hatları Üzerinde Multifloral Bal ve Temozolomid-Bal Kombine Tedavisinin Sitotoksik, Antimetastatik ve Apoptotik Potansiyelinin Araştırılması
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr. Sefa Kızıldağ Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2022/16-13	Tarih:27.04.2022				
	Prof.Dr. Sefa Kızıldağ'ın sorumlusu olduğu "Glioblastoma (GBM) Hücre Hatları Üzerinde Multifloral Bal ve Temozolomid-Bal Kombine Tedavisinin Sitotoksik, Antimetastatik ve Apoptotik Potansiyelinin Araştırılması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın mevcut haliyle etik yönden uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir. Kurum izinin 3 ay içerisinde Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Mehmet Birhan Yılmaz (Başkan)	Kardiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Emel Çalıkoğlu (Başkan Yardımcısı)	Preventif Onkoloji	Onkoloji Enstitüsü	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan	Moleküler Tıp	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Suna Asilsoy	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoglu Aksay	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Meryem Öztürk Haney	Halk Sağlığı Hemşireliği	Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Aylin Özgen Alpaydın	Göğüs Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Aliye Akcalı	Periodontoloji	Diş Hekimliği Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Şule Özbilgin	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	DEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Dr.Öğr.Üyesi Özlenen Şimşek Papur	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Kadın	E ☐	H ☒	
Dr.Öğr.Üyesi Tolga Şahin	Spor Yönetim Bilimleri	Necat Hepkon Spor Bilimleri Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç Yüksel	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E ☐	H ☒	