



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GLİOBALASTOMA'DA MGMT İNHİBİTÖRÜ
DİETHYLAMİNE NONOATE'NİN EPİTELYAL
MEZENKİMAL GEÇİŞE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞUAYİP KILIÇ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet TAŞPINAR**

AKSARAY-2024



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GLİOBALASTOMA'DA MGMT İNHİBİTÖRÜ
DİETHYLAMİNE NONOATE'NİN EPİTELYAL
MEZENKİMAL GEÇİŞE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞUAYİP KILIÇ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet TAŞPINAR**

AKSARAY-2024

Aksaray Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Şuayip KILIÇ tarafından Savunulan “Glioblastoma’da MGMT İnhibitörü Diethylamine Nonoate’nin Epitelyal Mezenkimal Geçiş Etkisi” isimli çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Prof. Dr. Mehmet TAŞPINAR

Aksaray Üniversitesi Tıp Fakültesi

Onaylıyorum ☐

Onaylıyorum ☐

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Bülent TURHAN

Aksaray Üniversitesi Tıp Fakültesi

Onaylıyorum ☐

Onaylıyorum ☐

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe DURAN

KTO Karatay Üniversitesi Tıp Fakültesi

Onaylıyorum ☐

Onaylıyorum ☐

Bu tez, Aksaray Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Funda ÇETİNKAYA
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Glioblastoma’da MGMT İnhibitörü Diethylamine Nonoate’nin Epitelyal Mezenkimal Geçiş Etkisi başlıklı Yüksek Lisans tezinin içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel kurallara uygun olarak atıf yapıldığını bildiririm. Beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm

İmza

Şuayip KILIÇ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında katkılarını esirgemeyen, bilgi birikimini benimle paylaşan danışmanım saygıdeğer hocam Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet Taşpınar hocama,

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Aydın RÜSTEMOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Bülent TURHAN hocalarıma ve Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Filiz TAŞPINAR hocama, Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı Doç. Dr. Can ATEŞ hocama,

Her zaman varlıklarıyla bana destek, güç verip motive eden, yolumu aydınlatan ailemizin baştacısı olan annem Döndü KILIÇ ve bir dağ gibi arkamızda duran babam Mustafa KILIÇ'a teşekkürlerimi borç bilirim

Şuayip KILIÇ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser.....	2
1.1.1. Beyin tümörü	3
1.1.2. Glioblastoma.....	5
1.1.3. MGMT (O6-Metilguanin-DNA Metiltransferaz) nedir?	9
1.1.4. EMT Nedir?	13
1.1.5. Vimentin	18
1.2. Amaç	22
2. GEREÇ VE YÖNTEM	23
2.1. Gereç	23
2.1.1. Hücre serileri	23
2.1.2. Hücre kültüründe kullanılan sarf malzemeler	24
2.1.4. Total RNA izolasyonu	26
2.1.5. cDNA (Komplementer DNA) izolasyonu	26
2.1.6. Agaroz jel elektroforezi	27
2.1.7. Gerçek zamanlı PZR (RT-PZR)	27
2.1.8. Yara iyileşmesi deneyi.....	28
2.2. Çalışmada Kullanılan Alet/Makineler.....	28
2.3. Yöntem	29
2.3.1. Hücre kültürü	29
2.3.2. Sitotoksite testi.....	29
2.3.3. Hücre göçü deneyi (Yara iyileşmesi, Wound healing).....	31
2.3.4. RNA izolasyonu.....	31
2.3.5. RNA'nın kalitatif değerlendirilmesi	32
2.3.6. cDNA izolasyonu.....	32

2.3.7. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time-PZR; RT-PZR)	33
2.4. İstatistiksel Analiz	36
3. BULGULAR	37
3.1. DEA/NO Sitotoksitesi	37
3.2. Yara İyileşmesi Deneyi	38
3.3. Gen Ekspresyon Analizi	39
3.4. Epitelyal Özellik İçin Gen Ekspresyonu	39
3.5. Mezenkimal Özellik İçin Gen Ekspresyonu	40
4. TARTIŞMA	42
KAYNAKÇA	45

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GLİOBALASTOMA'DA MGMT İNHİBİTÖRÜ DIETHYLAMİNE NONOATE'NİN EPİTELYAL MEZENKİMAL GEÇİŞE ETKİSİ

Şuayip KILIÇ

Aksaray Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet TAŞPINAR

ÖZET

Glioblastoma, en agresif ve en malin (grade IV) beyin tümörüdür. Glioblastoma, mevcut terapötik yaklaşımlara direnç gösterir ve bu nedenle kötü bir prognoza sahiptir. Glioblastomada kemoterapötik direncin en büyük nedeni MGMT proteinidir. MGMT inhibisyonu ile TMZ temelli alkilasyon tedavisinin başarısının artması beklenmektedir. Dietilamin NONOate (DEA/NO), nitrik oksit (NO) salınımı yapabilen bir MGMT inhibitörüdür. NO'nun, glioma hücrelerinin büyüme, invazyon, farklılaşma ve terapötik direnci etkileyebileceği belirtilmektedir. Glioblastomada terapötik dirence neden olan hücresel olaylardan biri de Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT)'tir. DEA/NO'nun kanser hücrelerinde EMT yolağı üzerine etkisi bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında DEA/NO'nun glioblastoma hücrelerinde EMT sürecinde rol alan genlerin ekspresyonuna olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla T98G ve U-87 MG hücre serisi kullanılmıştır. DEA/NO'nun glioma hücrelerindeki sitotoksitesi MTT ile belirlendikten sonra hücre göçüne etkisi yara iyileşmesi testi ile belirlenmiştir. DEA/NO'nun EMT yolağında yer alan genlerin ekspresyonlarına olan etkisi qRT-PZR ile saptanmıştır. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi amacıyla IBM SPSS Versiyon 20.0. kullanılmıştır. Sitotoksite sonuçlarına göre U-87 MG hücre serisi T98G'ye göre daha duyarlı bulunmuştur. U87-MG hücre serisinde DEA/NO'nun hücre göçüne etkisi T98G hücre serisine göre daha yüksek bulunmuştur. DEA/NO, T98G ve U-87 MG hücre serisinde EMT genlerinin ekspresyonunu istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde azaltmıştır ($p<0.05$). DEA/NO glioma hücrelerinde EMT'yi indüklememektedir ve EMT genlerinin ekspresyonunu azaltmasıyla kemoterapötik ilaçlarla birlikte kullanım potansiyeline sahip olabilir. Çalışmamız, DEA/NO'nun EMT sürecini tetikleyen genlerin ekspresyonlarına olan etkisini araştıran literatürdeki ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Dietilamin NONOate, Epitelyal-Mezenkimal Geçiş, Hücre Kültürü, Glioblastoma

Haziran, 2024; 50 sayfa

M.Sc. THESIS

EFFECT OF THE MGMT INHIBITOR DIETHYLAMINE NONOATE ON EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION IN GLIOBLASTOMA

Şuayip KILIÇ

**Aksaray University
Graduate School of Health Sciences
Department of Medical Biology**

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet TAŞPINAR

ABSTRACT

Glioblastoma is the most aggressive and malignant (grade IV) brain tumor. Glioblastoma shows resistance to current therapeutic approaches, resulting in a poor prognosis. The primary cause of chemotherapeutic resistance in glioblastoma is the MGMT protein. Enhancement of the success of TMZ-based alkylating therapy is expected with MGMT inhibition. Diethylenetriamine NONOate (DEA/NO) is an MGMT inhibitor capable of releasing nitric oxide (NO). It is indicated that NO may affect the growth, invasion, differentiation, and therapeutic resistance of glioma cells. One of the cellular events contributing to therapeutic resistance in glioblastoma is Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT). The effect of DEA/NO on the EMT pathway in cancer cells is unknown. This thesis aims to investigate the effect of DEA/NO on the expression of genes involved in the EMT process in glioblastoma cells. For this purpose, T98G and U-87 MG cell lines were used. The cytotoxicity of DEA/NO in glioma cells was determined using MTT assay, and its effect on cell migration was determined using wound healing assay. The effect of DEA/NO on the expression of genes involved in the EMT pathway was detected by qRT-PCR. IBM SPSS Version 20.0 was used for data analysis. According to the cytotoxicity results, the U-87 MG cell line was found to be more sensitive than T98G. The effect of DEA/NO on cell migration was found to be higher in the U87-MG cell line compared to the T98G cell line. DEA/NO significantly reduced the expression of EMT genes in both T98G and U-87 MG cell lines ($p<0.05$). DEA/NO does not induce EMT in glioma cells and may have the potential to be used in combination with chemotherapeutic drugs by reducing the expression of EMT genes. Our study is the first in the literature to investigate the effects of DEA/NO on the expression of genes involved in the EMT process.

Keywords: Diethylenetriamine NONOate, Epithelial-to-Mesenchymal Transition, Cell Culture, Glioblastoma

June, 2024; 50 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Beyin tümörü	3
Şekil 1.2 Diethylamine nonoate kimyasal formülü	13
Şekil 1.3 EMT	14
Şekil 2.1 Hücrelerden elde edilen total RNA'nın görüntüsü	32
Şekil 2.2 Vimentin geninin ekspresyon eğrisi ve amplifikasyon erime eğrisi (melting curve)	35
Şekil 2.3 ACTB geninin ekspresyon eğrisi ve amplifikasyon erime eğrisi (melting curve)	35
Şekil 3.1 DEA/NO'nun T98G ve U-87 MG hücre serisindeki sitotoksitesitesi	37
Şekil 3.2 Hücrelerde oluşturulan yaranın hücre göçü ile kapanmasının mikroskop ile takibi ve yara büyüklüğünün piksel cinsinden ölçümü.	38
Şekil 3.3 DEA/NO'nun T98G ve U-87 MG hücrelerinde hücre göçüne etkisi.	39
Şekil 3.4 E-kaderin genindeki ekspresyon değişikliği.	40
Şekil 3.5 T98G ve U-87 mg hücrelerinde EMT genlerinin ekspresyon değişimleri.	41

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1. Çalışma Kapsamında Kullanılan Hücre Serileri	23
Tablo 2.2. Hücre Kültürü Uygulamalarında Kullanılan Molekül Ve Gereçler	24
Tablo 2.3 Mtt Testinde Kullanılan Gereçler.....	25
Tablo 2.4 Total Rna İzolasyonu İçin Gerekli Malzemeler.....	26
Tablo 2.5 Cdna Eldesi İçin İçin Gerekli Malzemeler	26
Tablo 2.6 Agaroz Jel Elektrophorezi İçin Gerekli Malzemeler	27
Tablo 2.7 Rt-Pzr İçin Gerekli Malzemeler	27
Tablo 2.8 Yara İyileşme Deneyi İçin Gerekli Malzemeler	28
Tablo 2.9 Çalışma Kapsamında Kullanılan Alet/Makineler	28
Tablo 2.10 Cdna Sentez Protokolüne Göre Reaksiyon İçerikleri.....	33
Tablo 2 11 Rt-Pzr İçin Reaksiyon İçeriği.....	34
Tablo 2.12 Rt-Pzr İle Ekspresyonu Araştırılan Genlerin Primer Dizileri	34
Tablo 3.1 Dea/No'nun Sitotoksikite Verileri (72.Saat)	37
Tablo 3. 2 Emt Genlerinin Ekspresyonlarının Gruplara Göre Karşılaştırılması	40

SİMGELER VE KISALTMALAR

BER	Baz Eksizyon Onarımı
cDNA	Komplementer DNA
DEA/NO	Dietilamin NONOate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EMT	Epithelial-to-Mesenchymal Transition
MGMT	O6-metilguanin-DNA metiltransferaz
MMR	Mismatch onarımı
mRNA	Mesajcı Ribonükleik asit
MRP1	Multidrug resistance protein 1
NER	Nükleotid Eksizyon Onarımı
NO	Nitrik oksit
P-gp	P-glikoprotein
RNA	Ribonükleik asit
siRNA(shRNA)	RNA interferans teknolojisi
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TGF-β	Transforming Growth Factor-
TMZ	Temozolomid

1. GİRİŞ

Glioblastoma (GBM), yetişkinlerde görülen en yaygın malign tümördür. Tüm malin beyin tümörlerinin ve merkezi sinir sistemi tümörlerinin %45,2'sini oluşturmaktadır (Kanderi T ve Gupta V., 2022). Son derece invaziv ve tedaviye dirençli özellikleri nedeniyle standart ve güncel gelişmiş tedavi yaklaşımlarına rağmen, yeni tanı almış GBM'in ortalama yaşam süresi sadece 15 aydır (Wu vd., 2023). Böylesine çok yönlü tedavide dahi GBM kaçınılmaz olarak tekrarlar ve nihayetinde ölüme yol açar (Majd vd., 2021). Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi seçenekleri standart tedavi protokolünü oluşturmaktadır. GBM kemoterapi seçeneğinde temozolomid (TMZ)'in mükemmel anti tümör aktivitesine karşın primer ve/veya kazanılmış dirence bağlı olarak terapötik başarı sınırlıdır (Wu vd., 2023). Bu nedenle, GBM için yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilmesi acil bir ihtiyaçtır (Majd vd., 2021).

TMZ'nin etkinliği ve başarısı O-6-metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT) aktivitesine ve yanlış eşleme tamir sistemine (MMR) bağlıdır (Kirstein vd., 2021; Majd vd., 2021; Wu vd., 2023). MGMT aktivitesi yükske ise TMZ direnci gelişmektedir. Düşük MGMT aktivitesi gösteren ve aktif bir MMR sistemine sahip tümör hücrelerinde ise TMZ'nin apoptoza yol açtığı bildirilmektedir (Pagani vd., 2007; Majd., 2021). Eğer hücre içerisinde MGMT ekspresyonunu inhibe edebilirsek daha düşük TMZ ile daha etkin bir tedavi sunabiliriz. Diethylamine NONOate (DEA/NO), Nitrik oksit (NO) salınımı (Weyerbrock vd., 2009) ve otofaji inhibisyonu (Vucicievic vd., 2014) yapabilen ve MGMT inhibitörü olduğu bilinen bir moleküldür (Tang vd., 2012). DEA/NO, MGMT'yi inhibe ederek alkilasyon tedavisine sinerjistik veya aditif katkı sunabilir. DEA/NO'nun otofajiyi inhibe etmesi de hücrelerin kemoterapötik dirençten otofaji yoluyla kaçmalarını engelleyebilir. Çünkü, NO salınımı yapabilen moleküllerin hücrede sitotoksik etki gösterdiği ve hücrelerin hem kemoterapi hem de radyoterapi duyarlılığını arttırdığı belirtilmektedir (Weyerbrock vd., 2009). NO'nun, gliomada, tümörün başlamasında, farklılaşmasında, anjiyogenezinde ve terapötik direncinde rol alabileceği ve bu etkinin detaylı araştırılması gerektiği bildirilmektedir (Tran vd., 2017). Ancak kemoterapötik dirençte DEA/NO, MGMT inhibitörleri arasında kullanımı ve fizyolojik önemi tam olarak ortaya konmamış bir moleküldür. GBM'de kemoterapötik direnç yollarından biri de Epitelyal mezenkimal dönüşümdür (EMT= Epithelial-mesenchymal transition).

EMT, geri dönüşümlü bir hücreyel programlanma olup, epitel karakterli hücrelerin mezenkimal özellikler kazanma süreci olarak tanımlanır. Bu süreçte, epitel hücrelerin ekstraselüler matriksi parçalanır, bazal membran ve hücre iskelet yapıları yeniden düzenlenir ve böylece bu hücreler göç kabiliyeti yüksek, daha invaziv ve apoptoza dirençli hücreler haline gelirler (Majc vd., 2020). Terapötik dirençli hücrelere dönüşen hücrelerin omik yapıları (genomiks, transkriptomiks, proteomiks ve metabolomiks) kök hücre yönünde pozitif ayrışır. Dolayısıyla EMT kemoterapötik dirence katkı sunar (Iwade Y., 2016). Kemoterapötik tedavide son yıllarda artan “farklı etki mekanizmalı ilaçların kombine kullanımı” yaklaşımında ilgili ilaç veya aday moleküllerin EMT sürecindeki rolleri mutlaka bilinmelidir. Çünkü, eğer ilaç veya moleküllerin EMT’yi inhibe edici veya indükleyici etkisi bilinirse kullanılacak kombinasyonun içeriğini belirlenmesine ve sonuçta terapötik potansiyelinin artırılmasına katkı sunulabilir.

DEA/NO’nun kanser hücrelerindeki sitotoksik etkileri ile ilgili literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır (Weyerbrock vd., 2009; Kokilakanit vd. 2024). Ancak, DEA/NO’nun EMT sürecindeki rolü bilinmemektedir. Bu konuda literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. DEA/NO, NO salınımı ile sitotoksik etki gösterir ve EMT sürecini inhibe edebilirse alkilasyon ilaçları başta olmak üzere kemoterapötik ilaçların toksisitetlerine katkı sunabilir. Bu nedenle bu tez çalışmasında DEA/NO’nun GBM hücrelerinde EMT sürecinde indükleyici indüklediğinin araştırılması amaçlanmıştır. Eğer indükleyici bir etkisi ortaya çıkarsa kullanımında sınırlama, inhibe edici etkisi ortaya çıkarsa da kemoterapide kombinasyon tedavisinde kullanılabilecek yeni bir molekül önerilebilir. Bu nedenle, bu tez çalışması bu yaklaşımla literatürdeki önemli bir katkı sunma potansiyeli taşımaktadır.

1.1. Kanser

Kanser, vücuttaki hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılması sonucu oluşan bir hastalıktır. Normalde, vücut hücreleri, belirli bir düzen içinde büyür, bölünür ve ölür. Ancak, kanser geliştiğinde, bu hücrelerin büyüme ve bölünme kontrolü kaybolur. Kontrolsüz hücre büyümesi, tümör oluşumuna ve bu tümörün çevre dokulara veya diğer vücut bölgelerine yayılmasına (metastaz) neden olabilir (Siegel vd., 2018).

Kanser, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu ortaya çıkabilir. Genetik mutasyonlar, hücrelerin normal büyüme ve bölünme düzenini bozarak kanser gelişimine katkıda bulunabilir (Biserova vd., 2021).

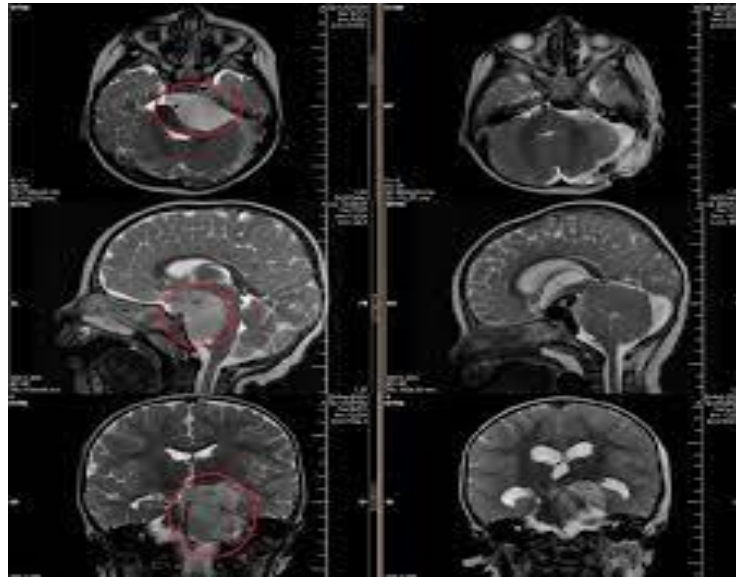
Çevresel faktörler arasında sigara içmek, zararlı kimyasallara maruz kalma, radyasyon, obezite ve bazı enfeksiyonlar yer alır. Ayrıca, yaş, cinsiyet ve genetik yatkınlık da kanser riskini etkileyebilir (Siegel vd., 2018).

Kanserin teşhisi genellikle görüntüleme testleri (örneğin, röntgen, manyetik rezonans görüntüleme, bilgisayarlı tomografi) ve biyopsi gibi prosedürlerle yapılır. Tedavi seçenekleri cerrahi müdahale, radyoterapi, kemoterapi, hedefe yönelik ilaç tedavisi ve immünoterapi gibi yöntemleri içerebilir. Tedavi planı, tümörün türü, evresi ve hastanın genel sağlık durumu gibi faktörlere bağlı olarak belirlenir (Siegel vd., 2018; Biserova vd., 2021).

1.1.1. Beyin tümörü

Beyin tümörlerinin semptomları ve belirtileri, tümörün büyüklüğüne, yeri ve etkilediği beyin bölgelerine bağlı olarak değişir. Bunlar arasında baş ağrısı, baş dönmesi, görme sorunları, hafıza kaybı, kas zayıflığı, koordinasyon bozukluğu ve davranış değişiklikleri yer alabilir (Ostrom vd., 2018).

Beyin tümörleri genellikle primer (birincil) veya sekonder (metastatik) olarak sınıflandırılır.



Şekil 1.1 Beyin tümörü

Primer Beyin Tümörleri: Beyin dokusundan doğrudan kaynaklanan tümörlerdir. Bu tür tümörler, beyin dokusunun içinde veya yakınında başlar ve genellikle benign (iyi huylu) veya malign (kötü huylu) olarak sınıflandırılır. Primer beyin tümörleri, gliomlar (örneğin, glioblastoma multiforme), meningeomlar, meningioblastomlar, astrositomlar, oligodendrogliomlar gibi çeşitli alt tiplere sahiptir (Ostrom vd., 2018)

Sekonder Beyin Tümörleri: Vücudun diğer bölgelerindeki kanser hücrelerinin beyine metastaz yapması sonucu oluşan tümörlerdir. Sekonder beyin tümörleri, genellikle kanser hücrelerinin beyine yayılmasıyla ortaya çıkarlar ve beyin dokusunda yeni büyümeler oluştururlar. Bu tür tümörler, primer kanser türünden adını alır (örneğin, meme kanseri metastazı sonucu oluşan beyin metastazı). (Biserova vd., 2021)

Beyin tümörlerinin teşhisi, görüntüleme testleri (örneğin, manyetik rezonans görüntüleme, bilgisayarlı tomografi), biyopsi ve nöropsikolojik değerlendirme gibi yöntemlerle yapılır. Tedavi seçenekleri cerrahi müdahale, radyoterapi, kemoterapi, hedefe yönelik ilaç tedavisi ve immünoterapiyi içerebilir (Ostrom vd., 2018)

Beyin kanseri çeşitleri, köken aldıkları hücre türlerine göre farklılık gösterebilir. En yaygın beyin kanseri türleri şunlardır:

Astrositomlar: Astrosit hücrelerinden kaynaklanan tümörlerdir. Düşük dereceli astrositomlar (I ve II) ve yüksek dereceli astrositomlar (III ve IV) olmak üzere iki kategoride incelenirler (Louis vd., 2021).

Meningioma: Beyin zarlarından (meninksler) kaynaklanan genellikle iyi huylu tümörlerdir. Nadiren kötü huylu olabilirler (Louis vd., 2021).

Medulloblastoma: Çocuklarda daha sık görülen bir tür olup, serebellumdan kaynaklanır (Louis vd., 2021).

Schwannoma (Vestibüler Schwannoma): İç işitme sinirinden (vestibüler sinir) kaynaklanan bir tür tümördür. Genellikle iyi huyludur ve sıklıkla işitme kaybına neden olabilir (Louis vd., 2021).

Oligodendroglioma: Oligodendrosit hücrelerinden kaynaklanan bir tür beyin tümörüdür (Louis vd., 2021).

Glioblastoma multiforme (GBM): Merkezi sinir sisteminin en sık görülen ve en agresif türlerinden biridir. Genellikle hızlı bir şekilde büyür ve yayılır (Louis vd., 2021).

Yukarıda belirtilen tümör tiplerinden en invaziv ve malignitesi en yüksek beyin tümörü tiplerinden biri de glioblastomadır. Bu tez çalışmasında glioblastomadan köken almış hücreler kullanılmıştır.

1.1.2. Glioblastoma

Glioblastoma, beyin tümörlerinin en agresif türlerinden biridir. "GBM" olarak kısaltılan glioblastoma multiforme, beyin dokusundan kaynaklanan bir tür gliyal tümördür. Bu tümörler, beynin glial hücrelerinden (özellikle astroglial hücrelerden) köken alır ve oldukça hızlı bir şekilde büyüyerek çevre dokulara yayılabilirler (Louis vd., 2016).

Küresel verilere göre, glioblastoma (GBM), kötü huylu primer beyin tümörlerinin en yaygın görüleni olarak öne çıkmaktadır. Glial tümörlerin insidansı, incelenen ülkenin sağlık sistemine ve politikalarına bağlı olarak değişebilir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, gliomlar primer beyin tümörlerinin %30'unu oluşturur ve bunların %80'i kötü huyludur; bunların da %54'ü GBM olarak teşhis edilir. Avrupa'da ise glial tümörler, primer beyin tümörlerinin %34'ünü oluşturur ve %95'i kötü huyludur. Gliomlar genellikle yetişkinlerde görülür (Özduman vd., 2019).

Türkiye'de, santral sinir sistemi kanserleri tüm kanser vakalarının %4,2'sini oluşturur. Bu oran, küresel verilere uyumlu bir şekildedir. Türkiye'deki hastaların %79,9'u histolojik olarak teyit edilmiştir, %11,3'ü sadece radyolojik olarak tanı alırken, %2,4'ü ise sadece ölüm raporuyla santral sinir sistemi kanseri tanısı konmuştur, bu da istatistiklerin güvenilirliğini göstermektedir. GBM'nin insidansı yaşla birlikte artar ve ortalama tanı yaşı 64'tür. GBM'nin erkeklerde görülme insidansı kadınlara nispeten daha yüksektir. Erkeklerde görülme sıklığı %6,67 iken kadınlarda görülme sıklığı %4,2'dir (Özduman vd., 2019).

Glioblastoma'nın tedavi yaklaşımı cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi uygulamalarını içerir. Cerrahi müdahale, tümörün mümkün olduğunca total olarak çıkarılmasını amaçlar, ancak çoğu durumda tümör tamamen çıkarılamaz. Radyoterapi, yüksek enerjili ışınlar kullanarak kanser hücrelerini hedeflerken, kemoterapi ise ilaçlar aracılığıyla kanser hücrelerini yok etmeyi veya büyümelerini durdurmaya çalışır (Louis vd., 2016).

Glioblastoma tedavisi zordur ve genellikle tümörün nüks etmesi ile ilişkilidir. Bu nedenle, glioblastoma hastalarının genellikle kötü bir prognozu vardır ve ortalama yaşam süreleri tanı konulduktan sonra 14,6 aydır (Louis vd., 2016).

1.1.2.1. Glioblastomanın tedavi biçimleri

Glioblastoma (GBM) gibi agresif bir beyin tümörünün tedavisi oldukça zorlu ve karmaşıktır. Tedavi genellikle birkaç farklı yöntemin kombinasyonunu içerebilir ve hastanın durumuna bağlı olarak değişebilir. Yaygın olarak kullanılan GBM tedavi yöntemleri:

Cerrahi Müdahale: Glioblastoma tedavisinin ilk adımı genellikle cerrahi müdahaledir. Cerrahi, tümörün mümkün olduğunca büyük bir kısmının çıkarılmasını hedefler. Ancak, tümörün beyin dokusuna sıkıca yerleşmesi ve çevredeki önemli bölgelere yayılması nedeniyle tamamen çıkarılması mümkün olmayabilir. Cerrahi müdahale, semptomların hafifletilmesi, tümörün basıncının azaltılması ve rahatlama sağlamak için de kullanılabilir (Van den Bent vd., 2009).

Radyoterapi: Radyoterapi, yüksek enerjili ışınlar kullanarak kanser hücrelerini hedef alır ve imha eder. Glioblastoma tedavisinde radyoterapi, cerrahi müdahaleden sonra veya cerrahi müdahaleye uygun olmayan durumlarda genellikle kullanılır. Bu yöntem, tümörün büyümesini kontrol altına almak, hücrelerin çoğalmasını engellemek ve tekrarlama riskini azaltmak için kullanılır (Stupp vd., 2005).

İmmünoterapi ve Hedefe Yönelik Tedaviler: İmmünoterapi, kanserle savaşmak için hastanın kendi bağışıklık sistemini güçlendirir veya modifiye eder. Bu tedaviler genellikle, bağışıklık sistemini baskılayan moleküllerin (checkpoint inhibitörleri gibi) engellenmesi, kanser hücrelerine saldıran özel T hücrelerinin (CAR T-hücre terapisi

gibi) laboratuvar ortamında üretilip hastaya verilmesi veya onkolitik virüslerin kullanılmasını içerir (Isom vd., 2020).

Hedefe yönelik tedaviler, kanser hücrelerinin büyüme ve hayatta kalma yollarını hedef alır. Bu tedaviler, genellikle kanser hücrelerinin yüzeyindeki veya içindeki spesifik moleküllere (genellikle proteinlere) bağlanan moleküllerdir. Tirozin kinaz inhibitörleri ve monoklonal antikorlar bu kategorideki popüler tedavi yöntemlerindendir (Roskoski, 2021).

Kemoterapi: Kemoterapi, kanser hücrelerini öldürmek veya büyümelerini durdurmak için ilaçları kullanır. Glioblastoma tedavisinde, temozolomid gibi bir kemoterapi ilacı sıklıkla kullanılır. Kemoterapi genellikle radyoterapi ile birlikte veya radyoterapiden sonra kullanılır. Bu tedavi, tümör hücrelerini yok etmek ve tekrarlama riskini azaltmak için kullanılır (Van den Bent vd., 2009).

Yukarıda özetlenen tedavi biçimlerinden kemoterapi yaklaşımı günümüzde halen etkili bir biçimde kullanılmaya devam etmekle birlikte hastaların büyük çoğunluğundan kemoterapötik direnç gelişmektedir. Bu tez çalışması da kemoterapötik direnç yolağındaki bir proteinin hedeflenmesi içermektedir.

1.1.2.2. Glioblastoma kemoterapi direnci

Glioblastoma için standart ameliyat sonrası tedavi (alkile edici kemoterapi ajanı temozolomid ile eşzamanlı uygulanan radyasyon ve ardından adjuvan temozolomid), on yıldan fazla bir süredir uygulanmasına rağmen, glioblastoma sıklıkla geri döner ve daha sonraki kemoterapiye direnç geliştirir. İyonlaştırıcı radyasyon, çift sarmallı ve tek sarmallı DNA kırıklarına, oksidatif hasara, mitotik hücre ölümüne ve sentrozom aşırı çoğalmasına aracılık ederken; temozolomid, özellikle O6-metilguanin (O6MeG) eklentilerinin replikasyonu uyararak sitotoksiteyi indirir (Ou vd., 2020).

Temozolomid tedavisine karşı en erken tanımlanan direnç mekanizmalarından biri, DNA onarım enzimi O6MeG DNA metiltransferazın (MGMT) yukarı regülasyonudur; bu enzim, uyumsuzluk onarımına ve dolayısıyla tümöral DNA replikasyonuna izin vermek için DNA'daki metil eklentisini uzaklaştırır. Aslında, MGMT'nin epigenetik olarak susturulması, glioblastoma hastalarında klinik olarak en güçlü prognostik ve prediktif biyobelirteçlerden biridir (Ou vd., 2020).

1.1.2.3. Glioblastoma kemoterapide alkilasyon ajanı

Temozolomid: Glioblastoma tedavisinde en sık kullanılan alkilasyon ajanı temozolomid'dir. Temozolomid, DNA'daki O6-guanin pozisyonuna metil gruplarını transfer ederek DNA hasarına yol açar. Bu, kanser hücrelerinin çoğalmasını ve yayılmasını engelleyebilir. Temozolomid, klinik çalışmalarda glioblastoma tedavisinde radyoterapi ile kullanılarak hastaların sağkalım süresini artırmıştır. (Stupp vd., 2005).

1.1.2.4. Alkilasyon ajanlarında direnç

DNA Tamiri Mekanizmalarının Aktivasyonu: Kanser hücreleri, alkilasyon ajanlarına karşı direnç geliştirmek için DNA tamiri mekanizmalarını aktive edebilirler. Bu mekanizmalar arasında NER (nükleotid eksizyon onarımı), BER (baz eksizyon onarımı) ve MMR (mismatch onarımı) bulunur (Zhang vd., 2020).

DNA Hasarına Yanıtı Değiştiren Mutasyonlar: Kanser hücrelerindeki genetik değişiklikler, alkilasyon ajanlarına karşı direnci artırabilir. Özellikle MGMT (O6-metilguanin-DNA metiltransferaz) genindeki promotor metilasyon, temozolomid tedavisine yanıtı etkileyebilir (Hegi vd., 2005).

İlaç Pompalarının Aktivasyonu: İlaç pompaları, özellikle ABC (ATP-binding cassette) transportör ailesi üyeleri olan P-glikoprotein (P-gp), MRP1 (Multidrug resistance protein 1) ve BCRP (Breast cancer resistance protein) gibi proteinler, kemoterapi ajanlarını hücre dışına aktif olarak taşıyarak kanser hücrelerinin ilaçlara direnç kazanmasına neden olur. Bu pompalar, hücre zarında bulunur ve ATP hidrolizi yoluyla enerji kullanarak çeşitli ilaçları hücre dışına taşır (Robey vd., 2018).

Kanser hücreleri, hücre dışına ilaç pompalayan ve bu şekilde ilacın hücre içine girişini engelleyen özel pompaları aktive edebilirler. Örneğin, ABC transportör ailesinden olan ABCG2 pompasının temozolomid direncinde rol oynadığı gösterilmiştir (Lagas vd., 2010).

MGMT Aracılı Direnç Mekanizması: MGMT enzimi, DNA'nın O⁶-methylguanine gibi hasar görmüş bazlarını onarır. Bu onarım işlemi sırasında, MGMT enzimi hasar görmüş bazdaki alkil grubunu kendisine transfer eder ve bu sayede DNA'nın normal yapıda kalmasını sağlar. Bu mekanizma, hücrelerin mutasyona uğramasını ve ölmesini

önlernen, aynı zamanda alkilleyici ajanların (örneğin temozolomid) kanser hücrelerini öldürme kabiliyetini de azaltır (Richard vd., 2019). İnhibitörler aracılığıyla da bu direnç yıkılabilir ve kanser hücresinin mezenkimal karakter kazanmasını önleyebilir.

1.1.3. MGMT (O6-Metilguanin-DNA Metiltransferaz) nedir?

MGMT'nin temel işlevi, DNA'daki alkil grubunu transfer ederek hasarlı bazları onarmaktır. Bu mekanizma, hücrelerin alkilleyici kimyasallara (örneğin, çevresel toksinler ve bazı kanser kemoterapileri) maruz kaldığında DNA hasarını düzeltir. Klinik olarak, MGMT'nin en belirgin önemi glioblastoma gibi bazı kanser türlerindeki tedavi direnciyle ilişkilidir. GBM tedavisinde kullanılan temozolomid gibi alkilleyici ajanlar, DNA'ya zarar vererek kanser hücrelerini öldürür. Ancak, MGMT'nin aktif olduğu hücreler bu hasarı onarabilir ve sonuç olarak ilaca direnç gelişebilir. Bu nedenle, MGMT promotorunun metilasyon durumu, GBM tedavisinde bir prognostik ve prediktif biyomarker olarak kullanılır; metilasyon, genin ifadesinin baskılanması ve dolayısıyla daha düşük MGMT protein seviyeleri ile ilişkilidir (Brandner vd., 2021).

1.1.3.1. MGMT inhibisyonunun önemi

MGMT, DNA'daki alkil hasarını onararak mutasyonları ve hücre ölümünü önler. Bu onarıcı aktivite, alkilleyici kanser ilaçlarının (örneğin, temozolomid) etkili bir şekilde DNA hasarı yaratmasını engelleyebilir. Bu nedenle tümör hücreleri bu tür ilaçlara karşı direnç geliştirebilir. MGMT'nin inhibe edilmesi, özellikle de glioblastoma gibi zorlu kanser türlerinde bu direnci aşmaya ve tedavi etkinliğini artırmaya yardımcı olabilir (Johnson vd., 2021).

1.1.3.2. MGMT İnhibisyonunun Kanser Tedavisindeki Önemi

Alkilleyici Ajanların Etkinliğinin Artırılması: MGMT, alkil gruplarını DNA'dan çıkararak, alkilleyici ajanların neden olduğu hasarı onarır. MGMT inhibe edildiğinde, DNA'daki hasar onarılamaz ve kanser hücreleri apoptoza (programlanmış hücre ölümü) sürüklenir (Johnson vd., 2021).

Tedaviye Dirençli Tümörlerin inhibisyonu: Bazı tümörler, özellikle MGMT geni yüksek derecede ifade edildiğinde, standart kemoterapiye direnç gösterir. MGMT inhibisyonu, bu direnci kırarak daha etkili bir tedavi sağlamayı hedefler (Johnson vd., 2021).

Prognostik ve Prediktif Bir Biyomarker Olarak MGMT: MGMT metilasyon durumu, özellikle glioblastoma tedavisinde bir biyomarker olarak kullanılır. MGMT'nin az ifade edildiği veya promotorunun metillendiği durumlarda, hastalar genellikle temozolomide daha iyi yanıt verirler (Johnson vd., 2021).

1.1.3.3. MGMT inhibitörlerinin çalışma mekanizmaları

Doğrudan MGMT İnhibisyonu: Bazı bileşikler, MGMT enziminin aktif bölgesine doğrudan bağlanarak onun DNA onarıcı aktivitesini bloke edebilir. Bu tip inhibisyon, MGMT'nin alkil grubunu transfer eden kabiliyetini geçici olarak devre dışı bırakır (Hegi vd., 2005)

Gen İfadesinin Baskılanması: MGMT geninin promotor bölgesindeki metilasyon, genin transkripsiyonunu inhibe ederek MGMT protein seviyelerini azaltabilir. Bu metilasyon, epigenetik modifikasyonlarla veya farmakolojik ajanlarla teşvik edilebilir. (Hegi vd., 2005)

mRNA İnterferansı: RNA interferans teknolojisi (siRNA veya shRNA), MGMT mRNA'sını hedefleyerek MGMT proteininin sentezini baskılayabilir. Bu yaklaşım, gen ekspresyonunu doğrudan düşürerek enzim aktivitesini azaltır. (Hegi vd., 2005)

Direncin Azaltılması: MGMT enzimi, DNA'deki O6-metilguanin hasarını onararak alkilasyon ajanlarının etkisini nötralize eder. Ancak, MGMT inhibisyonu bu enzimin aktivitesi baskılanabilir ve böylece ilaçlara karşı direnç azaltılabilir. (Hegi vd., 2005)

Tedaviye Yanıtın Artırılması: MGMT inhibisyonu, alkilasyon ajanlarının kanser hücrelerinde daha etkili olmasını sağlar. Bu, ilaçların kanser hücrelerinde daha fazla DNA hasarı oluşturmasını ve dolayısıyla hücre ölümünü artırmasını sağlar (Hegi vd., 2005).

Klinik Önem: Çeşitli klinik çalışmalar, MGMT inhibisyonunun glioblastoma tedavisinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Özellikle, temozolomid ile MGMT inhibisyonu stratejilerinin, hastaların sağ kalımını artırdığı ve tedaviye yanıtı iyileştirdiği gösterilmiştir (Hegi vd., 2005).

1.1.3.4. MGMT inhibitörleri ve etki mekanizması.

MGMT (O6-metilguanin-DNA metiltransferaz) inhibitörleri, MGMT enziminin aktivitesini bloke ederek kanser hücrelerinin alkilasyon ajanlarına karşı direncini azaltmaya yönelik bir stratejidir. Bu inhibitörler, genellikle alkilasyon ajanları ile birlikte kullanılarak kanser tedavisinde etkinliği artırılabilir. MGMT inhibitörleri, MGMT'nin DNA'deki O6-metilguanin hasarını onarma yeteneğini engeller, böylece alkilasyon ajanlarının kanser hücrelerinde daha fazla DNA hasarı oluşturmasını sağlar (Johnson vd., 2014).

MGMT inhibitörleri, MGMT enziminin etkinliğini durdurarak kanserli hücrelerin alkilasyon ajanlarına olan direncini düşürür. MGMT inhibitörleri alkilasyon ajanlarıyla birlikte kullanıldığında kanser tedavisinde etkinliği yükseltebilir. Bu inhibitörler, MGMT'nin DNA'daki O6-metilguanin hasarının onarılmasını engeller. Böylelikle alkilasyon ajanlarının kanser hücreleri üzerinde meydana getirdiği DNA hasarını azaltır.

Etki Mekanizması:

MGMT inhibitörleri, MGMT enziminin aktif bölgesine bağlanarak etki ederler. Bu bağlanma, MGMT'nin DNA hasarını onarma yeteneğini engeller ve böylece alkilasyon ajanlarının kanser hücrelerinde daha etkili olmasını sağlar. MGMT inhibitörleri, özellikle temozolomid gibi alkilasyon ajanları ile birlikte kullanıldığında, kanser hücrelerinin DNA hasarına karşı daha savunmasız hale gelmesini sağlar (Johnson vd., 2014).

O6-benzilguanin (O6BG): MGMT enziminin aktif bölgesini bağlayarak DNA onarımını engeller (Hindle vd., 2021).

Lomemustine: MGMT enzimini inhibe ederek ve DNA hasarına yol açarak çalışır (Drugbank Online, 2024).

Temozolomide: MGMT enzimini inhibe ederek ve DNA hasarına yol açarak çalışır (Zhang vd., 2012).

1.1.3.5. MGMT inhibitörlerinin etki biçimleri:

MGMT enziminin aktif bölgesini bağlama: Bu inhibitörler, MGMT enziminin DNA onarımı için gerekli olan kimyasal reaksiyonları gerçekleştirmesini engeller (Hindle vd., 2021).

MGMT enziminin yapısını değiştirme: Bu inhibitörler, MGMT enziminin aktif bölgesinin şeklini değiştirerek DNA onarımını engeller (Zhang vd., 2012).

MGMT enziminin üretimini azaltma: Bu inhibitörler, MGMT enziminin üreten genlerin ekspresyonunu azaltarak çalışır.

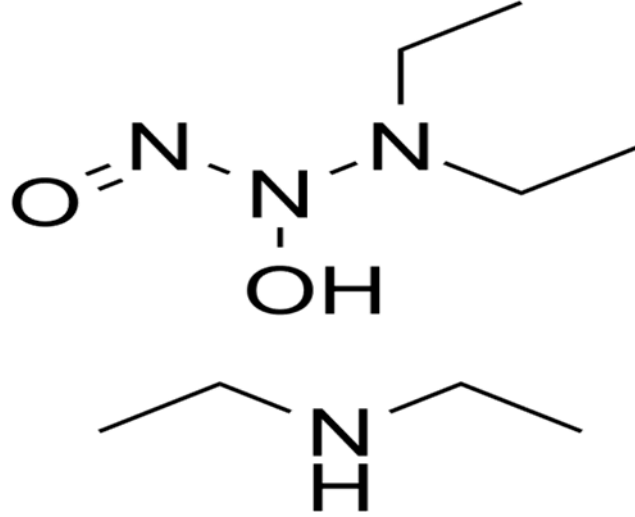
1.1.3.6. Diethylamine nonoate

Diethylamine NONOate, nitrik oksit (NO) salınımını sağlayan bir bileşiktir. Nitrik oksit, birçok biyolojik süreçte önemli bir rol oynar ve düzenleyici bir molekül olarak işlev görür. Ancak, MGMT (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase) ile olan ilişkisi daha az doğrudan ve daha çok dolaylı yollarla olabilir. Nitrik oksit ve MGMT arasındaki potansiyel etkileşimler, nitrik oksidin DNA hasarı ve onarım süreçleri üzerindeki etkileri ile ilgilidir. (Pegg vd., 2011)

Nitrik oksit, yüksek konsantrasyonlarda DNA'ya zarar verebilir ve çeşitli tiplerde DNA hasarına yol açabilir. Bu hasarlar, baz değişimleri, DNA zincir kırıkları ve DNA-protein çapraz bağları içerebilir. NO, ayrıca DNA'daki guanin bazlarını modifiye ederek, O⁶-methylguanine gibi lezyonlar oluşturabilir. Bu tür lezyonlar, MGMT tarafından onarılan hasar türleridir (Pegg vd., 2011).

1.1.3.7. MGMT ve nitrik oksit ilişkisi

MGMT, alkilleyici hasarı onaran bir DNA onarım enzimidir ve genellikle O⁶-methylguanine gibi alkilleyici hasarları hedef alır. NO tarafından indüklenen benzer hasarların varlığı, teorik olarak MGMT'nin aktivitesi ile ilişkilendirilebilir. Eğer NO, MGMT'nin hedeflediği DNA hasarını artırır, MGMT'nin bu hasarları onarma kapasitesi önem kazanır. Ancak, spesifik olarak diethylamine NONOate ve MGMT arasındaki doğrudan ilişkiyi açıklayan geniş çapta kabul görmüş bilimsel literatür sınırlıdır (Pegg vd., 2011).

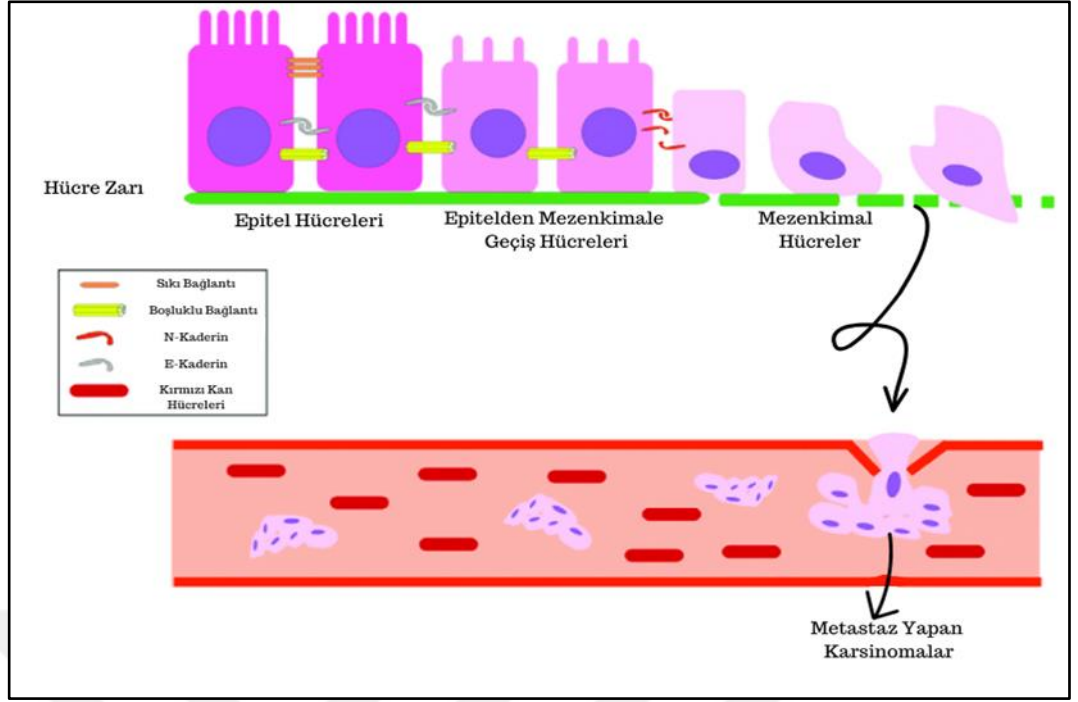


Şekil 2.2 Diethylamine Nonoate Kimyasal Formülü

1.1.4. EMT Nedir?

Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) karmaşık bir biyolojik süreç olup, epitelyal hücrelerin mezenkimal hücre özellikleri kazanarak morfolojik ve fonksiyonel olarak dönüşmesidir. Bu süreç, hücrelerin yapısal olarak epitelyal, yapışkan, polarize hücrelerden, mezenkimal, hareketli hücrelere dönüşmesini içerir. EMT, gelişim, yara iyileşmesi, fibroz ve kanserin metastazı gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde kritik bir rol oynar. EMT'nin düzenlenmesi, hücrelerin göç etme, invaze olma ve çevresel sinyallere yanıt verme yeteneklerini önemli ölçüde etkiler (Nieto vd., 2016).

EMT, hücrelerin epitelyal fenotipten mezenkimal fenotipe doğru bir geçiş sürecidir. Epitelyal hücreler, polarize bir yapıya ve sıkı hücre bağlantılarına sahiptirler. Bu hücreler, dokuların yapısını korur ve işlevlerini yerine getirirler. Mezenkimal hücreler ise daha invaziv, migrasyon yeteneği daha yüksek ve hücreler arası bağlantılar daha az olan hücrelerdir. EMT, epitelyal hücrelerin bu sıkı bağlantılarını kaybederek mezenkimal fenotipe geçiş yapmalarını sağlar. Bu süreç, kanser metastazı gibi invazif fenotiplerin gelişiminde önemli bir rol oynar. Glioblastoma gibi agresif beyin tümörlerinde, EMT'nin aktive olduğu bilinmektedir. Bu süreç, gliyoma hücrelerinin çevresel bariyerleri aşmasına, çevre dokulara invaze olmasına ve nihayetinde metastaz yapmasına olanak tanır. GBM'de EMT'nin moleküler mekanizmaları hala tam olarak anlaşılmamış olsa da bu fenotipin tümörlerin agresif ve tedaviye dirençli hale gelmesinde kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir (Bao vd., 2006).



Şekil 3.3 EMT

1.1.4.1. EMT'nin temel özellikleri

Morfolojik Değişiklik: Epitelyal hücreler genellikle yuvarlak veya kuboidal şekillerde iken, EMT sırasında bu hücreler uzunlamasına ve ipliksi bir yapıya dönüşürd (Nieto, 2016).

Hücre Bağlantılarındaki Azalma: EMT sırasında epitelyal hücreler arasındaki bağlantıları sağlayan E-kaderin gibi proteinlerin ifadesi azalır. Bu, hücrelerin birbirlerinden ayrılarak daha bağımsız hareket etmelerini sağlar (Nieto, 2016).

Mezenkimal Markerların Artması: EMT sürecinde, mezenkimal hücrelere özgü proteinler olan vimentin ve fibronectin gibi markerlar ifade edilmeye başlar (Nieto, 2016).

Hareketlilik ve İnvazyon: EMT geçiren hücreler, artan hareketlilik ile çevre dokulara göç edebilme ve invaze olabilme kapasiteleri kazanır (Nieto, 2016).

1.1.4.2. Glioblastomada epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) mekanizması:

Sinyal Yolları Aktivasyonu: Glioblastoma hücrelerinde, çeşitli sinyal yolları EMT'yi tetikleyebilir. Bunlar arasında Wnt/ β -katenin, TGF- β (Transforming Growth Factor-

beta), Notch ve Hedgehog sinyal yolları bulunur. Bu sinyal yolları, hücrelerin epitelyal fenotipten mezenkimal fenotipe geçişini başlatır ve sürdürür (Nieto, 2016).

Transkripsiyonel Düzenleme: EMT sürecinde, çeşitli transkripsiyon faktörleri, hücrelerin gen ekspresyonunu değiştirerek epitelyal hücre özelliklerini kaybetmelerini ve mezenkimal fenotipe geçmelerini sağlar. Örneğin, Snail, Slug, Twist gibi transkripsiyon faktörleri, E-kadherin'in inhibisyonunu sağlayarak hücreler arası bağlantıların kaybolmasına neden olur (Nieto, 2016).

Hücre İletişimi ve Çevresel Faktörler: GBM'de EMT'yi etkileyen çevresel faktörler de vardır. Tümör mikroçevresindeki inflamasyon, hipoksi, sitokinler ve diğer tümör hücreleri ile etkileşimler, EMT sürecini tetikleyebilir veya modüle edebilir. (Nieto, 2016).

1.1.4.3. EMT fenotipik ve genotipik

Fenotipik Değişiklikler

1. Morfolojik Değişim:

Epitelyal hücreler, polarize ve birbirine yapışık yapıdadır; genellikle kuboidal veya yassı morfolojiye sahiptir.

EMT süreciyle hücreler, uzunlamasına, ipliksi ve daha az polarize mezenkimal hücreler haline gelir. Bu değişim, hücrelerin hareketliliğini ve doku içinde göç etme yeteneğini artırır (Kalluri vd., 2009).

2. Hücre Bağlantılarında Azalma:

Epitelyal hücreler arasındaki sıkı bağlantılar (tight junctions) ve adezyon molekülleri (E-kaderin) EMT ile azalır veya kaybolur, bu da hücrelerin birbirinden ayrılmasını ve bağımsız hareket etmesini sağlar (Kalluri vd., 2009).

3. Mezenkimal Markerların Artışı:

EMT süreciyle, hücreler epitelyal markerları (E-kaderin, occludin) kaybederken, mezenkimal markerlar (N-kaderin, vimentin, fibronectin) kazanır (Kalluri vd., 2009).

Genotipik Değişiklikler

Gen İfade Değişiklikleri:

EMT sırasında, epitelyal hücrelerden mezenkimal hücrelere dönüşüm sırasında gen ifade profilleri önemli ölçüde değişir. Bu değişiklikler, EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin (Snail, Slug, ZEB1, ZEB2, Twist) aktivasyonu ve regülasyonu yoluyla gerçekleşir (Tam vd., 2013).

Epigenetik Modifikasyonlar:

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarında meydana gelen değişiklikler, EMT'yi tetikleyen ya da inhibe eden genlerin ifade düzeylerini değiştirir. Örneğin, E-kaderin geninin promotor bölgesindeki DNA metilasyonu artışı, genin ifadesinin azalmasına ve hücre bağlantılarının kaybına neden olur. (Peinado vd., 2004)

1.1.4.4. EMT'nin üç ana tipi

Tip 1: Gelişimsel EMT

Rolü: Bu tip EMT, embriyonik gelişim sürecinde kritik bir rol oynar. Gastrülasyon sırasında ve organ gelişimi esnasında, hücrelerin yeni dokuları oluşturabilmesi ve gerekli yerlere göç edebilmesi için gerçekleşir.

Örnekler: Neurülasyon sürecinde sinir tüpünün oluşumu, kalp ve yüz kaslarının oluşumu (Nieto vd., 2011)

Tip 2: Fibrotik EMT

Rolü: Tip 2 EMT, yara iyileşmesi, organ fibrozisi ve inflamatuvar cevaplarda meydana gelir. Bu tip, hasarlı veya inflamasyon geçirmiş dokuların onarılmasına yardımcı olur, ancak kontrolsüz olduğunda fibrozise neden olabilir.

Örnekler: Karaciğer fibrozu, böbrek fibrozu ve kronik yaraların iyileşmesi (Kalluri vd., 2003).

Tip 3: Onkogenik EMT

Rolü: Kanser hücrelerinin, primer tümörden ayrılarak diğer dokulara metastaz yapmalarını sağlar. Tip 3 EMT, kanser metastazında ve tümör mikroçevresinin modifikasyonunda önemli bir yere sahiptir.

Örnekler: Kanserin ilerlemesi ve metastaz sırasında görülen EMT (Thiery vd., 2002).

EMT süreçleri, hücrelerin epitelyal özelliklerinden mezenkimal özelliklere geçişi içerir. Bu değişiklikler, hücre morfolojisinde, adezyon özelliklerinde ve hareket kabiliyetinde önemli değişiklikler yaratır. Tip 1 EMT genellikle reversibl (geri dönüşümlü) iken, Tip 2 ve Tip 3 daha kalıcı doku değişiklikleri ile ilişkilendirilebilir. Bu tipler arasındaki sınırlar her zaman net olmayabilir çünkü bazı biyolojik durumlar birden fazla EMT tipinin özelliklerini gösterebilir.

1.1.4.5. EMT ve kanser

EMT, epitelyal hücrelerin mezenkimal hücre özellikleri kazanarak yapısal ve işlevsel olarak değişmesini içerir. Kanserde, EMT'nin tetiklenmesi, hücrelerin primer tümörden koparak diğer dokulara göç etmelerini ve yayılmalarını sağlar. Bu özellikler, kanser hücrelerinin metastaz yapabilmesi için kritik öneme sahiptir.

Fenotipik ve Genotipik Değişiklikler: EMT sırasında hücreler, epitelyal özellikler olan yüksek hücre-hücre adezyonu ve polariteyi kaybederler. Bu değişimler, hücrelerin daha hareketli ve invazif olmalarını sağlar. Genotipik olarak, transkripsiyon faktörleri (Snail, Slug, ZEB1/2, Twist vb.) aktive olur ve bu faktörler, epitelyal genlerin baskılanmasını ve mezenkimal genlerin ifadesinin artırılmasını sağlar.

1.1.4.6. EMT'nin kanser tedavisindeki önemi

Metastazın İnhibisyonu: EMT, metastazın temelini oluşturur. Bu süreçteki inhibisyon, kanser hücrelerinin yayılma kabiliyetini kısıtlar ve tümörün diğer bölgelere sınırlı kalmasını sağlar. EMT yollarını hedefleyen terapiler, metastazı önleyici potansiyel taşır (Singh vd., 2010).

Kemoterapi Direnci: EMT'nin kemoterapiye dirençle ilişkili olduğu gösterilmiştir. EMT yoluyla kazanılan mezenkimal özellikler, hücrelerin ilaçlara karşı daha dayanıklı

hale gelmesine neden olur. EMT'yi inhibe eden ajanlar, bu direnci kırabilir ve ilaçların etkinliğini artırabilir (Zheng vd., 2015).

Tümör Mikroçevresi ve İmmün Yanıt: EMT, tümör mikroçevresini modifiye ederek, özellikle immün hücrelerin tümör hücrelerini tanıyıp yok etmesini zorlaştırabilir. EMT'nin inhibisyonu, immünoterapi gibi tedavilere olan yanıtı artırabilir ve immün kaçış mekanizmalarını kırabilir (Tam vd., 2015).

1.1.5. Vimentin

Vimentin, hücre iskeletinin (sitoskeleton) bir bileşeni olan bir tür ara filament proteinidir. Mezodermal kökenli hücrelerde bol miktarda bulunur ve hücre yapısı, hücre göçü, hücre sinyalleşmesi ve mekanik bütünlük gibi çeşitli hücresel işlevlerde önemli rol oynar. Vimentin, epitel-mezenkimal geçiş (EMT) sürecinde özellikle önemlidir, bu süreç kanser metastazı sırasında kanser hücrelerinin invazif ve hareketli hale gelmesini sağlar (Liu vd., 2015).

1.1.5.1. Vimentin'in rolü ve mekanizmaları

Hücre Mekaniği ve Yapısal Destek: Vimentin, hücre iskeletinin kritik bir bileşeni olarak hücresel yapının ve mekanik dayanıklılığın korunmasına yardımcı olur. Kanser hücrelerinde vimentin, hücre hareketliliğini ve invazyonunu artıran dinamik değişiklikleri destekler (Liu vd., 2015).

EMT ve Kanser Metastazı: EMT sırasında, epitel hücreleri mezenkimal özellikler kazanarak daha invazif hale gelirler. Vimentin bu süreçte kritik bir rol oynar ve EMT'nin bir göstergesi olarak kabul edilir. EMT, kanser hücrelerinin primer tümörden ayrılarak metastatik özellikler kazanmasına olanak tanır (Liu vd., 2015).

Fokal Adezyon ve Hücre Göçü: Vimentin, fokal adezyonların olgunlaşmasına ve hücre göçü sırasında hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine katkıda bulunur. Bu süreçler, kanser hücrelerinin hareketliliğini ve invazyon kapasitesini artırır (Liu vd., 2015).

1.1.5.2. N-kaderin

N-kaderin (neural-cadherin), hücre-hücre adezyon molekülleri ailesinin bir üyesi olan kalsiyum bağımlı bir hücre yapışma proteinidir. Bu protein, özellikle sinir dokularında

yaygındır ve hücresel hareket, morfogenez, doku homeostazı ve hücre sinyalleşmesinde önemli rol oynar. N-kaderin, ayrıca epitel-mezenkimal geçiş (EMT) sürecinde de kritik bir role sahiptir ve kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz kapasitelerini artırır (Loh vd., 2019).

N-Kaderin'in rolü ve mekanizmaları

Epitel-Mezenkimal Geçiş (EMT): N-kaderin, EMT sırasında önemli bir marker olarak işlev görür. EMT, epitel hücrelerinin mezenkimal hücre özellikleri kazanarak daha hareketli ve invaziv hale geldiği bir süreçtir. Bu süreçte, E-kaderin ekspresyonu azalırken, N-kaderin ekspresyonu artar. Bu değişim, hücrelerin birbirine daha gevşek bağlanmasını ve metastatik özellikler kazanmasını sağlar (Loh vd., 2019).

Hücre-Hücre İletişimi: N-kaderin, hücre-hücre iletişimini ve adezyonunu düzenler. Bu, hücrelerin çevrelerindeki diğer hücrelerle etkileşimlerini ve sinyalleşme yollarını etkiler, bu da hücresel göç ve invazyon için kritiktir (Loh vd., 2019).

Kanser İnvazyonu ve Metastazı: N-kaderin, kanser hücrelerinin invaziv ve metastatik potansiyelini artırır. Yüksek N-kaderin ekspresyonu, tümör hücrelerinin doku sınırlarını aşmasına ve uzak organlara metastaz yapmasına olanak tanır (Loh vd., 2019).

1.1.5.3. E-kaderin

E-kaderin (epithelial-cadherin) hücre-hücre adezyonunu sağlayan kalsiyum bağımlı bir protein olup, epitel hücrelerinin bir arada kalmasını ve dokunun yapısal bütünlüğünü korumasını sağlar. E-kaderin kaybı, kanser hücrelerinin epitel-mezenkimal geçiş (EMT) sürecine girerek invazif ve metastatik hale gelmesine katkıda bulunur. Bu nedenle, E-kaderin hem tümör baskılayıcı bir protein olarak hem de EMT ve kanser progresyonunda önemli bir biyomarker olarak kabul edilir (Singh vd., 2018).

E-Kaderin'in rolü ve mekanizmaları

Hücre-Hücre Adezyonu: E-kaderin, hücreler arasındaki adherens junctions adı verilen yapısal bağlantıları oluşturarak hücrelerin birbirine yapışmasını sağlar. Bu adezyon, epitel hücrelerinin bir arada kalmasını ve düzgün bir doku yapısını sürdürmesini sağlar (Singh vd., 2018).

Tümör Baskılayıcı Fonksiyon: E-kaderin, hücre proliferasyonunu ve motilitesini kontrol ederek tümör baskılayıcı bir rol oynar. E-kaderin kaybı veya fonksiyon bozukluğu, hücrelerin invazyon yeteneklerini artırarak kanser gelişimine katkıda bulunur (Singh vd., 2018).

Epitel-Mezenkimal Geçiş (EMT): EMT, epitel hücrelerinin mezenkimal hücre özellikleri kazanarak hareketli ve invaziv hale geldiği bir süreçtir. Bu süreçte E-kaderin ekspresyonu azalırken, N-kaderin ve vimentin gibi mezenkimal markerlar artar. E-kaderin kaybı, EMT'nin kritik bir göstergesidir ve metastatik süreçte önemli bir rol oynar (Singh vd., 2018).

1.1.5.4. Snail

Transkripsiyon faktörü, epitel-mezenkimal geçiş (EMT) sürecinde önemli bir rol oynayan bir protein ailesidir. Snail, E-kaderin gibi epitel markerlarının ekspresyonunu baskılayarak hücrelerin mezenkimal özellikler kazanmasını sağlar. Bu özellik, kanser hücrelerinin invaziv ve metastatik kapasitelerini artırır (Dongre vd., 2019).

Snail'in Rolü ve Mekanizmaları

EMT İndüksiyonu: Snail, EMT'yi indükleyen ana transkripsiyon faktörlerinden biridir. E-kaderin ekspresyonunu baskılar ve vimentin, N-kaderin gibi mezenkimal markerların ekspresyonunu artırır. Bu, hücrelerin yapısal ve işlevsel olarak değişmesine yol açar, böylece daha invaziv hale gelirler (Dongre vd., 2019).

Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi: Snail, hücrelerde birçok genin transkripsiyonunu düzenler. E-kaderin gibi hücre adezyon moleküllerinin baskılanmasının yanı sıra, hücre hareketliliği ve invazyonunu artıran genlerin ekspresyonunu teşvik eder (Dongre vd., 2019).

Tümör İnvazyonu ve Metastazı: Snail'in aşırı ekspresyonu, kanser hücrelerinin primer tümörden ayrılarak uzak dokulara metastaz yapma kapasitesini artırır. Bu süreçte, hücre adezyonunun azalması ve hücre hareketliliğinin artması kritik rol oynar (Dongre vd., 2019).

1.1.5.5. Snail2

Snail2, Snail ailesinin bir üyesidir ve epitel-mezenkimal geçiş (EMT) sürecinde önemli bir transkripsiyon faktörü olarak rol oynar. Snail2, E-kaderin gibi epitel markerlarını baskılar ve kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz kapasitesini artırır (Stemmler vd., 2019).

Snail2'nin Rolü ve Mekanizmaları

EMT İndüksiyonu: Snail2, EMT sürecini indükleyen başlıca transkripsiyon faktörlerinden biridir. E-kaderin ekspresyonunu baskılar ve N-kaderin, vimentin gibi mezenkimal markerların ekspresyonunu artırır. Bu değişiklikler, hücrelerin yapısal ve işlevsel olarak epitelden mezenkimale geçişini sağlar (Stemmler vd., 2019).

Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi: Snail2, EMT sırasında kritik rol oynayan birçok genin transkripsiyonunu düzenler. E-kaderin gibi hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu baskılayarak hücre hareketliliğini ve invazyonunu artıran genlerin aktivasyonunu teşvik eder (Stemmler vd., 2019).

Kanser İnvazyonu ve Metastazi: Snail2, kanser hücrelerinin primer tümörden ayrılarak uzak dokulara metastaz yapma yeteneğini artırır. Bu süreçte, hücre adezyonunun azalması ve hücre hareketliliğinin artması kritik rol oynar (Stemmler vd., 2019).

1.1.5.6. Twist ve kanser

Epitel-Mezenkimal Geçiş (EMT) İndüksiyonu: Twist1, EMT sürecinde kritik bir transkripsiyon faktörüdür. Epitel markerlarının (E-kaderin gibi) baskılanmasını ve mezenkimal markerların (vimentin gibi) ekspresyonunun artmasını sağlar. Bu değişim, hücrelerin epitel özelliklerinden mezenkimal özelliklere geçişine olanak tanır (Liu vd., 2021).

Hücre Hareketliliği ve İnvazyonu: Twist1, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini teşvik eder ve hücre hareketliliğini artırır. Bu özellikler, kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz yeteneklerini artırarak tümörlerin diğer dokulara yayılmasını kolaylaştırır (Liu vd., 2021).

Apoptozun Engellenmesi: Twist1, apoptotik sinyalleri baskılayarak hücrelerin hayatta kalmasına katkıda bulunur. Bu, kanser hücrelerinin daha dirençli olmasını sağlar ve tedaviye karşı direnç geliştirmelerine yardımcı olur (Liu vd., 2021).

Epigenetik Düzenleme: Twist1'in ekspresyonu, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmalarla düzenlenir. Bu epigenetik değişiklikler, Twist1'in aktivitesini modüle ederek kanser progresyonuna katkıda bulunur (Liu vd., 2021).

1.2. Amaç

Çeşitli kanserlerde klinik kullanımına ilişkin çalışmaları olan ve GBM'de kullanılmasının faydalı olabileceği rapor edilen MGMT inhibitörlerinin GBM hücrelerinde EMT yolağına nasıl bir katkı sunacağına ilişkin literatürde herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada kullanılması planlanan DEA/NO'nun bir otofaji inhibitörü olması, otofaji ile EMT'nin birbirlerini negatif regüle etmesi ve her iki yolağın mikroçevre faktörlerine bağlı olarak çoklu ilaç direncine katkı sunması DEA/NO'nun EMT'deki rolünün araştırılması gerekliliğini doğurmuştur.

Bu çalışmada, Diethylamine NONOate'in GBM hücrelerinin invazyonuna ve EMT yolağında rol alan genlerin ekspresyonlarına olan olası etkileri ilk kez araştırılacaktır. Bu sayede literatüre MGMT inhibitörlerinin EMT yolağındaki rollerine ilişkin önemli bir katkı sunacaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın deneylerinde Aksaray Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Laboratuvarları ile Aksaray Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarları kullanılmıştır.

2.1. Gereç

2.1.1. Hücre serileri

Bu tez çalışmasında 2 adet glioblastoma hücre serisi kullanılmıştır. Hücrelere ait biyolojik bilgileri aşağıdaki Tablo 1’de verilmiştir

Tablo 2.1. Çalışma kapsamında kullanılan hücre serileri

	T98G	U-87MG
Organizma	İnsan	İnsan
Cinsiyet, yaş	Erkek, 61	Bayan, 44
Doku	Beyin	Beyin
Morfoloji	Fibroblast	Epitel
Yüzey tutunumu	Yapışan Hücreler	Yapışan Hücreler
Tümör22ijenik	Hayır	Evet
Karyotip	Hiperpentaploid	Hipodiploid
Besi yeri	DMEM (Yüksek glukoz), %10 FBS	DMEM (yüksek glukoz), %10FBS
Besi yeri yenileme süresi	Haftada 2-3 kez	Haftada 2-3 kez
Pasaj metodu	%0,25 Trypsin + %0,1 EDTA	%0,25 Trypsin + %0,1 EDTA
Ayırma oranı	1:3- 1:10	1:2- 1:5
Biyogüvenlik Düzeyi	1	1

2.1.2. Hücre kültüründe kullanılan sarf malzemeler

Hücre kültürü uygulamalarında kullanılan molekül ve gereçler Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2.2. Hücre kültürü uygulamalarında kullanılan molekül ve gereçler

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Diethylamine NONOate	Sigma	D5431
Besi yeri	Capricorn Scientific	DMEM-HA (DMEM High Glucose (4.5 g/l), with L-Glutamine) Lot No: CP18-2472
Fötal Bovine Serum	Capricorn Scientific	FBS-11B, 0.1µM filtre edilmiş
Penisilin-Streptomisin	Capricorn Scientific	100X, PS-B, (100 ml)
L-Glutamine	Capricorn Scientific	200 mM, GLN-B (100 ml)
Trypsin-EDTA	Capricorn Scientific	TRY-1B, DBPS içinde
Flask (25cm ²)	Biologix	Polystrene, 07-8025
Flask (75cm ²)	Biologix	Polystrene, 07-8075
15 ve 50 ml Tüp	Biologix	10-9151 (15 ml), 10-0502 (50 ml)
96 kuyuklu plak	Biologix	331196/331296
12 kuyucuklu plak	Sunub	TCP-12
6 kuyucuklu plak	Sunub	TCP-6
Dondurma tüpleri	CryoKING	88-6200
Transfer pipeti	Biologix	30-135A1 (3ml)
Hücre sayım lamı	Neubauer Haemocytometry	68052-14, 68052-15
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck	102952
Fosfat Tuz Tamponu (PBS)	Sigma	P4417, Tablet, (pH: 7,4) (Ca ⁺⁺ ve Mg ⁺⁺ içermeyen)
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA):	Goldbio	E-210-100
Sterilizasyon amaçlı Etil Alkol (%100)	Honeywell	32221-2.5
5 ml ve 10 ml serolojik pipet	Greiner Cellstar	P7615 (5 ml) ve P7740 (10 ml)
Steril Tüpler	Biologix	Farklı büyüklüklerde (0,2;0,5;1,5;2 ml tüpler, Polietilen mikrosantrifüj tüp

2.1.3. 3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid] (MTT) sitotoksisite testi

MTT testi için gerekli malzemeler Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 2.3 MTT testinde kullanılan gereçler

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma	M5655-1g
MTT stok solüsyonu		5 mg toz MTT 1 ml steril PBS içerisinde çözüldü ve filtre edilerek (0,20 µm'lik) kullanıldı
MTT çalışma solüsyonu (96 kuyucuklu plakta bir kuyucuk için)		10 µl MTT solüsyonu (5 mg/1 ml) 90 µl besi yeri karıştırılır ve her bir kuyucuğa eklenir
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck	102952
96 kuyuklu plak	Biologix	331196
MTT lizis solüsyonu	Triton-X (Sigma) HCl (0,1 N Fischer Scientific) İsopropanol (Merck)	Her bir kuyucuğa hazırlanan solüsyondan 100 ml eklenir. 100 ml lizis solüsyonu hazırlanması: Triton X (T8787) (1 ml) HCl (AC 12420-0010) 0,1 N (10 ml) İsopropanol (109634) (89 ml)
Filtre	Sartorius Minisart	16532; 0,22 µm'lik
Steril Tüpler	Biologix	Farklı büyüklüklerde (0,2; 0,5; 1,5; 2 ml'lik), Polietilen mikrosantrifüj tüpler
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

2.1.4. Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu için gerekli malzemeler Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 2.4 Total RNA izolasyonu için gerekli malzemeler

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Trizol	Geneall	RiboEx™, Cat No. 301-001
Kloroform	Merck	102445
İsopropanol (=Propanol-2)	Merck	109634
Etil Alkol	Sigma	3221
Steril Su	BioShop	WAT222.100
Steril Tüpler	Biologix	Farklı büyüklüklerde (0,2; 0,5; 1,5; 2 ml'lik) tüpler, Polietilen mikrosantrifüj tüpler
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma	D5758-50 ml %0,1 konsantrasyonda 100 ml steril distile su (dH ₂ O)'ya 0,1 ml DEPC eklendi. Bu solüsyon oda sıcaklığında 1 saat bekletildi, ardından otoklanıp (15 dakika, 100°C) soğutularak kullanıldı
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

2.1.5. cDNA (Komplementer DNA) izolasyonu

cDNA eldesi için gerekli malzemeler Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 2.5 cDNA eldesi için için gerekli malzemeler

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
cDNA izolasyon kiti	ABT	cDNA Synthesis Kit with RNase Inh. (High Capacity) C03-01-05 (C03-01-05)
Steril Tüpler	Biologix	0,2ml'lik tüpler, Polietilen mikrosantrifüj tüpler
Steril Su	BioShop	WAT222.100
PZR makinesi	Rotor Gene	Gerçek zamanlı PZR aleti cDNA sentezinde kullanılmıştır.
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

2.1.6. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi için gerekli malzemeler Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 2.6 Agaroz jel elektroforezi için gerekli malzemeler

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Tris baz	Goldbio	T-400-500
Borik asit	Vivantis	PR 0607
EDTA	Vivantis	E-210-100
10XTBE solüsyon (pH:7,5)		Tris baz (54 gr), borik asit (27,5) ve 20 ml EDTA (0,5 M) steril distile suda çözülerek 1 litreye tamamlanmıştır.
Agaroz	Genedirex	MB755-0100
%1’lik agaroz		1 g agaroz, 100 ml 1XTBE içerisinde mikro dalga fırın yardımıyla eritilerek hazırlandı. İçerisine 2,5 µl Etidyum bromür (10 mg/ml) karıştırıldı.
Etidyum Bromür	Biotium	40042
Brom fenol mavisi	Ambresco	115-39-9
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

2.1.7. Gerçek zamanlı PZR (RT-PZR)

RT-PZR için gerekli malzemeler Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 2.7 RT-PZR için gerekli malzemeler

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
ABT® RealAmp SYBR qPCR Master mix	ABT	Q05-02-01
Steril Tüpler	Biologix	0,2ml’lik tüpler, Polietilen mikrosantrifüj tüpler
Primer	ABT	HPLC saflaştırma primer
Steril Su	BioShop	WAT222.100
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Farklı büyüklüklerde mikropipet ve uçları

2.1.8. Yara iyileşmesi deneyi

Yara iyileşme için kullanılan malzemeler Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 2.8 Yara iyileşme deneyi için gerekli malzemeler

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
15 ml’lik tüp	Biologix	10-9151 (15 ml)
24 kuyucuklu plak	Sunub	TCP-24
Hücre sayım lamı	Neubauer (Hemocytometer)	68052-14, 68052-15
Steril Tüp	Biologix	Farklı büyüklüklerde (0.5ml, Polietilen mikrosantrifüj tüp
Pipet ve pipet uçları	Biologix	Steri, temiz pipet ve mikropipet uçları (10 ve 200 µl büyüklüğünde)

2.2. Çalışmada Kullanılan Alet/Makineler

Çalışma kapsamında yapılan deneylerde kullanılan alet/makineler Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 2.9 Çalışma kapsamında kullanılan alet/makineler

İsim	Marka	Özellik/Katalog Numarası
Laminar Kabin	Demair	Clas II-TipA
CO2’li incubator	RWD	D180-P
Etüv	MIPRO	MLF-120
İnverted Mikroskop	Olympus	CKX53
Soğutmalı Santrifüj	MRC	CENLBR
Vortex	MRC	SI-100
Hassas Terazî	Dikoman	FGH
Hassas terazî	Radwag	AS220.R2
Isıtmalı plak	MRC	HSD-135
Mikrofüj	INOVIA	MINO-10K
Translimünatör	MRC	UV-26
Elektoroforez Tankı	SCIE-PLAS	SVG-SYS Vari-gel
Güç Kaynağı	Consort	EV231
Mikrodalga Fırın	Arçelik	MD 574
Su banyosu	MIPRO	MCS-30
RT-PZR	Long gene	Q200B
Derin dondurucu (-80 °C)	GMS	ULT-587
Akım Sitometri	Beckman Coulter	EPICS XL MCL,

2.3. Yöntem

2.3.1. Hücre kültürü

T98G ve U87-MG hücre serileri 37°C’de, CO₂’li inkübatörde, steril kültür ortamında, standart kültür şartlarında çoğaltılmıştır. Hücreler, yapılan tüm deneylerde 15’in altında olan düşük pasaj sayısına sahip hücrelerde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Standart kültür işlemleri aşağıda belirtilen süreçler takip edilmiştir.

Hücreler yukarıda belirtilen besi yeri kullanılarak kültür flaskları içerisinde ekilmiş ve çoğaltılmıştır. Flask içerisinde hücre yoğunlukları %70-80 oranına ulaştığında, hücrelerin üzerindeki besi yeri atılarak flasklar 1-2ml PBS (Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ içermeyen) ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında 25 cm²’lik flaska 0.4 ml, 75 cm²’lik flaska 1 ml Trypsin/EDTA eklenmiş, böylece yapışmış olan hücrelerin tripsinasyon işlemi ile birbirlerinden ve flask yüzeyinden ayrılmaları sağlanmıştır. Bu işlem sonrasında hücreler steril serolojik pipet yardımıyla 15 ml’lik falkon tüplerine toplanmıştır. Tüpler 1500 rpm (revolutions per minute, dakikadaki devir sayısı)’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında tüpün üst kısmı atılmış ve hücre pelletinin yoğunluğu da dikkate alınarak ortalama 2ml besi yeri eklenmiştir. Mikropipet yardımıyla (1000 µl’lik) hücrelerin besi yeri ile karışması sağlanmıştır.

Bu işlem sonrasında hücreler Thoma lamı kullanılarak sayılmış ve ardından pasaj ve diğer test süreçlerine geçilmiştir. Hücrelerin dondurularak stoklama yapılması sürecinde ise uygun sayıdaki hücre popülasyonunun üzerine dondurma solüsyonu eklenerek karıştırılmış ve sonrasında özel dondurma tüplerine (cryovial) aktarılmıştır. Bu tüpler, buz içerisinde -20°C’de 1 saat ve -80°C’de 24 saat tutulduktan sonra likit nitrojen bulunan tanklara aktarılmıştır.

2.3.2. Sitotoksikite testi

Sitotoksik etkisi araştırılan DEA/NO’nun sitotoksik etkisinin belirlenmesinde ve inhibitör dozunun (IC₅₀) saptanmasında klasik MTT yöntemi kullanılmıştır. MTT yönteminde aşağıda yer alan protokol izlenmiştir. MTT yöntemi her bir madde için 4 kez ve her bir deneyde 5 tekrarlı olacak biçimde yapılmıştır.

İlgili molekülün uygun konsantrasyonlarının hazırlanması için öncelikle DEA/NO steril suda çözündürülerek DEA/NO için 67.200 μ M ana stok hazırlanmıştır.

Çoğaltılan hücreler tripsinasyon ve sayım işlemleri sonucunda 96'lık plağın her bir kuyucuğuna 8×10^3 olacak biçimde ekilmiştir. Ekim sonrası hücreleri plak tabanına yapışması ve uyum süreci için hücreler bir gece 37°C'de CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda her bir hücre tipinin yer aldığı plaklar hücrelerin hücre döngülerinin eşitlenmesi amacıyla 8 saatlik serum açılığına bırakılmıştır. Bu işlem sayesinde hücreler senesens sürecine girmeden hücre döngülerinin eşitlenmesi sağlanmıştır.

Serum açılığı süreci sonunda, farklı konsantrasyonları hazırlanmış olan DEA/NO hücrelere uygulanmıştır. Yukarıda belirtilen ana stoktan DEA/NO için 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 10000, 13000 μ M konsantrasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan konsantrasyonlar 96 kuyucuklu plağın her bir kuyucuğuna 100 μ l büyüme besi yeri içerisinde olacak biçimde verilmiştir.

Madde uygulanmasından 72 saat sonunda MTT süreci başlatılmıştır. 24 ve 48. saat morfolojik değerlendirme sonunda inhibitör konsantrasyonun tespit edileceği sürenin 72. saat olduğuna karar verilmiştir. Bu nedenle toplam inkübasyon süresi 72 saat olarak seçilmiştir. 72 saat sonunda hücrelerin üzerindeki medium atılmış ve her bir kuyucuğa MTT çalışma solüsyonunda 100 μ l [10 μ l MTT (5 mg/ml) +90 μ l besi yeri] eklenmiştir.

MTT çalışma solüsyonunun eklenmesinden sonra hücreler 37°C'de, CO₂ inkübatörde 3 saat inkübe edilmiştir. Üç saatlik inkübasyon sonunda hücrelerin üzerindeki besi yeri atılmış ve her bir kuyucuğa 100 μ l lizing solüsyonu eklenerek yaşayan hücrelerce oluşturulan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Formazan kristallerinin çözünmesinden sonra plak okuyucu spektrofotometrede plakların her bir kuyucuğunun 570 nm'deki absorbans değerleri tespit edilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri excel ve Graphpad Prism programları kullanılarak IC₅₀ değerleri saptanmıştır.

2.3.3. Hücre göçü deneyi (Yara iyileşmesi, Wound healing)

Hücrelerde DEA/NO'nun hücre göçü üzerine olan etkisinin belirlenmesi için yara iyileşmesi deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 24 kuyucuklu plağın her bir kuyucuğuna 5×10^4 hücre ekimi yapılmıştır. Hücrelerin uyum ve yapışması için plak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki medyum alınarak 200 μ L'lik pipet ucuyla kuyucuğun ortasından artı şeklinde yara (çizik) oluşturulmuştur. Yaranın oluşması flastan kalkan hücrelerin tam olarak ayrılması için medyumla hücreler yıkanmış ve medyum tekrardan ortamdan alınmıştır. Temizleme işlemini takiben hücrelere 5 ng/ml konsantrasyonlarında TGF- β 1; 250, 500 ve 1000 μ M konsantrasyonlarda DEA/NO verilmiştir. Yara oluşumu sonrası oluşturulan yarada hücreler arası mesafe mikroskobun EPview programıyla ölçülmüş ve fotoğraflanmıştır. Yara oluşumu sonrası elde edilen ilk mesafe değeri 0.saat olarak kabul edilmiş ve her 24 saatte bir toplamda 48 saat takip edilmiştir. Burada DEA/NO'nun 250, 500 ve 1000 μ M konsantrasyonlarında kullanılmasının nedeni MTT sonucuna göre bu değerlerde 24 ve 48.saatte proliferasyonlarında kontrol grubuna göre benzer ve/veya yakın proliferasyon değerlerine sahip olmasındandır.

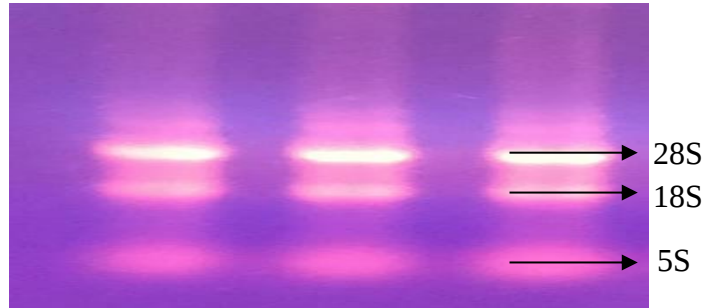
2.3.4. RNA izolasyonu

IC₅₀ değerleri saptanan DEA/NO molekülünün, hücrelerde, EMT genlerinin ekspresyonları üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla total RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla ilgili molekül hücrelere uygulanmış ve IC₅₀ değeri saptanan sürede inkübe edildikten sonra total RNA izolasyonu yapılmıştır. Total RNA izolasyonu için izlenilen Trizol temelli izolasyon protokolü aşağıda yer almaktadır. Hücreler yukarıda belirtilen IC₅₀ değerlerinde hücrelere uygulanmıştır. Bu uygulama için oluşturulan gruplar sırasıyla hiçbir molekül uygulanmayan kontrol grubu ve DEA/NO olmak üzere 2 farklı grup oluşturulmuştur. 25cm²'lik flastlara ortalama 1×10^6 yoğunlukta ekilen hücreler bir gece (16/24 saat) flast tabanına tutunması ve uyum için bir gece inkübe edildikten sonra kontrole herhangi bir madde verilmezken, DEA/NO uygulanacak gruba ise 4000 μ M DEA/NO verildi ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. DEA/NO'nun 4000 μ M seçilme nedeni, sitotoksikite testinde ilgili molekülün hücrelerde %25'lik bir hücre ölümüne neden olduğu doz olmasıdır. Bu sayede eğer DEA/NO EMT sürecini tetikliyorsa hem kısmi ölümün olduğu dozda bu tetiklenmeyi saptayabilmektir.

72. saatin sonunda hücreler tripsine edilerek, toplandı ve ardından Trizol-Koloroform-İzopropilalkol ve etilalkol prosedürü kullanılarak total RNA izole edilmiştir. Buna göre 72. saatin sonunda tripsine edilerek toplanan hücreler 1500 rpm'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatant kısmı atılarak üzerine 2 ml steril soğuk PBS (Ca^{++} ve Mg^{++} içermeyen) eklenerek, 1000 μl 'lik pipet yardımıyla pipetaj yapılarak karışması sağlandı. Bu basamaktan sonraki işlemler aksi belirtilmedikçe buz üzerinde devam edilmiştir. PBS içeren 15ml'lik falkon tüpler 1500 rpm'de 5 dakika +4°C'de tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst kısım atılarak tüpün içerisinde bulunan hücrelere 1000 μl soğuk Trizol eklendi ve mikropipet yardımıyla homojenize edildi. Bu karışım 1,5ml'lik steril tüpe alınmıştır. Bu aşamadan sonra klasik Trizol-Koloroform-izopropilalkol ve etilalkol prosedürü uygulanmıştır. Total RNA elde edildikten sonra RNA 30-50 μl DEPC'li su ile çözülmüştür. Ayrıca elde edilen total RNA'nın görüntülenmesi için 3-5 μl RNA başka bir steril tüpe alınmış ve tüm RNA'lar cDNA sentezi yapılana kadar -80°C'ye kaldırılmıştır.

2.3.5. RNA'nın kalitatif değerlendirilmesi

Total RNA'ların kalitatif değerlendirilmesi (parçalanma olup olmadığının anlaşılması gibi) amacıyla total RNA'lardan ortalama 3-5 μl RNA agaroz jel (%1'lik) elektroforezinde yürütülmüştür. Yürütme sonrası elde edilen görüntülerde 28S (Sedimentasyon), 18S ve 5S RNA net bir şekilde saptanmıştır (Şekil 1).



Şekil 2.1 Hücrelerden elde edilen total RNA'nın görüntüsü

2.3.6. cDNA izolasyonu

Hücrelerden elde edilen total RNA'dan ekspresyon analizi yapmak için öncelikle bu RNA'lardan cDNA elde edilmesi gerekmektedir. cDNA sentezi için cDNA Synthesis Kit with RNase Inh. (High Capacity) (C03-01-05) kullanılmıştır (Tablo 10). Bu kitin

önerdiği protokol uygulanarak her bir gruba ait örneklerin 1µg RNA'sından cDNA elde edilmiştir. cDNA sentezi için izlenilen protokol aşağıda yer almaktadır.

Tablo 2.10 cDNA sentez protokolüne göre reaksiyon içerikleri

10X Reaction Buffer	2 µl
dNTP mix (2.5 mM each)	1 µl
Random hexamer (50 µM)	2 µl
Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1 µl
RNase Inhibitor	0.5 µl
RNase free Water	3.5 µl
RNA Template	10 µl

0.2ml'lik steril tüp içerisinde hazırlanan reaksiyon içeriği PZR cihazı kullanılarak 25°C 10 dk, 37°C 120 dk, 85°C 5 dk ve 4°C 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda elde edilen cDNA'lar RT-PZR'da kullanılabilecek kadar -20°C'de saklanmıştır.

2.3.7. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time-PZR; RT-PZR)

Elde edilen cDNA'larda araştırılması planlanan genlerin ekspresyonlarının saptanması amacıyla RT-PZR yapılmıştır. Bu amaçla ABT® RealAmp SYBR qPCR Master mix kitinin protokolü izlenmiştir (Tablo 11). Hedef genlere karşı kontrol geni olarak GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) geni her iki serisi için de kullanılmıştır. Ekspresyonu araştırılan genlerin RT-PZR'da kullanılan primer dizileri Tablo 12'de verilmiştir. RT-PZR'de genlerin annealing sıcaklıkları arasında farklılıklar bulunmaktadır. Her örnek için 3 bağımsız tekrar yapılmıştır ve her reaksiyonda amplifikasyon erime eğrisi (melting curve) analizi yapılmıştır. Örnek erime eğrileri Şekil 5 ve 6'da sunulmuştur.

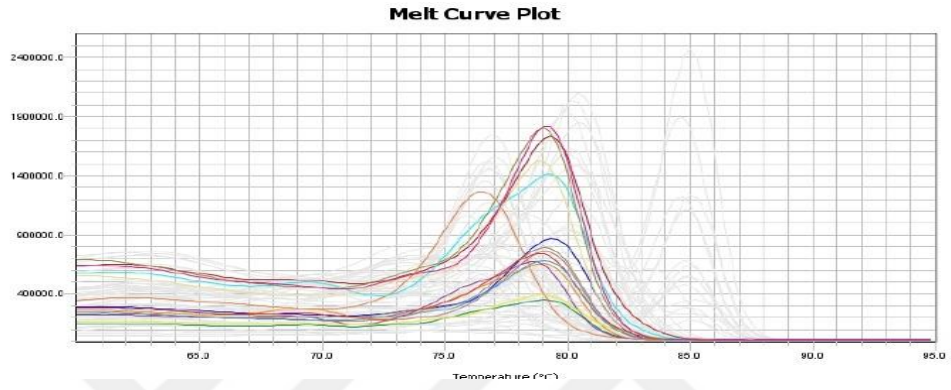
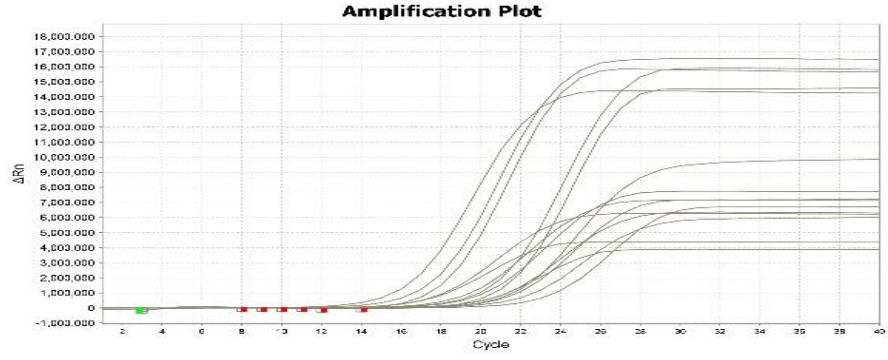
Ekspresyonlar arası rölatif farklılığın saptanmasında $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülasyonu kullanılmış buradan ekspresyonlar arası kat değişimleri saptanmıştır. Reaksiyon içerikleri hem hedef hem de kontrol geni (housekeeping) için aynıdır.

Tablo 2 11 RT-PZR için reaksiyon içeriği

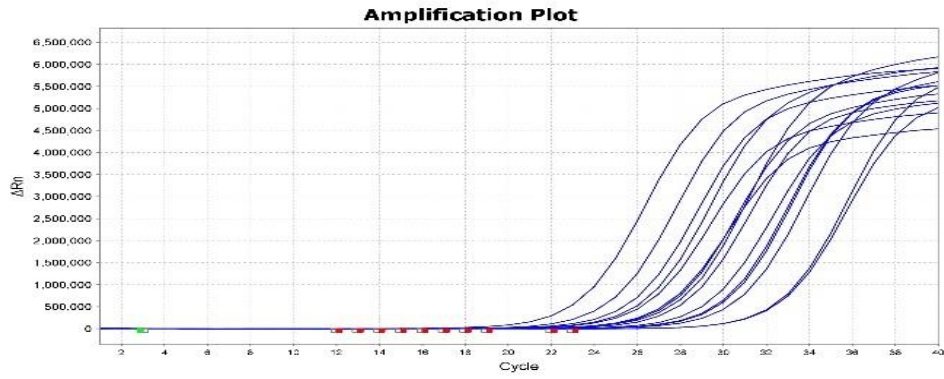
Reaksiyon içeriği	Bir örnek için	Reaksiyon Döngüsü (Genel)
Tampon (2X) SYBR qPCR master miks	10 µl	1-95°C 5' denatürasyon (1 döngü) 2-95°C 15" 3-55°C (54-62°C, gene göre değişkenlik gösterdi) 50" 4-72°C 30" 40 döngü (2'den 4'e) Meting Curve (erime eğrisi) Analizi Ramp: 50-99 (0.5°C artış, her basamakta 3 saniye) 90 °C 5 saniye
Primerler	Forward: 0.5 µl (10pmol/µl) Reverse: 0,5µl (10pmol/µl)	
dH2O	7 µl	
cDNA	2 µl	
Toplam	20 µl	

Tablo 2.12 RT-PZR ile ekspresyonu araştırılan genlerin primer dizileri

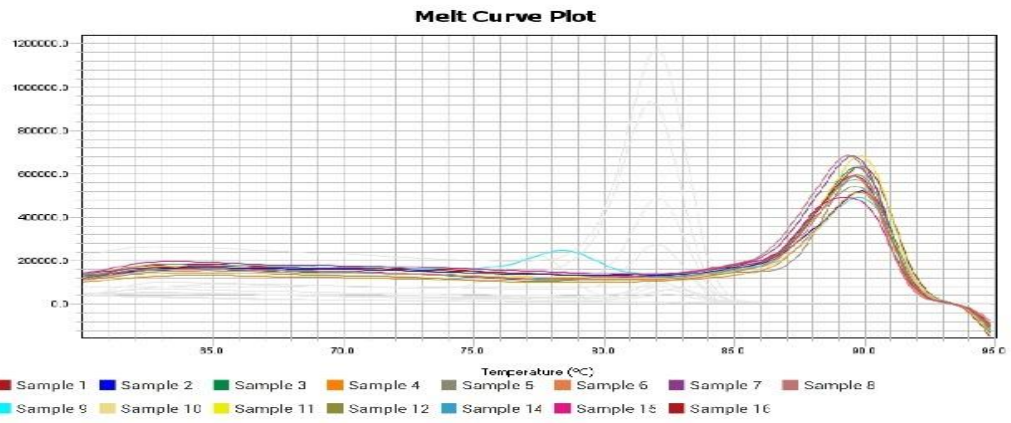
Gen	Sense	Antisense	Ürün Büyüklüğü (bp)	NCBI Referans Kodu
E-Kaderin	F:5'-tacaacgacccaaccaaga	R: 5'-tcacacacgctgacctctaa	137	NM_001317185
Vimentin	F:5'-ttgaacgcaaagtgggaatctt	R:5'-aggtcagcaaactggatttgta	235	NM_003380.5
N-Kaderin	F:5'-tattttgcccccaatcctaa	R: 5'-ttttcacatttggtgattctcg	217	XM_054318138.1
SnailI	F:5'-tctaaccagagtttacctcca	R: 5'-ttgttcagttattgcagttga	410	NM_005985.4
Snail2	F:5'-ttcaaggacacattagaactcaca	R: 5'-aaggttttggagcagtttttg	151	NM_003068.5
Twist1	F:5'tgtttccagagaaggagaaatgg	R: 5'aatgcagaggtgtgaggatggt	216	NM_000474.4
ACTB	F:5'-catcctcacctgaagtacc	R: 5'tgaaggctcctcaacatgatctg	194	NM_001101.5



Şekil 2. 2 Vimentin geninin ekspresyon eğrisi ve amplifikasyon erime eğrisi (melting curve)



■ ACTB



■ Sample 1 ■ Sample 2 ■ Sample 3 ■ Sample 4 ■ Sample 5 ■ Sample 6 ■ Sample 7 ■ Sample 8
■ Sample 9 ■ Sample 10 ■ Sample 11 ■ Sample 12 ■ Sample 14 ■ Sample 15 ■ Sample 16

Şekil 2. 3 ACTB geninin ekspresyon eğrisi ve amplifikasyon erime eğrisi (melting curve)

2.4. İstatistiksel Analiz

Denek sayısına bağılı olarak parametrik olmayan test yöntemleri kullanılmıştır. Bu amaçla ikiden fazla bağımsız grubun sürekli değerler bakımından karşılaştırılması amacıyla Kruskal Wallis testinden faydalanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılığın bulunması durumunda, farklılığı yaratan grupların tespitinde Dunn'ın post-hoc çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Frekans dağılımlarının gruplar arasındaki homojenliğinin test edilmesi amacıyla Ki-kare ve/veya Fisher'in exact testi kullanılmıştır. Sürekli değişkenler kullanılan test yöntemine uygun olarak ortanca (Minimum-Maksimum) ile kategorik değişkenler ise frekans dağılımları ve yüzdelikler ile özetlenmiştir. İstatistik anlamlılık sınırının $p < 0,05$ olarak alındığı çalışmada, elde edilen verilerin değerlendirilmesi amacıyla IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. kullanılmıştır.

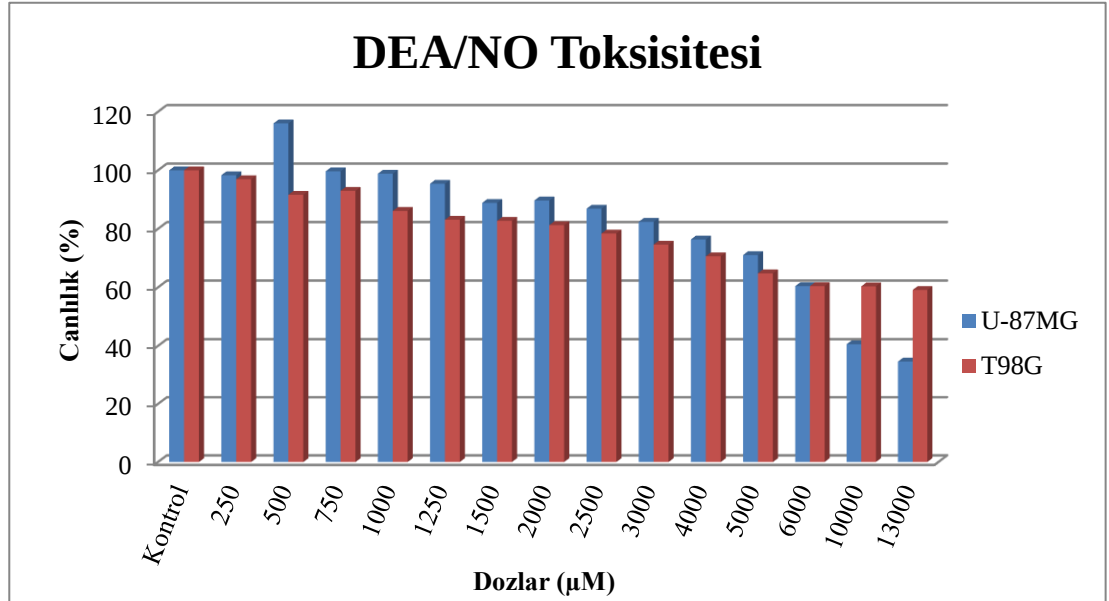
3. BULGULAR

3.1. DEA/NO Sitotoksitesi

Tez çalışmasında kullanılan DEA/NO'nun T98G ve U-87 MG hücre serileri üzerindeki sitotoksik değerleri (Tablo 13) ve bu değerlerin elde edildiği canlılık eğrisi (Şekil.7) aşağıda sunulmuştur. Kullanılan DEA/No bir MGMT inhibitörüdür ve sitotoksosite sonuçlarına göre MGMT eksprese etmeyen U87-MG hücresinin DEA/NO'ya MGMT eksprese eden ve TMZ gibi alkilasyon ajanına dirençli olduğu bilinen T98G hücresine göre daha sensitif olduğu belirlenmiştir. Sitotoksosite sonuçlarına göre hücrelerde EMT ile ilgili hedef genlerin ekspresyonlarının analizinde DEA/NO'nun 4000 μ M olarak kullanılmasına karar verilmiştir. Çünkü, 4000 μ M DEA/NO'da hem hücre popülasyonu %70-80 oranındadır. Böylece hem yaşayan hücrelerin varsa EMT genlerindeki değişim rahatlıkla saptanabilir. Eğer IC50 değerini uygulaysaydık hücrelerin büyük yarısı ölecek ve canlı hücre popülasyonu daha az saptanmış olacaktır.

Tablo 3.1 DEA/NO'nun Sitotoksosite Verileri (72.saat)

Hücre Serisi	DEA/NO, IC ₅₀ (μ M)
T98G	13024,33
U-87 MG	9020,69

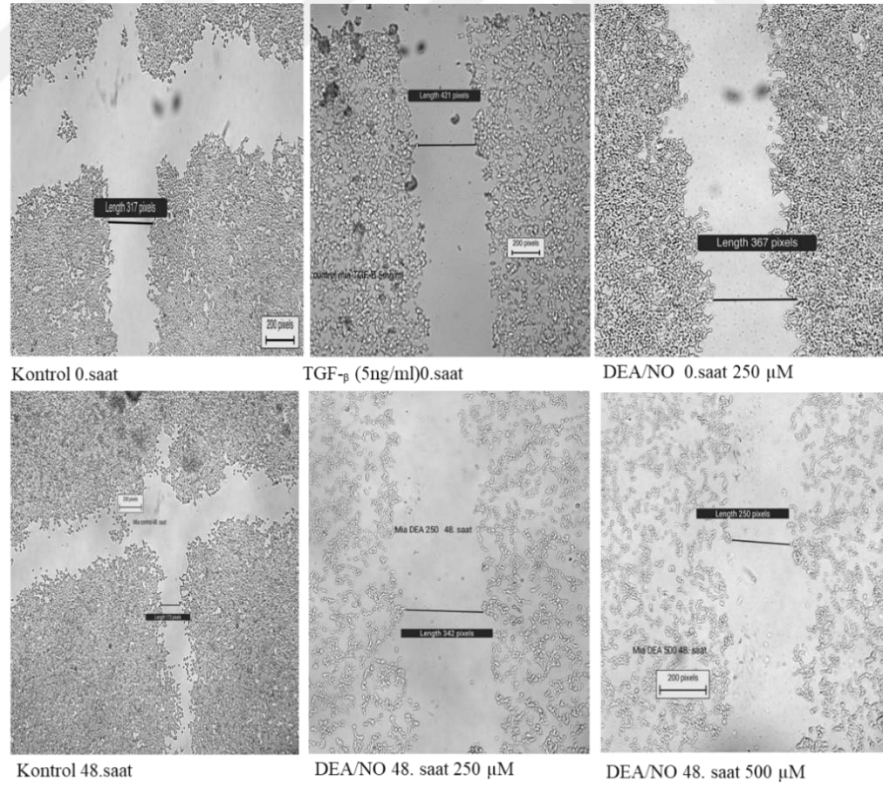


Şekil 3.1 DEA/NO'nun T98G ve U-87 MG hücre serisindeki sitotoksitesi

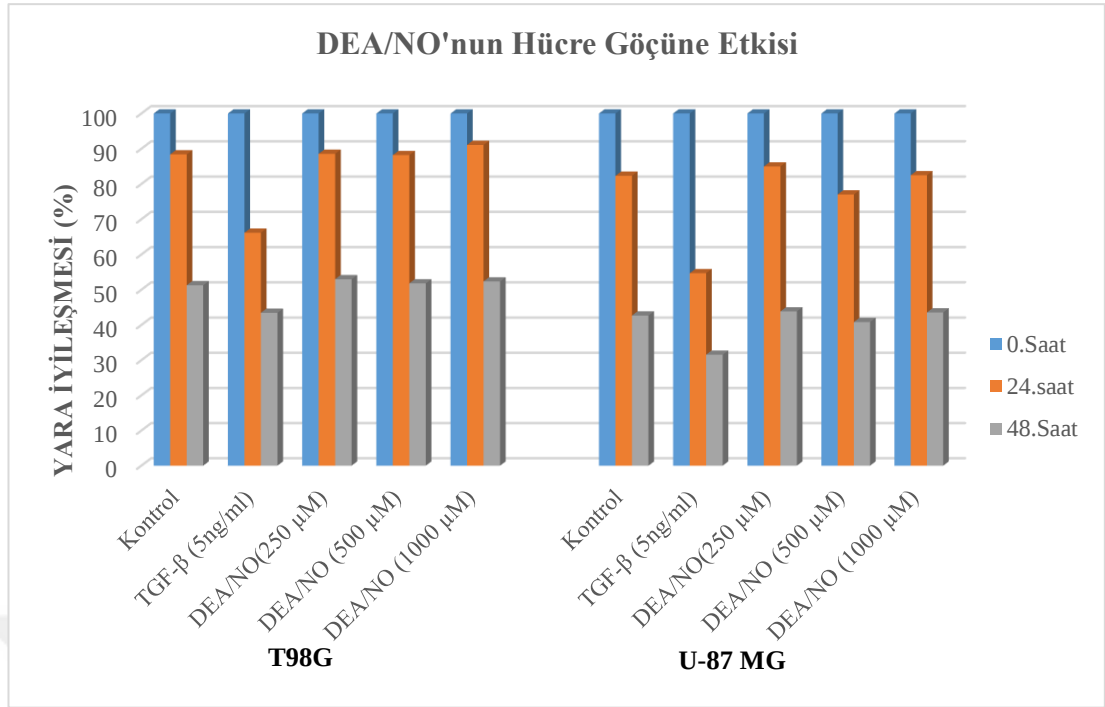
1-13.000 μM arasında farklı konsantrasyonlarda hazırlanan DEA/NO hücreler sunulmuş ve 72.saat inkübasyon sonunda canlılık-doz grafiği elde edilmiştir. Hücrelerin %50'sinin öldüğü doz DEA/NO için IC50 dozu olarak tespit edilmiştir.

3.2. Yara İyileşmesi Deneyi

Hücrelerde mikropipet ucuyla oluşturulan çizik bölgesinin (yaranın) 0., 24. ve 48.saat ölçümü mikroskobun programı üzerinden piksel cinsinden yapıldıktan sonra yapıldıktan sonra elde edilen veriler kontrole göre yüzde olarak değerlendirilmiştir. Yapılan deneyde ilişkin örnek ölçümler Şekil 8 de verilmiştir. Yapılan 5ng/ml TGF- β kullanılan hücrelerde hücre göçü kontrole ve diğer gruplara göre erken kapanmıştır. DEA/NO'nun hücre serilerinde hücre göçü üzerindeki etkisi birbirinden farklılık göstermiştir. U-87 MG hücrelerinde hem 24 hem de 48.saatteki kapanma mesafesi T98G hücrelerine göre daha düşüktür. U87-MG hücre serisinde DEA/NO'nun hücre göçüne etkisi T98G hücre serisine göre daha yüksek bulunmuştur (Şekil 8). Ayrıca TGF- β 'nın U-87 MG hücre serisindeki hücre göçü tetiklemesinin T98G hücre serisine göre daha etkili olduğu saptanmıştır.



Şekil 3.2 Hücrelerde oluşturulan yaranın hücre göçü ile kapanmasının mikroskop ile takibi ve yara büyüklüğünün piksel cinsinden ölçümü.



Şekil 3. 3 DEA/NO'nun T98G ve U-87 MG hücrelerinde hücre göçüne etkisi.

3.3. Gen Ekspresyon Analizi

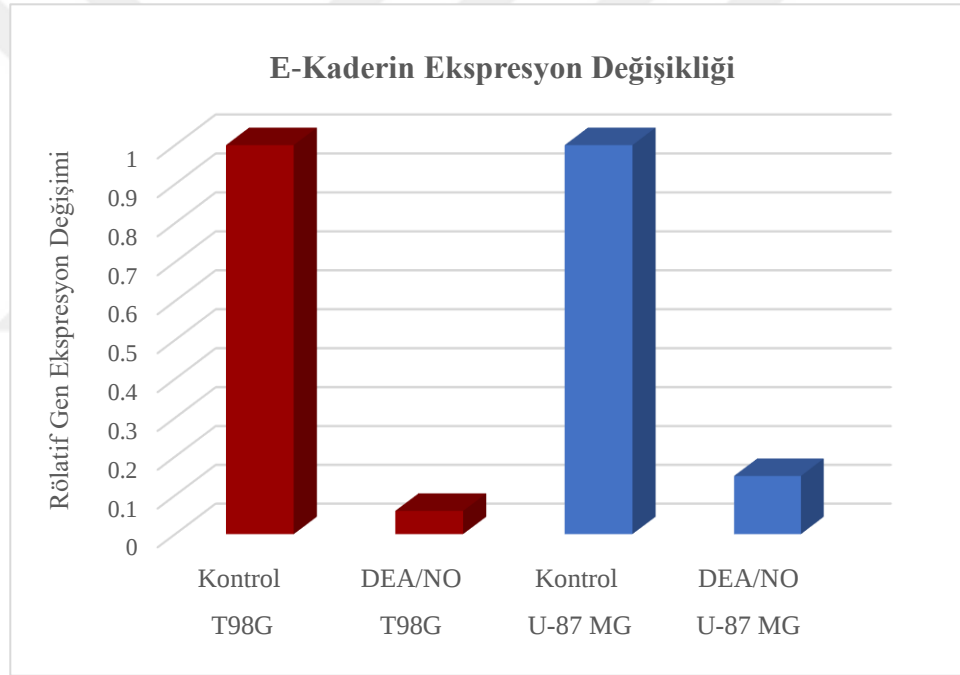
Sitotoksosite sonuçlarına göre hücrelerde EMT ile ilgili hedef genlerin ekspresyonlarının analizinde DEA/NO'nun 4000 μM olarak kullanılmasına karar verilmiştir. Çünkü, 4000 μM DEA/NO'da hücre popülasyonu %70-80 oranındadır. Böylece yaşayan hücrelerin varsa EMT genlerindeki değişim rahatlıkla saptanabilir. Eğer IC50 değerini uygulaysaydık hücrelerin yarısı ölecek ve canlı kalan ancak ölümü tetiklenen hücrelerde de ekspresyon değişikliği araştırmış olacaktık.

3.4. Epitelyal Özellik İçin Gen Ekspresyonu

Epitelyal karakterin analizi için E-kaderin genin ekspresyon değişikliği Şekil 8'de verilmiştir. Her iki hücre serisinde de DEA/NO kontrole göre E-kaderin ekspresyonu istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde azalmıştır ($p < 0,001$).

Tablo 3. 2 EMT genlerinin ekspresyonlarının gruplara göre karşılaştırılması

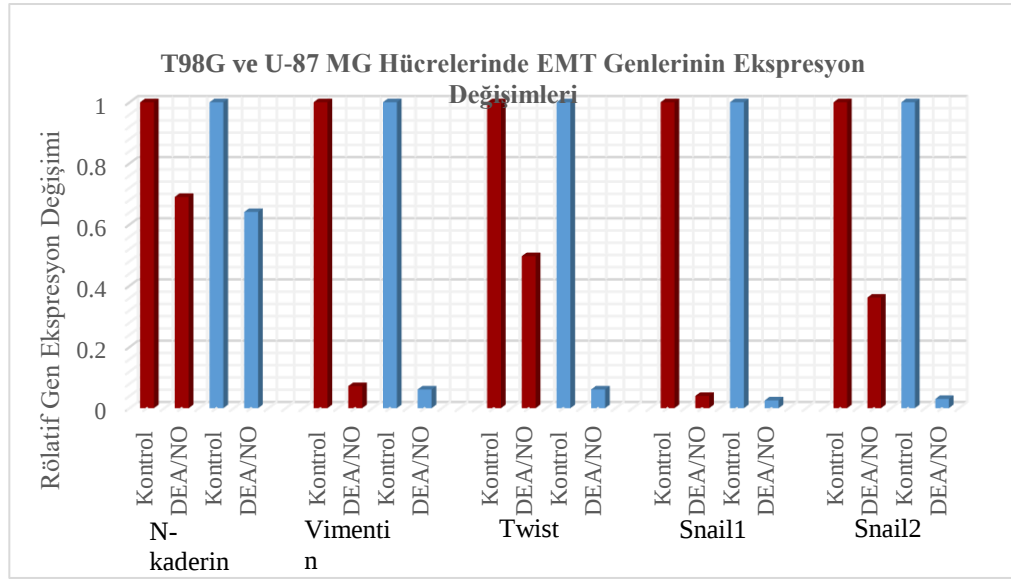
Genler	Kontrol	T98, DEA/NO	U-87 MG, DEA/NO	p1	p2
E-kaderin	1±0	0,04±0,33	014±0,05	<0,001	<0,001
N-kaderin	1±0	0,79±0,10	0,65±0,12	0,026	<0,008
Vimentin	1±0	0,70±0,10	0,63±0,25	<0,001	<0,001
Twist	1±0	0,58±0,79	0,06±0,25	0,001	<0,001
Snail1	1±0	0,17±0,19	0,51±0,02	<0,001	<0,001
Snail2	1±0	0,46±0,10	0,12±0,15	0,001	<0,001
p1: Kontrol vs T98 p2: Kontrol vs U-87 MG					



Şekil 3.4 E-kaderin genindeki ekspresyon değişikliği.

3.5. Mezenkimal Özellik İçin Gen Ekspresyonu

Hücrelerde DEA/NO uygulaması sonrası meydana gelen gen ekspresyon analizi Şekil 9'da verilmiştir. DEA/NO her iki hücre serisinde de EMT genlerinin ekspresyonunu kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p<0,05$) (Tablo I). Rölatif gen ekspresyon değişiklikleri her ki hücre serisinde de benzerdir. Dolayısıyla DEA/NO T98G ve U-87 MG hücrelerinde EMT sürecini tetiklememektedir.



Şekil 3.5 T98G ve U-87 MG Hücrelerinde EMT Genlerinin Ekspresyon Değişimleri. Kırmızı bar: T98G hücre serisi, Mavi bar: U-87 MG hücre serisi, DEA/NO: Dietilamin NONOate

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında MGMT inhibitörü DEA/NO'nun T98G ve U-87MG glioblastoma hücrelerinde EMT mekanizmasını indükleyip indüklenmediği DEA/NO'nun sitotoksitesi belirlendikten sonra yara iyileşmesi ve EMT genlerinin ekspresyonunun incelenmesiyle araştırılmıştır.

Glioblastomanın gelişen teknolojik ilerlemelere rağmen halen kesin bir tedavisi bulunmamaktadır. Glioblastomada alkilasyon tedavisinde karşılaşılan kemoterapötik direncin en büyük etkeni MGMT proteindir (Kirstein vd., 2021). MGMT inhibisyonu ile özellikle TMZ temelli alkilasyon tedavisinin başarısının artması beklenmektedir (Shindo vd., 2016; Gulati vd., 2020). Bu konuda yapılan preklinik ve klinik çalışmalar TMZ ile MGMT inhibitörlerinin kullanılabileceğini ama optimize edilmesi gereken yerlerin de olduğunu belirtmektedir (Quinn vd., 2009; Taspınar vd., 2013; St-Coeur vd., 2015; Akcora-Yildiz vd., 2024; Yun vd., 2024) Çünkü bu MGMT inhibisyonu yapan moleküller genelde kendi başlarına toksik değil ama bir toksik ajanla kullanıldığında ise ilgili ajanın toksisitesini arttırabilmektedir (Tawbi vd., 2011) Ayrıca, bir MGMT inhibitörü olan lomeguatribin de TMZ ile verildiği glioblastoma dışındaki bazı kanser türlerinde etkin bir toksisiteye ulaşamadığı da bildirilmektedir (Ranson., 2007; Khan vd, 2008; Kefford vd., 2009). MGMT inhibitörlerinin kullanımı ve önemi hakkındaki bu veriler MGMT inhibitörlerinin fizyolojik etkilerinin ortaya konmadığını göstermektedir. MGMT inhibisyonu dışındaki hücre fizyolojisi açısından etkilerinin tam olarak bilinmemesidir. Çalışmalar ağırlıklı olarak MGMT eksprese eden hücrelerde yapılmaktadır (Kirstein vd., 2021; Yun vd., 2024). MGMT inhibitörlerinin kullanımındaki sonuçların net olarak anlaşılması ve açıklanması için bu moleküllerin MGMT eksprese etmeyen hücrelerde de araştırılması varsa farklı hücresel fonksiyonları da ortaya konması gerekmektedir. Bu nedenle, tez çalışmasında DEA/NO hem MGMT eksprese eden T98G hem de etmeyen U-87 MG hücre serisinde araştırılmıştır. Amacımız DEA/NO hedef dışı bir fonksiyonunun olup olmadığının ipuçlarını elde etmektir.

DEA/NO'nun kanser hücrelerindeki sitotoksik etkileri ile ilgili literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır. Kokilakanit vd. (2024) tarafından yapılan çalışmada DEA/NO'nun 4 farklı baş boyun kanseri hücre serilerinde 500 µM DEA/NO uygulanınca bazı hücrelerde sitotoksik iken bazılarında sitotoksikite saptanmadığı

bildirilmiştir. DEA/NO'nun hücre çeşidine göre farklı bir sitotoksik etki göstermiştir. Bu tez çalışmasında da her iki hücre serisinde farklı sitotoksik etki göstermiştir ve 1000 μM 'a kadar olan dozlarda sitotoksikite saptanmamıştır. Bu açıdan sonucumuz literatürle uyumludur. Ayrıca DEA/NO'nun hücre kültürü şartlarında sitotoksik bir molekül olmadığı da anlaşılmıştır.

NO donörlerinin rat C6 glioma hücrelerinin klonojenik potansiyelini azalttığını ve NO donörlerinin glioblastoma tedavisinde TMZ ile verilebileceğini bildirmektedir (Yang vd., 2007). Glioma mikrovaskülerine nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimlerince (NOS1, NOS2 ve NOS3) NO salınımı yapılabileceği bunun da glioma hücrelerinin büyüme, invazyon, farklılaşma, immün baskılama ve terapötik direnci etkileyebileceği belirtilmektedir (Tran vd., 2017). Bu nedenle de bu tez çalışmasında NO vericisinin glioblastoma hücrelerindeki etkileri araştırılmıştır. İnsan glioma hücrelerinde DEANO'nun sitotoksik etkileri ile ilgili literatürde yalnızca bir adet çalışma yer almaktadır. Weyerbrock vd., (2009) tarafından yapılan çalışmada U87 MG hücre serisinde DEA/NO'nun küçük dozlarda (10-12M)'da sitoprotektif olduğu ve 10.000 μM 'da ise hücre ölümünü indüklediği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da 10 μM altında proliferatif etki gösteren DEA/NO'nun yüksek dozlarda hücre ölümünü indüklediği saptanmıştır. Bu tez çalışmasında da ilk ölümler 100-1500 μM 'da başlamıştır. Bu nedenle elde edilen sitotoksik veriler Weyerbrock vd (2009) çalışması ile uyumludur. Ayrıca, bu tez çalışmasında MGMT eksprese eden T98G hücre serisinin MGMT eksprese etmeyen U-87 MG hücre serisine göre daha dirençli olduğu saptanmıştır. Bu sonuç NO donörünün MGMT'den bağımsız hücresel fonksiyonlarının olabileceğini göstermektedir.

EMT, geri dönüşümlü bir hücresel programlanma olup, epitel karakterli hücrelerin mezenkimal karakter ve fenotip kazanma süreci olarak tanımlanır. Epitel hücreler bu süreçte hücre-hücre bağlarını kaybederler, ekstraselüler matriks parçalanır, bazal membran ve hücre iskelet yapıları yeniden düzenlenerek göç kabiliyeti yüksek, daha invaziv ve apoptoza dirençli hücreler haline gelirler (Majc vd., 2020). EMT süreci bazı indükleyici transkripsiyon faktörleri (EMT-TF'ler) tarafından kontrol edilir ve bu da hücre geçişini kontrol eden genlerin ekspresyonunda değişikliklere yol açar. Genel olarak E-kaderin, okkludinler ve kludinlerin ekspresyonu azalırken, N-kaderin, Vimentin, fibronektin, β -integrinler ve ekstraselüler matriksin degradasyonunu

sağlayacak proteazları ekspresyonları artar. Bu ekspresyon değışiklikler zeb, snail1, snail2, slug ve twist gibi transkripsiyon faktörlerince kontrol edilir (Kubelt vd., 2015; Majc vd., 2020). EMT ile hücrelerin kemoterapi ve radyoterapiye direnç kazanımına katkı sunar (Iwadate, 2016). Glioblastomada da bu genlerin yanı sıra kök hücre belirteçlerinin arttığı da bilinmektedir (Iwadate Y., 2016).



KAYNAKÇA

- A Kalluri, R., ve Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1420-1428.
- Akcora-Yildiz, D., Ozkan, T., Cetintav, B., Yukselten, Y., Calis, S., Sevim-Nalkiran, H., ve Sunguroglu, A. (2024). Inhibition of O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) by lomeguatrib reduces multiple myeloma cell viability and impairs DNA repair in MGMT-proficient cells. *Chemical Biology ve Drug Design*, 103(2), e14465.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., ve Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *nature*, 444(7120), 756-760.
- Bhowmik, R., ve Roy, M. (2024). Recent advances on the development of NO-releasing molecules (NORMs) for biomedical applications. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 116217.
- Biserova, K., Jakovlevs, A., Uljanovs, R., ve Strumfa, I. (2021). Cancer stem cells: significance in origin, pathogenesis and treatment of glioblastoma. *Cells*, 10(3), 621.
- Brandner, S., McAleenan, A., Kelly, C., Spiga, F., Cheng, HY, Dawson, S., ve Kurian, KM (2021). Temozolomid ile tedavi edilen glioblastomalı kişilerde genel sağkalımı tahmin etmek için MGMT promotörü metilasyon testi: Cochrane Sistematik İncelemesine dayanan kapsamlı bir meta-analiz. *Nöro-Onkoloji*, 23 (9), 1457-1469.
- Dongre, A., ve Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(2), 69-84.
- Drugbank Online. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01206> . 04.03.2024
- Gulati, I., Patel, H., Prabhakar, B., ve Nair, S. (2020). Current translational insights into MGMT methylation regulating temozolomide sensitivity and resistance in glioblastoma multiforme. *Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine (Formerly Current Pharmacogenomics)*, 17(2), 76-93.
- Hegi, ME, Diserens, AC, Gorlia, T., Hamou, MF, De Tribolet, N., Weller, M., ve Stupp, R. (2005). MGMT geninin susturulması ve glioblastomada temozolomidden faydalanılması. *New England Tıp Dergisi*, 352 (10), 997-1003.
- Hindle, A., Koneru, B., Makena, M. R., Lopez-Barcons, L., Chen, W. H., Nguyen, T. H., ve Reynolds, C. P. (2021). The O6-methylguanine-DNA methyltransferase inhibitor O6-benzylguanine enhanced activity of temozolomide+ irinotecan against models of high-risk neuroblastoma. *Anti-cancer drugs*, 32(3), 233-247.

- Isom, G. L., Coudray, N., MacRae, M. R., McManus, C. T., Ekiert, D. C., ve Bhabha, G. (2020). LetB structure reveals a tunnel for lipid transport across the bacterial envelope. *Cell*, 181(3), 653-664.
- Iwade Y. (2016). Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncology letters*, 11(3), 1615–1620. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4113>
- Johnson, B. E., Mazor, T., Hong, C., Barnes, M., Aihara, K., McLean, C. Y., ve Costello, J. F. (2014). Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science*, 343(6167), 189-193.
- Johnson, T. C., Zahid, M., Liu, C., Zhu, Y., Tan, H. J., ve Li, J. (2021). Challenges and Opportunities in MGMT Inhibitor Development for Cancer Therapy. *Pharmacological Reviews*, 73(2), 478-504. DOI: 10.1124/pharmrev.120.000100
- Kalluri, R., ve Neilson, E. G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 112(12), 1776-1784.
- Kanderi, T., ve Gupta, V. (2022). Glioblastoma Multiforme. In StatPearls. *StatPearls Publishing*.
- Kefford, R. F., Thomas, N. P. B., Corrie, P. G., Palmer, C., Abdi, E., Kotasek, D., ve Middleton, M. R. (2009). A phase I study of extended dosing with lomeguatrib with temozolomide in patients with advanced melanoma. *British journal of cancer*, 100(8), 1245-1249.
- Khan, O. A., Ranson, M., Michael, M., Olver, I., Levitt, N. C., Mortimer, P., ve Middleton, M. R. (2008). A phase II trial of lomeguatrib and temozolomide in metastatic colorectal cancer. *British journal of cancer*, 98(10), 1614-1618.
- Kirstein, A., Schilling, D., Combs, S. E., ve Schmid, T. E. (2021). Lomeguatrib increases the radiosensitivity of MGMT unmethylated human glioblastoma multiforme cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6781.
- Kokilakanit, P., Koontongkaew, S., ve Utispan, K. (2024). Nitric oxide has diverse effects on head and neck cancer cell proliferation and glycolysis. *Biomedical Reports*, 21(1), 1-8.
- Kubelt, C., Hattermann, K., Sebens, S., Mehdorn, H. M., ve Held-Feindt, J. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition in paired human primary and recurrent glioblastomas. *International journal of oncology*, 46(6), 2515–2525. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2944>
- Lagas, J. S., van Waterschoot, R. A., Sparidans, R. W., Wagenaar, E., Beijnen, J. H., ve Schinkel, A. H. (2010). Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein limit sorafenib brain accumulation. *Molecular cancer therapeutics*, 9(2), 319-326.
- Liu, C. Y., Lin, H. H., Tang, M. J., ve Wang, Y. K. (2015). Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget*, 6(18), 15966.

- Liu, QL, Luo, M., Huang, C., Chen, HN ve Zhou, ZG (2021). Kanser metastatik kaskadında epitelialden mezenkimal geçişin epigenetik düzenlenmesi: kanser tedavisi için çıkarımlar *Onkolojide sınırlar*, 11, 657546.
- Loh, C. Y., Chai, J. Y., Tang, T. F., Wong, W. F., Sethi, G., Shanmugam, M. K., ve Looi, C. Y. (2019). The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: signaling, therapeutic implications, and challenges. *Cells*, 8(10), 1118.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., ve Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta neuropathologica*, 131, 803-820.
- Majc, B., Sever, T., Zarić, M., Breznik, B., Turk, B., ve Lah, T. T. (2020). Epithelial-to-mesenchymal transition as the driver of changing carcinoma and glioblastoma microenvironment. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1867(10), 118782. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118782>
- Majd, N. K., Yap, T. A., Koul, D., Balasubramanian, V., Li, X., Khan, S., Gandy, K. S., Yung, W. K. A., ve de Groot, J. F. (2021). The promise of DNA damage response inhibitors for the treatment of glioblastoma. *Neuro-oncology advances*, 3(1), vdab015. <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdab015>
- Nieto, MA, Huang, RYJ, Jackson, RA ve Thiery, JP (2016). EMT: 2016. *hücre*, 166 (1), 21-45.
- Ostrom, Q. T., Patil, N., Cioffi, G., Waite, K., Kruchko, C., ve Barnholtz-Sloan, J. S. (2020). CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2013–2017. *Neuro-oncology*, 22(Supplement_1), iv1-iv96.
- Ou, A., Yung, W. A., ve Majd, N. (2020). Molecular mechanisms of treatment resistance in glioblastoma. *International journal of molecular sciences*, 22(1), 351.
- Pagani, E., Falcinelli, S., Pepponi, R., Turriziani, M., Caporaso, P., Caporali, S., Bonmassar, E., ve D'Atri, S. (2007). Combined effect of temozolomide and hyperthermia on human melanoma cell growth and O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity. *International journal of oncology*, 30(2), 443–451.
- Pegg, A. E. (2011). Multifaceted roles of alkyltransferase and related proteins in DNA repair, DNA damage, resistance to chemotherapy, and research tools. *Chemical Research in Toxicology*, 24(5), 618-639.)
- Peinado, H., García del Portillo, F., ve Cano, A. (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis
- Quinn, J. A., Jiang, S. X., Reardon, D. A., Desjardins, A., Vredenburgh, J. J., Rich, J. N., ve Friedman, H. S. (2009). Phase II trial of temozolomide plus o6-

- benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma. *Journal of clinical oncology*, 27(8), 1262.
- Ranson, M., Hersey, P., Thompson, D., Beith, J., McArthur, G. A., Haydon, A., ve Middleton, M. R. (2007). Randomized trial of the combination of lomeguatrib and temozolomide compared with temozolomide alone in chemotherapy naive patients with metastatic cutaneous melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 25(18), 2540-2545.
- Richard, C., Fumet, J. D., Chevrier, S., Derangère, V., Ledys, F., Lagrange, A., ve Ghiringhelli, F. (2019). Exome analysis reveals genomic markers associated with better efficacy of nivolumab in lung cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 25(3), 957-966.
- Robey, R. W., Pluchino, K. M., Hall, M. D., Fojo, A. T., Bates, S. E., ve Gottesman, M. M. (2018). Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18(7), 452-464.
- Roskoski Jr, R. (2021). Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2021 update. *Pharmacological research*, 165, 105463.
- Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Gen. Müd. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/Dokumanlar/Istatistikler/KanserRapor_2018.pdf . 04.03.2024
- Shindo, M., Sato, A., Yamamoto, Y., Arai, T., Akasaki, Y., Ichimura, K., ve Tanuma, S. I. (2016). Establishing a screening system for new O6-methylguanine-DNA methyltransferase inhibitors to develop combination chemotherapy for temozolomide-resistant glioblastoma. *Tokyo Jikeikai Medical Journal*, 131(5), 141-147.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., ve Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(1), 7-30.
- Singh, A., ve Settleman, J. E. M. T. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 29(34), 4741-4751.
- Singh, M., Yelle, N., Venugopal, C., ve Singh, S. K. (2018). EMT: Mechanisms and therapeutic implications. *Pharmacology ve therapeutics*, 182, 80-94.
- St-Coeur, P. D., Poitras, J. J., Cuperlovic-Culf, M., Touaibia, M., ve Morin, P., Jr (2015). Investigating a signature of temozolomide resistance in GBM cell lines using metabolomics. *Journal of neuro-oncology*, 125(1), 91–102. <https://doi.org/10.1007/s11060-015-1899-6>
- Stemmler, MP, Eccles, RL, Brabletz, S. ve Brabletz, T. (2019). EMT transkripsiyon faktörlerinin gereksiz fonksiyonları. *Doğa hücre biyolojisi*, 21 (1), 102-112.
- Stupp, R., Mason, W. P., Van Den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., ve Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant

- temozolomide for glioblastoma. *New England journal of medicine*, 352(10), 987-996.
- Tam, W. L., ve Weinberg, R. A. (2013). The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature medicine*, 19(11), 1438-1449
- Tang, C. H., Wei, W., ve Liu, L. (2012). Regulation of DNA repair by S-nitrosylation. *Biochimica et biophysica acta*, 1820(6), 730–735.
- Taspınar, M., İlgez, S., Özdemir, M., Özkan, T., Öztuna, D., Canpınar, H., Rey, J. A., Sunguroğlu, A., Castresana, J. S., ve Ugur, H. C. (2013). Effect of lomeguatrib-temozolomide combination on MGMT promoter methylation and expression in primary glioblastoma tumor cells. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 34(3), 1935–1947. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-0738-7>
- The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary David N. Louis, Arie Perry, Pieter Wesseling, Daniel J. Brat , Ian A. Cree, Dominique Figarella-Branger, Cynthia Hawkins, H. K. Ng, Stefan M. Pfister, Guido Reifenberger, Riccardo Soffietti, Andreas von Deimling, and David W. Ellison doi:10.1093/neuonc/noab106
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews cancer*, 2(6), 442-454.
- Tran, A. N., Boyd, N. H., Walker, K., ve Hjelmeland, A. B. (2017). NOS Expression and NO Function in Glioma and Implications for Patient Therapies. *Antioxidants ve redox signaling*, 26(17), 986–999. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6820>
- Van den Bent, M. J., Vogelbaum, M. A., Wen, P. Y., Macdonald, D. R., ve Chang, S. M. (2009). End point assessment in gliomas: novel treatments limit usefulness of classical Macdonald's Criteria. *Journal of Clinical Oncology*, 27(18), 2905.
- Vucicevic, L., Misirkic-Marjanovic, M., Paunovic, V., Kravic-Stevovic, T., Martinovic, T., Ciric, D., Maric, N., Petricevic, S., Harhaji-Trajkovic, L., Bumbasirevic, V., ve Trajkovic, V. (2014). Autophagy inhibition uncovers the neurotoxic action of the antipsychotic drug olanzapine. *Autophagy*, 10(12), 2362–2378
- Weyerbrock, A., Baumer, B., ve Papazoglou, A. (2009). Growth inhibition and chemosensitization of exogenous nitric oxide released from NONOates in glioma cells in vitro. *Journal of neurosurgery*, 110(1), 128–136.
- Wu, Q., Berglund, A. E., Macaulay, R. J., ve Etame, A. B. (2023). Epigenetic Activation of TUSC3 Sensitizes Glioblastoma to Temozolomide Independent of MGMT Promoter Methylation Status. *International journal of molecular sciences*, 24(20), 15179. <https://doi.org/10.3390/ijms242015179>

- Yang, J. J., Yin, J. H., ve Yang, D. I. (2007). Nitric oxide donors attenuate clongenetic potential in rat C6 glioma cells treated with alkylating chemotherapeutic agents. *Neuroscience letters*, 418(1), 106-110.
- Yun, H. S., Kramp, T. R., Palanichamy, K., Tofilon, P. J., ve Camphausen, K. (2024). MGMT inhibition regulates radioresponse in GBM, GSC, and melanoma. *Scientific Reports*, 14(1), 12363.
- Zarbızada, M., Özduman, K., ve Pamir, M. N. Yüksek Riskli Meningiomların Tanımı ve Tarihçesi. *Türk Nöroşir Dergisi*, 32(1), 1-9.
- Zhang, J., FG Stevens, M., ve D Bradshaw, T. (2012). Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Current molecular pharmacology*, 5(1), 102-114.
- Zhang, J., Shih, DJ ve Lin, SY (2020). İmmünoterapi yanıtını öngörmeye DNA onarım kusurlarının rolü. *Biyobelirteç Araştırması*, 8, 1-8.
- Zheng, X., Carstens, JL, Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., ve Kalluri, R. (2015). Epitelyal-mezenkimal geçiş metastaz için vazgeçilmezdir ancak pankreas kanserinde kemorezistansa neden olur. *Tabiat*, 527 (7579), 525-530.