



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GLİOMASFERLERDE TİYORİDAZİN ARACILI HÜCRE ÖLÜM
ÇEŞİTLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

EZGİ ERSÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. MEHMET KORKMAZ

MANİSA
2017



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EZGİ ERSÖZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. MEHMET KORKMAZ

(Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Erdal BALCAN

(Jüri Üyesi)

Yrd. Doç. Dr. Ayşegül DALMIZRAK

(Jüri Üyesi)

MANİSA-2017

EZGİ ERSÖZ	CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ SAĞ.BİL. ENST.	YÜKSEK LİSANS TEZİ	MANİSA-2017
-------------------	--	---------------------------	--------------------

YÜKSEK LİSANS TEZ SINAVI TUTANAGI

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Ezgi ERSÖZ Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı “Gliomasferlerde Tiyoridazin Aracılı Hücre Ölüm Çeşitlerinin Araştırılması.” başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek “**KABUL**” kararı verilmiştir. 15/06/2017

Jüri Üyesi:

Prof. DR. Mehmet KORKMAZ (Tez Danışmanı)

Prof.Dr. Erdal BALCAN (M. Celal Bayar Üni. Öğretim Üyesi)

Yrd.Doç.Dr. Ayşegül DALMIZRAK (Beykent Üni. Öğretim Üyesi)

İmza



Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
...../...../..... tarih ve..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ayşe AKTAŞ
Enstitü Müdürü

T.C
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSAL TEZ MERKEZİ

TEZ VERİ GİRİŞİ VE YAYIMLAMA İZİN FORMU

Referans No	10151418
Yazar Adı / Soyadı	EZGİ ERSÖZ
Uyruğu / T.C.Kimlik No	TÜRKİYE / 24106870480
Telefon	5554928035
E-Posta	ezgiersoz1308@gmail.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	GLİOMASFERLERDE TİYORİDAZİN ARACILI HÜCRE ÖLÜM ÇEŞİTLERİNİN ARAŞTIRILMASI
Tezin Tercümesi	INVESTIGATION OF THIORIDAZINE-MEDIATED CELL DEATH TYPES IN GLIOMA SPHERES
Konu	Tıbbi Biyoloji = Medical Biology
Üniversite	Celal Bayar Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı	
Tez Türü	Yüksek Lisans
Yılı	2017
Sayfa	96
Tez Danışmanları	PROF. DR. MEHMET KORKMAZ 27011487910
Dizin Terimleri	Glioma=Glioma ; Apoptozis=Apoptosis ; Glioblastoma=Glioblastoma ; Otofaji=Autophagy
Önerilen Dizin Terimleri	Thioridazine=Tiyyoridazin; Chloroquine diphosphate= Klorokin difosfat
Kısıtlama	24 ay süre ile kısıtlı

Tezimin,Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi Veri Tabanında arşivlenmesine izin veriyorum. Ancak internet üzerinden tam metin açık erişime sunulmasının 02.07.2019 tarihine kadar ertelenmesini talep ediyorum. Bu tarihten sonra tezimin, bilimsel araştırma hizmetine sunulması amacı ile Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi tarafından internet üzerinden tam metin erişime açılmasına izin veriyorum.

NOT: Erteleme süresi formun imzalandığı tarihten itibaren en fazla 3 (üç) yıldır.

02.07.2017

İmza:.....

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ezgi ERSÖZ
2017

TEŞEKKÜR

Lisans üstü eğitim hayatımda bilgileri ve imkânları ile bana destek olan danışmanım Prof. Dr. Mehmet KORKMAZ'a ve üniversitemizin değerli akademisyeni Doç. Dr. Nuray ALTINTAŞ'a; bilimsel bilgi ve birikimleri ile sağladıkları desteklerden dolayı Yard. Doç. Dr. Burcu ERBAYKENT TEPEDELEN' e ve Yard. Doç. Dr. Ayşegül DALMIZRAK' a; araştırmalarım boyunca destek veren ekip arkadaşlarım Yüksek Lisans Öğrencisi Elif SOYA ve Yüksek Lisans Öğrencisi Burak ÇELİK' e; desteklerini her zaman hissettiğim Dr. Aslı KISIM ve YL Özge ÖZER'e; tüm yaşamım boyunca bana maddi ve manevi destek olan annem Nilgün ERSÖZ, babam M. Uluğbay ERSÖZ ve ablam Esra ERSÖZ GENÇ'e sonsuz teşekkürler.

Bu tez, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2015-184 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Ezgi ERSÖZ
Manisa, 2017

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİLLER DİZİNİ	IV
TABLO DİZİNİ	VI
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	VII
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ	5
2. GENEL BİLGİ	7
2.1. Sferoid (3B) Hücre Kültürü	7
2.1.1. Asılı Damla Yöntemi (Hanging Drop).....	8
2.2. Kanser	9
2.2.1. Glioblastoma Multiforme (GBM)	10
2.2.1.1. Astrositler.....	11
2.2.1.1.1 Glioma.....	12
2.3. Tiyoridazin (THZ – Thioridazine)	15
2.4. Hücre Ölüm Tipleri.....	19
2.4.1. Apoptoz.....	19
2.4.1.1. Apoptoz Mekanizması	20
2.4.2. Otofaji	22
2.4.2.1. Otofaji Mekanizması.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. Hücre Hatlarının Temini	25
3.2. Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Pasajlanması.....	25
3.3. Hücre Hatlarının Dondurulması ve Saklanması.....	26
3.4. Hücre Sayımı	27
3.5. Hücre Kinetiği.....	28
3.6. Hücre Hatlarının İkilene Sürelerinin Hesaplanması.....	28
3.7. Tiyoridazin (THZ)’ in Hazırlanması.....	28
3.8. Monolayer ve Sferoid Hücre Kültürlerine Tiyoridazin Uygulanması	29

3.9. THZ'in Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi ve IC ₅₀ Değerinin Hesaplanması...	30
3.10. Ölüm Yolağına Spesifik İnhibitörlerin Kullanımı	31
3.10.1. Apoptotik İnhibitörler	31
3.10.1.1. Monolayer Hücre Kültürüne Cas 8 ve 9 İnhibitörlerinin Eklenmesi.....	31
3.10.1.2. Sferoid Hücre Kültürüne Cas 8 ve 9 İnhibitörlerinin Eklenmesi.....	32
3.10.2. Otofajik İnhibitör.....	33
3.10.2.1. Monolayer Hücre Kültürüne CQ İnhibitörlerinin Eklenmesi.....	33
3.10.2.2. Sferoid Hücre Kültürüne CQ İnhibitörlerinin Eklenmesi	34
3.11. Hücre Ölüm Tiplerinin Belirlenmesi	35
3.11.1. Muse® Annexin V & Dead Cell Kiti ve Ölüm Tipine Spesifik İnhibitörler ile Apoptozun Belirlenmesi	35
3.11.2. Muse® Autophagy LC3-antibody based Kit ve Ölüm Tipine Spesifik İnhibitörler ile Otofajinin Belirlenmesi.....	38
4. BULGULAR.....	41
4.1. T98G ve U-87 MG Hücre Hatlarının İkilene Sürelerinin Belirlenmesi ve Kinetiğinin Oluşturulması	41
4.2. GBM Hücre Hatlarının Monolayer ve Sferoid Kültürlerinde THZ'in Hücre Canlılığı Etkisi (MTT Analizi)	42
4.2.1. Monolayer Hücre Kültüründe THZ' nin Hücre Canlılığı Etkisi	43
4.2.2. Sferoid Hücre Kültüründe THZ' nin Hücre Canlılığı Etkisi	44
4.3. Apoptotik ve Otofajik Ölüm Çeşidine Özgü İnhibitörler Kullanılarak Hücre Canlılık Oranlarının Saptanması	45
4.3.1. Monolayer Hücre Kültürü Bulguları.....	45
4.3.2. Sferoid Hücre Kültürü Bulguları.....	47
4.4. Monolayer ve Sferoid Hücre Kültürlerinde THZ' nin Tetiklediği Ölüm Mekanizması Çeşidinin Saptanması	48
4.4.1. Apoptoz Yönünden Değerlendirme	48
4.4.2. Otofajik Yönden Değerlendirme	51
5. TARTIŞMA.....	55
6. KAYNAKLAR	59
7. EKLER	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil

Sayfa

Şekil 2.1. Monolayer hücre kültüründe petri kabında ekilmiş taslak hücre şekli (A) ve faz-kontrast mikroskop (Leica Microsystems, Heerbrugg, İsviçre) görüntüsü (B); Sferoid hücre kültüründe taslak sferoid şekli (C) ve asılı damla yönteminde oluşturulmuş sferoidin faz-kontrast mikroskop görüntüsü (D)	8
Şekil 2.2 Petri kapağına hücre ekimi (A), petri kabında sferoid oluşumu (B), sferoid kültüründe kullanılan asılı damla plakaları (C,D) (Perfecta3D® 96-well hanging-drop plates, 3D Biomatrix, USA)	9
Şekil 2.3 Sinir sistemi hücrelerinin sınıflandırılması (Verkhatsky ve Butt 2007).....	11
Şekil 2.4 Glia hücrelerinin farklılaşması (Huse ve Holland 2010)	12
Şekil 2.5 Primer ve Sekonder GBM'deki önde gelen genetik mutasyonlar (Kanu ve ark, 2009)	14
Şekil 2.6 Tiyoridazin'in molekül formülü (http://www.sigmaaldrich.com Erişim Tarihi: 07 Nisan 2017).....	15
Şekil 2.7 Tiyoridazin'in metabolizması (Daniel ve ark. 1997).....	16
Şekil 2.8 Apoptozis iç ve dış yolak mekanizması. (Ashkenazi 2008).	21
Şekil 2.9 Otofaji mekanizması (Cohignac ve ark. 2014)	24
Şekil 3.1 Glioblastoma multiforme hücre hatları T98G (A) ve U-87 MG (B).	25
Şekil 3.2 Sferoid hücre kültürü için asılı damla yöntemi.....	29
Şekil 4.1. T98G hücre hattının ikilenme süresi 48 saat, U-87 MG hücre hattının ikilenme süresi ise 72 saat olarak belirlendi	41
Şekil 4.2 sitotoksite çalışmalarında kullanılacak hücre sayısının hesaplanmasında absorbans değeri 1.000 üzerinde olan eğriler değerlendirildi. T98G ve U-87 MG hatları için ekilecek hücre sayısı 104 hücre/kuyucuk olarak belirlendi.....	42
Şekil 4.3 Monolayer hücre kültüründe T98G ve U-87 MG hücre hatlarının 24.,48.,72. saatteki hücre canlılıklarının MTT yöntemi ile belirlenmesi (*p<0.01,**p<0.001).	43

Şekil 4.4 Monolayer kültürde 24. saatte THZ' nin artan konsantrasyonu ile muamele edilen GBM hücre hatlarının canlılık yüzdeleri (A). THZ'nin IC ₅₀ değerinin faz-kontrast mikroskobunda 10x büyütmede çekilen görüntüleri (B).....	44
Şekil 4.5 Sferoid kültürde 24. saatte THZ' in artan konsantrasyonu ile muamele edilen GBM hücre hatları yüzde canlılık oranları (A); GBM hücre hatlarının IC ₅₀ değerinin faz-kontrast mikroskobunda 10x büyütmede çekilen görüntüleri (B)	45
Şekil 4.6 Monolayer GBM hücre hatlarında apoptoz ve otofaji inhibitörlerinin canlılık oranları.	46
Şekil 4.7 Sferoid GBM hücre hatlarında apoptoz ve otofaji inhibitörlerinin canlılık oranları.	47
Şekil 4.8. Monolayer ve sferoid GBM hücre kültürlerinde THZ' nin IC ₅₀ konsantrasyonu ile (A: Monolayer IC ₅₀ : 12,67 µM, B: Sferoid IC ₅₀ : 29,31 µM) muamele edilen T98G hücrelerinin apoptotik evreleri.....	49
Şekil 4.9 Monolayer ve Sferoid GBM hücre kültürlerinde THZ' nin IC ₅₀ konsantrasyonu ile (C: Monolayer IC ₅₀ : 12,80 µM, D: Sferoid IC ₅₀ : 29,30 µM) muamele edilen U-87 MG hücrelerinin apoptotik evreleri.	50
Şekil 4.10. Monolayer ve sferoid GBM hücre kültürlerinde THZ' nin IC ₅₀ konsantrasyonu ile (A: Monolayer IC ₅₀ : 12,67 µM, B: Sferoid IC ₅₀ : 29,31 µM) muamele edilen T98G hücrelerinin otofaji indüksiyon oranı ve ortalama otofaji yoğunluğu.....	52
Şekil 4.11. Monolayer ve sferoid GBM hücre kültürlerinde THZ' nin IC ₅₀ konsantrasyonu ile (Monolayer IC ₅₀ : 12,80 µM, Sferoid IC ₅₀ : 29,30 µM) muamele edilen U-87 MG hücrelerinin otofaji indüksiyon oranı ve ortalama otofaji yoğunluğu	53

TABLO DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 3.1 Hücrelerin Apoptotik evrelerinin Anneksin V ve 7-AAD belirteçleri.....	36
Tablo 4.1. Monolayer kültürde GBM hücre hatlarının yüzdesel canlılık oranları	44
Tablo 4.2. Sferoid kültürde GBM hücre hatlarının yüzdesel canlılık oranları.....	45
Tablo 4.3 Monolayer GBM hücre hatlarında apoptoza ve otofajiye özgü inhibitörlerin MTT yöntemiyle belirlenen oransal canlılıkları.....	46
Tablo 4.4 Sferoid GBM hücre hatlarında spesifik inhibitörlerin MTT yöntemiyle belirlenen oransal yüzdelik canlılıkları.	48
Tablo 4.5. Monolayer ve sferoid kültürleri yapılan T98G ve U-87 MG hücre hatlarının THZ' nin IC ₅₀ konsantrasyonlarıyla muamelesi sonrası canlı ve apoptotik yüzdelerinin karşılaştırılması	51
Tablo 4.6 THZ' nin IC ₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilmiş monolayer ve sferoid kültürleri yapılan T98G ve U-87 MG hücre hatlarının otofaji indüksiyon oranının ve ortalama otofaji yoğunluğunun karşılaştırılması.....	54

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

7-AAD	7-aminoactinomycin D
AKT	Protein kinaz B
APAF-1	Apototik peptidaz aktive edici faktör -1
Arg	Arjinin
Atg	Otofaji ilişkili gen
ATP	Adenozin trifosfat
BAD	Bcl-2 ilişkili hücre ölüm agonisti
BAK	Bcl-2 antagonisti
BAX	Bcl-2 ilişkili x proteini
BCL-2	B-hücre lenfoma 2
BCL-B	Bcl-2-benzeri 10
BCL-W	Bcl-2-benzeri 2
BCL-XL	Bcl-2-benzeri 1
BCL-Xs	Bcl-2-benzeri 1
BFK	Bcl-2-benzeri 15
BFL-1/A1	Bcl2 ilişkili protein A1
BH3	Bcl-2 homojeni 3
BID	Bh3'le etkileşen domain ölüm agonisti
BIM	Bcl-2-aracılı mediatörü
CDK 4	Siklin bağımlı kinaz 4
CDKN2A	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
C-MYC	Viral miyelositomatozis homolog proteini
CO ₂	Karbondioksit
COX-2	Siklooksijenaz 2
CQ	Klorokin difosfat tuzu
DEP	Düzensiz Egl-10 ve Pleckstrin
DepTOR	Dep alanı içeren mTOR etkileşen protein
DMEM-F12	Dulbecco's modified eagle medium: nutrient mixture F-12
DMSO	Dimetilsülfoksit

DNA	Deoksi ribonükleik asit
DR4/5	Ölüm reseptörü 4/5
ECM	Ekstraselüler matriks
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
eGFR	Epidermal büyüme faktör reseptörü
FADD	Fas ilişkili ölüm domaini
FAS	TNF reseptör superfamily
FASL	Fas ligand
FASR	Fas reseptör
FBS	Fetal dana serumu
FIP-200	200 kDa'lık fokal adezyon kinaz ailesi ile etkileşen protein
GβL	Memeli G proteini β-altbirim benzeri protein
GBM	Glioblastoma multiforme, IV evre Astrositoma
Gln	Glutamin
Glu	Glutamik asit
GTPaz	Guanozin trifosfataz
IC ₅₀	Hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden konsantrasyon değeri
ICAM-1	İnterselüler adhezyon molekül-1
KASPAZ	Sisteine bağlı aspartat yönlendirmeli proteazlar
KFERQ	Lizin- fenil alenin- glutamik asit- arjini- glutamin
LAMP1	Lizozom ile ilişkili membran proteini 1
LC3	Hafif zincir 3
Lys	Lizin
MCL1	Miyeloid lösemi hücre farklılaşması 1
MDM2	Mouse double minute 2 homologu
MDR	Çoklu ilaç direnci geni
MEM	Minimum essential media
MGMT	O-6-metilguanin-DNA metiltransferaz
MSS	Merkezi sinir sistemi
mTOR	Rapamisin memeli hedefi
mTORC1	Rapamisin memeli hedef kompleksi-1
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NOXA	Forbol-12-miristat-13-asetat ile indülenen protein
p16	Protein 16
p53	Protein 53
p70S6K	Ribosomal protein S6 kinaz beta-1
p150	İnsan 150-kDa protein
PBS	Fosfat tuz tamponu
PDGFR	Platelet türevli büyüme faktör reseptörü
PE	Fosfatidiletanolamin
Phe	Fenilalenin
PI3K	Fosfotidil inozitol 3 kinaz
PRAS40	Prolin- 40 kDa'lık zengin akt substrat
PS	Fosfatidilserin
Psp3P	Pombe serin proteaz 3 proteini
PSS	Periferal sinir sistemi
PTEN	Fosfataz ve tensin homologu
PUMA	Apoptoz p53 upregüle modülatörü
RAPTOR	Mtor'un düzenleyici ilişkili protein
RB	Retinoblastoma
RNA	Ribonükleik asit
SNARES	Çözünebilir n-etilmaleimide duyarlı protein bağdaştırıcısı
TCTP	Translasyon kontrol tümör proteini
THZ	Thioridazine, tiyoridazin
TNF	Tümör nekroz faktörü
TNF α	Tümör nekrozis faktör alfa
TNFR1	Tümör nekroz faktör reseptörü-1
TRADD	TNF reseptör ilişkili ölüm domaini
TRAIL	Tümör nekroz faktörü ile ilgili apoptoz-indükleyici ligand
ULK	UNC-51 benzeri kinaz
Vps	Vacuolar protein sıralama
Vps34	Vakuoler protein sıralama 34
WHO	Dünya sağlık örgütü
XIAP	X-bağlı apoptoz inhibitör proteinin

GLİOMASFERLERDE TİYORİDAZİN ARACILI HÜCRE ÖLÜM ÇEŞİTLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Öğrencinin Adı: Ezgi ERSÖZ

Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet KORKMAZ

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

ÖZET

Amaç: Klasik *in vitro* çalışmalarında kullanılan monolayer (2B) hücre kültür yöntemi *in vivo* araştırmalara ön veri elde etmede yetersiz kaldığı öne sürülmektedir. Son yıllarda kullanılmaya başlanan sferoid (3B) hücre kültür yöntemi, hücrelerin *in vivo* koşullarındaki mikroçevre ve hücre-hücre etkileşimini oluşturmayı hedefleyen bir yöntemdir. Yetişkinlerde gözlenen malign beyin tümörlerinden biri olan glioblastoma multiforme (GBM) IV Evre Astrositomdur. Cerrahi operasyon, kemoterapi ve radyoterapi tedavilerine rağmen sağ kalım oranı 12-15 aydır. Anti-psikotik bir ajan olan Tiyoridazin (THZ)' in yapılan çalışmalar doğrultusunda anti-kanser özelliği olduğu ortaya konmuştur. Buradan yola çıkarak monolayer ve sferoid hücre kültürlerinde karşılaştırmalı olarak THZ' nin GBM hücre hatları T98G ve U-87 MG üzerindeki sitotoksik etkileri ve tetiklediği ölüm mekanizmaları ortaya konulması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Sferoid hücre kültürlerini oluşturmak amacıyla asılı damla yöntemi kullanılmıştır. THZ' nin monolayer ve sferoid kültürlerdeki sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile ölçülmüştür. Ölüm mekanizmasının belirlenmesi amacıyla da Muse hücre analiz cihazıyla uyumlu testler ve ölüm yollarına spesifik inhibitörler kullanılmıştır.

Bulgular: Monolayer ve sferoid hücre kültürlerine ayrı ayrı yapılan sitotoksisite deneyleri sonucunda IC₅₀ değerleri sırasıyla 12,67 µM (monolayer T98G 24 saat), 29,30 µM (sferoid T98G 24 saat), 12,80 µM (monolayer U-87 MG 24 saat), 28,68 µM (sferoid U-87 MG 24 saat) olarak bulunmuştur. THZ' nin monolayer ve sferoid

hücre kültürleri üzerindeki sitotoksik etkisinin otofaji mekanizması üzerinden tetiklendiği Muse hücre analiz yöntemi ve ölüm yoluna özgü inhibitörler aracılığıyla belirlenmiştir.

Sonuç: Çalışmamızda THZ' nin hücresel etkisinin monolayer ve sferoid GBM kültürlerinde farklılık gösterdiği ilk kez ortaya konuldu. Bu çalışmanın bulguları ışığında ileride yapılacak *in vitro* sitotoksikite çalışmalarının sadece monolayer kültürlerde değil aynı zamanda *in vivo*' ya benzerliği açısından sferoid kültürlerde de yapılması önerilmektedir. Bununla birlikte, GBM hücre hatlarında THZ' nin sitotoksik etkisinin otofaji yolağı üzerinden etkili olduğunun tespit edilmiş olması bu ilacın, apoptozu uyaran kemoterapötiklere karşı dirençli olan GBM tedavisinde kullanılabilecek bir ajan olduğunun düşünülmesine neden olmaktadır.

Anahtar kelimeler: Sferoid kültürü, Monolayer kültürü, Glioblastoma, Tiyoridazin, Otofaji.

INVESTIGATION OF THIORIDAZINE-MEDIATED CELL DEATH TYPES IN GLIOMA SPHERES

Student's Name: Ezgi ERSÖZ

Advisor: Prof. Dr. Mehmet KORKMAZ

Department: Medical Biology

ABSTRACT

Aim: It has been suggested that monolayer (2B) cell culture method used in classical in vitro studies is inadequate to obtain preliminary data in in vivo studies. Spheroid (3B) cell culture method, which has been introduced in recent years, is a method aimed to form micro-environment and cell-to-cell interaction of cells in in vivo conditions. Glioblastoma Multiforme (GBM) is the IV Stage Astrocytoma which one of the malignant brain tumors that observed in adults. Despite the treatments through surgical operation, chemotherapy and radiotherapy, the survival rate is 12-15 months. Thioridazine (THZ), an anti-psychotic agent, has been shown to be an anti-cancer agent in the course of its studies. Starting from this, cytotoxic effects of THZ on GBM cell lines T98G and U-87 MG was aimed to determine comparatively in monolayer and spheroid cell cultures.

Material and Methods: Hanging drop method was used to form spheroid cell cultures. The cytotoxic effect of THZ in monolayer and spheroid cultures was measured by MTT method. In order to determine the mechanism of cell death tests, which are compatible with the Muse cell analyzer and specific inhibitors were used.

Results: The IC₅₀ values were determined as 12,67 µM (monolayer T98G 24 hours), 29,30 µM (spheroid T98G 24 hours), 12,80 µM (monolayer U-87 MG 24 hours) 28,68 µM (spheroid U-87 MG 24 hours) as a result of cytotoxicity experiments performed separately on monolayer and spheroid cell cultures. It has been determined that THZ stimulates the cytotoxic effect on monolayer and spheroid cell cultures through the autophagy mechanism by Muse cell analysis method and death

pathways specific inhibitors.

Conclusions: In our study, it has shown for the first time that cellular effects of THZ differentiate in monolayer and spheroid GBM cultures. It is suggested in the light of this study's findings that in vitro cytotoxicity studies should perform with not only monolayer cell cultures but also with spheroid cell cultures for obtaining data in vivo-like. After all THZ has been shown to be cytotoxic effective in the GBM cell lines via the autophagic pathway, suggesting that this drug is an agent that can be used in the treatment of GBM, which is resistant to apoptosis-inducing chemotherapeutics.

Keywords: Spheroid culture, Monolayer culture, Glioblastoma, Thioridazine, Autophagy.

1. GİRİŞ

Biyomedikal çalışmalarda ve hücre biyolojisi deneylerinde kullanılan *in vitro* bir yöntem olan monolayer hücre kültürü (2 boyutlu, 2B), tek bir hücre katmanı üzerinde çalışma imkânı sunarak klinik araştırmalar için ön veri oluşturmaktadır. Elde edilen ön veriler klinik araştırmalara temel bilgi sağlarken *in vivo* koşulların getirdiği farklılıkları göz ardı etmektedir. 19. yüzyılın başında *in vitro* deneylerinin *in vivo* koşullara benzerliğini arttırmak amacıyla sferoid (3 boyutlu, 3B) hücre kültürü çalışmalarına başlanmıştır. Bu yöntemle, *in vitro* koşullarda yapılan araştırma deneyleri *in vivo* benzeri koşullara adapte edilerek klinik çalışmalarda kullanılmak üzere *in vivo* 'ya daha yakın sonuçlar elde edilmeye imkân sağlanmıştır (Manome ve ark. 2010; Millet ve Gillette 2012).

Kanser, köken aldığı dokuya göre farklı karakteristik özellikler gösterir. Astrositlerin kanserleşmesiyle oluşan Astrositoma' ların IV evresi olan Glioblastoma multiforme (GBM) primer beyin tümörleri içerisinde yetişkinlerde en sık karşılaşılan ve en ölümcül olanıdır (Binder ve ark. 2015). GBM' de tedavi seçenekleri günümüzde halen kısıtlı olmakla birlikte tümörün en az %95' inden fazlasının cerrahi yolla çıkarılması ve bunu takiben eş zamanlı yapılan radyoterapi ve kemoterapi uygulamaları standart tedavi olarak uygulanmaktadır. GBM' de kombine tedavilerle ortalama hayatta kalma süresi yaklaşık 12-15 ay düzeyindedir. GBM tedavisi sırasında karşılaşılan en önemli sorunlardan biri, kanser hücrelerinin kemoterapötiklere karşı direnç geliştirmesi ve birçok kemoterapötüğün kan-beyin bariyerinden geçememesidir. Bu nedenle GBM tedavisinde sağ kalımı arttıracak yeni ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır (Louis ve ark. 2016).

Bir Fenotiyazin türevidir olan Tiyoridazin (THZ), uzun yıllar psikoz ve şizofreni tedavisinde kullanılmış anti-psikotik bir ajandır. THZ' nin farmakokinetik, farmakodinamik özellikleri ve yan etkileri oldukça iyi bilinmektedir. Ayrıca THZ, ileri evre kanser hastalarında depresyon ve tümör ilişkili terleme tedavisinde kullanılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise THZ' nin kanser hücre hatlarında anti-tümör etkisi gösterilmiştir (Pantazaki ve ark. 1999; Tuynder ve ark. 2004).

Bu çalışmada, THZ' nin GBM hücre hatları T98G ve U-87 MG' nin monolayer ve sferoid hücre kültürlerinde konsantrasyon ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkisinin belirlenmesi ve bu etkinin tetiklediği ölüm mekanizmasının tespit edilmesi hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİ

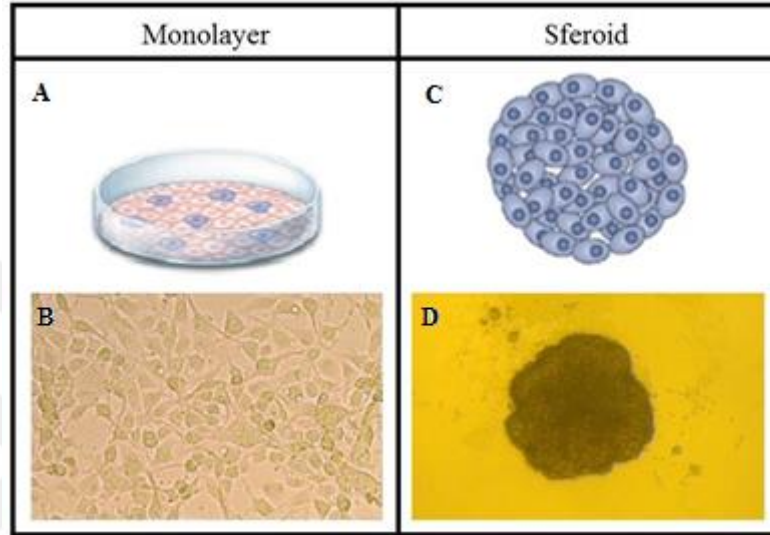
2.1. Sferoid (3B) Hücre Kültürü

Klinik öncesi çalışma modelleri çoğu potansiyel ilaç hedeflerinin keşfinde kullanılmasına rağmen, hücre biyolojisi çalışmalarında kullanılan *in vitro* yöntemlerden biri olan monolayer hücre kültüründe elde edilen verilerin bazıları *in vivo* çalışmalar için yeterli ölçüde bilgi sağlayamamaktadır (Thoma ve ark. 2013).

Monolayer hücre kültürü, bir yüzey üzerinde (hücre kültürü kapları veya plakalar) homojen hücre ortamı sağlayarak çoğu hücre tipi için hücre proliferasyonunun sürdürülebilmesini, moleküler biyolojisini, kök hücre farklılaşmasını ve doku morfogenezisini içeren kompleks biyolojik fenomenlerin yorumlanabilmesi için gerekli olan temel bilgiyi sağlarken, hücrenin doğal ortamındaki konumlanmasından dolayı kazandığı özellikleri göz ardı etmek zorunda bırakır (Thoma ve ark. 2013; Fennema ve ark. 2013; Senkowski ve ark. 2015). Monolayer kültür çalışmalarında hücrelerin petri kabının yüzeyine tutunması sonucu hücre-hücre etkileşimini minimum düzeye inmektedir. Hücreler *in vivo* koşullardaki morfolojilerini kaybederler. Ayrıca hücre-hücre etkileşimleri, polarizasyonları, hücre göçleri ve mekânsal örgütlenmeleri sınırlı bir hal alır (Günter ve ark. 2016; Antoni ve ark. 2015). Dolayısıyla monolayer hücre kültürlerinden elde edilen sonuçlar hücrenin morfolojik, fizyolojik özelliklerini ve deneyin amacına göre kullanılan maddelerin mekanizmalarına ışık tutma imkânı sağlayarak ön bulgu verirken *in vivo* koşullara tam bir uyumluluk sağlayamazlar (Sung ve Beebe 2014; Keely ve Nain 2015).

Sferoid kültür ise hücrelerin kültür plakalarının yüzeylerine yapışmadan küre biçiminde hücre kümeleri, doku sferoidleri veya gömülü hücreler olarak canlı doku formundaki yapısal proteinlerin ve diğer biyolojik moleküllerin ekstrasellüler matriks (ECM) benzeri bir doku iskeletinde veya sıvı tabanlı yöntemlerde oluşmasını sağlayarak belirli bir düzeye kadar *in vivo* koşullara benzerlik sağlayan bir yöntemdir (Fennema ve ark. 2013).

Sferoid hücre kültürü, monolayer hücre kültürü ile karşılaştırıldığında 3 boyutlu küresel bir form oluşturarak, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimini, hücre çoğalması ve farklılaşmasını in vivo benzeri doku yapısı ve homeostazi koşullarını sağlayarak daha doğru bir biçimde ifade edebilen bir yöntemdir (Aijian ve Garrell 2015; Schmal ve ark. 2016; Katt ve ark. 2016; Şekil 2.1).



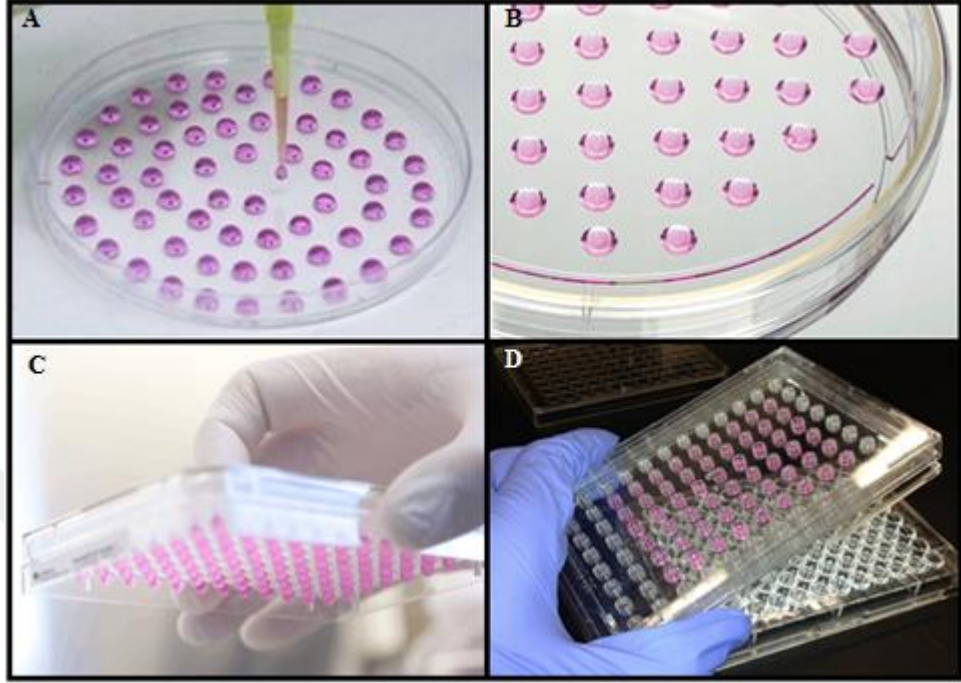
Şekil 2.1 Monolayer hücre kültüründe petri kabında ekilmiş taslak hücre şekli (A) ve faz-kontrast mikroskop (Leica Microsystems, Heerbrugg, İsviçre) görüntüsü (B); Sferoid hücre kültüründe taslak sferoid şekli (C) ve asılı damla yönteminde oluşturulmuş sferoidin faz-kontrast mikroskop görüntüsü (D).

2.1.1. Asılı Damla Yöntemi (Hanging Drop)

Harrison tarafından 1910 yıllarında bulunan, Kelm ve ark.'nın hücre kültürü çalışmalarına adapte ederek geliştirdiği sferoid hücre kültür yöntemlerinden biridir (Kelm ve ark. 2003).

Yöntemin temel prensibi tek bir damlacık içerisindeki hücrelerin sferoid oluşturmalarıdır. En eski sferoid kültür yöntemlerinden birisi olan asılı damla yönteminde ilk yapılan çalışmalarda asılı damla oluşturmak için petri kapağının iç yüzeyine hücre içeren besiyeri damlacıklar halinde bırakılır ve kapak ters çevrilirdi. Bu sayede hücreler tutunacak bir yüzey bulamadıkları için birbirlerine tutunarak sferoid formunu almaları hedeflenmekteydi. Günümüzde ise hazır asılı damla

plakaları üretilerek yöntem daha basit bir hale getirilmiştir (Breslin ve O'Driscoll 2013; Hsiao ve ark. 2012; Thoma ve ark. 2014; Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Petri kapağına hücre ekimi (A), petri kabında sferoid oluşumu (B), sferoid kültüründe kullanılan asılı damla plakaları (C,D) (Perfecta3D® 96-well hanging-drop plates, 3D Biomatrix, USA).

2.2. Kanser

Kanser, tek bir hücrede meydana gelen bir dizi moleküler değişimin birbirleri ile olan etkileşimlerinden kaynaklanan karmaşık bir hastalıktır. Sadece gerekli zamanlarda çoğalan normal hücrelerde büyümenin tetiklendiği veya baskılandığı hassas bir denge var iken kanser hücrelerinde bu dengeyi düzenleyen proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar söz konusudur (Hanahan ve Weinberg 2011). Bu mutasyonlar sonucu hücre normalde hücre büyümesini inhibe eden sinyaller varlığında bile büyümeye ve bölünmeye devam eder (Macdonald ve ark. 2004). Bu anormal büyüme modeli çok hücreli organizmada hücrenin çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını düzenleyen genlerdeki mutasyonlar sonucu gözlenir (Lieberman ve Marks 2013). İlk mutasyon hücrelerin genetik açıdan

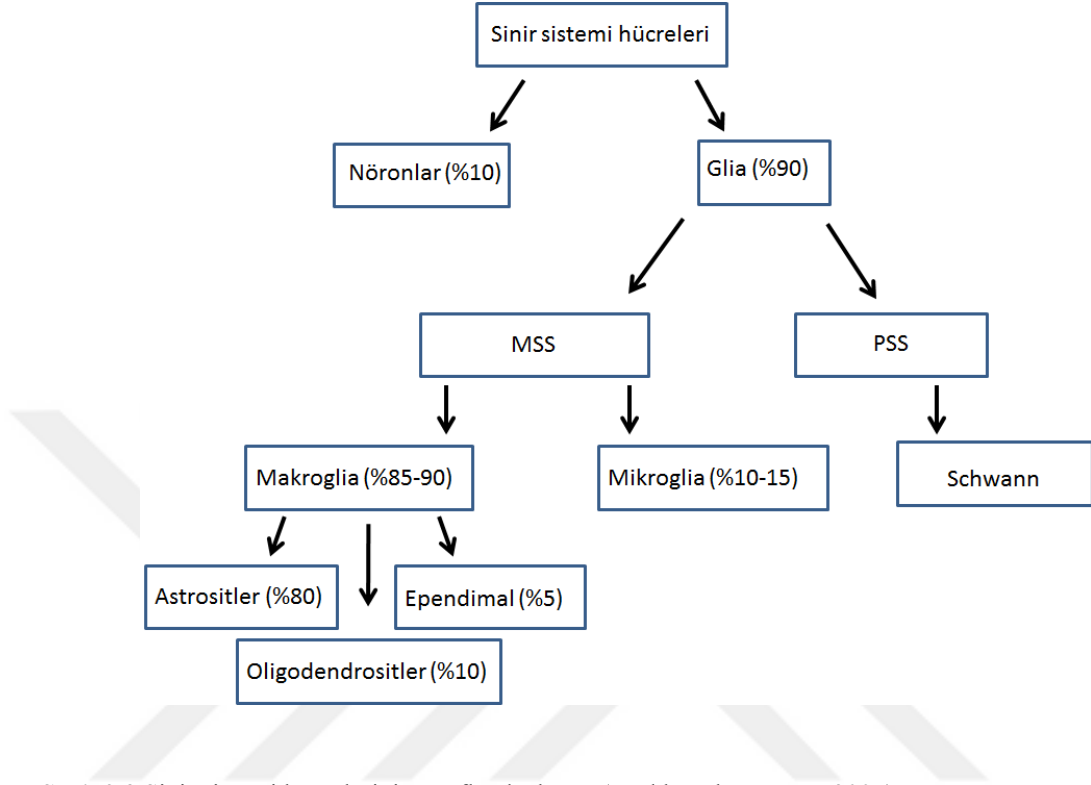
homojen klon üretmek için bölünmelerine neden olur. Daha sonra oluşan mutasyonlar hücrenin büyüme potansiyelini arttırmaya yönelik meydana gelirler. Bu hücreler hücre yapısında, hücre adezyonunun azalmasında ve yeni enzim üretilmesindeki değişiklikleri kapsayan yeni karakteristik özellikler geliştirirler. Bu sayede oluşan hücre topluluğu, yani tümör, içerisinde farklı özelliklere sahip alt klonlar meydana getirir ki tümör bu şekilde heterojen bir yapı kazanır. Bu artan büyüme sonucu kanser hücreleri normal sağlıklı hücrelerin fonksiyonlarını baskılar. Kanser hücreleri köken aldıkları bölgede kaldıkları sürece benign olarak, fakat invazif özellik kazandıklarında ise malign olarak kabul edilirler. Malign tümörlerdeki kanser hücreleri genellikle metastatik özelliğe sahiptirler (Macdonald ve ark. 2004; Frederick ve ark. 2003).

Kanser hücrelerinde meydana gelen mutasyon ve mutasyonların birikmesi sonucu gözlenen proliferatif sinyalizasyonun sürdürülmesi, büyümeyi baskılamadan kaçınma, işgal ve metastaz aktivitesi, replikatif ölümsüzlük sağlama, hücre ölümüne karşı direnç kazanma, indükleyici anjiyogenez karakteristik özellikleri tümörigenez aşamalarında karşılaşılan süreçlerdir (Hanahan ve Weinberg 2011). Tümörigenez sırasında meydana gelen süreçlerin mekanizmaları tam olarak açıklığa kavuşmamış olmasına rağmen tümörigenez sürecinin desteklenmesinde genlerdeki mutasyonların birikmesi olduğu açıktır. Tümör hücrelerinin her bir jenerasyonunun normal hücre büyümesini düzenleyen biyolojik kuralları zayıflatarak ekstrem koşullara daha fazla adaptasyon sağladığı Darvinci evrimde olduğu gibi tümör gelişimi içinde düşünülebilir. Buna klonal evrim denilmektedir (Martinez ve ark. 2003).

2.2.1. Glioblastoma Multiforme (GBM)

Sinir sistemi hücreleri “nöron” ve “glia olarak iki sınıfa ayrılır. Glia hücreleri, nöronların etrafında fiziksel bir bariyer olarak bulunan, onlara besin ve oksijen temin eden, atıkları uzaklaştıran, patojenlere karşı koruyan ve diğer nöronlar arasındaki sinyal iletimini sağlayan nöronlardan daha küçük boyutlardaki sinir hücreleridir (Allen ve Barres 2009). Glia hücrelerinin merkezi (MSS) ve periferik sinir sistemlerinde (PSS) morfolojilerine, fonksiyonlarına ve sinir sistemindeki

konumlanmalarına göre sınıflandırmaları Şekil 2.3’ de gösterilmiştir (Verkhratsky ve Butt 2007).



Şekil 2.3 Sinir sistemi hücrelerinin sınıflandırılması (Verkhratsky ve Butt 2007).

2.2.1.1 Astrositler

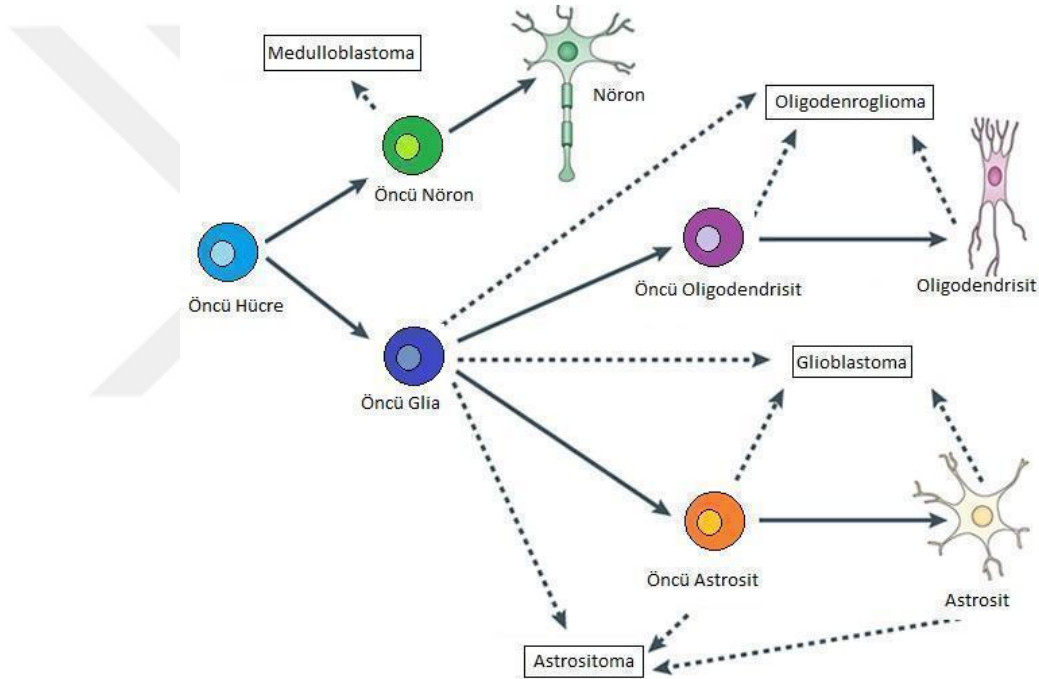
Merkezi sinir sisteminin çoğunluğunu oluşturan astrositler, nöronlar gibi yıldızlı formda ve çok sayıda uzantıya sahiptirler. Astrositleri diğer glia hücrelerden fonksiyonel olarak ayıran önemli özelliklerinden bir tanesi sitoiskelet oluşumuna katılan ara filament ekspresyonudur (Allen ve Barres 2009).

Astrositler beyin endotelyal hücreleri ile etkileşerek kan beyin bariyerinin oluşumuna katılırlar. Kan vasıtasıyla beyine gelen maddelerin seçici geçirgen olarak girişini düzenlemede, hasar gören nöronların onarımında astrositler büyük önem taşımaktadırlar (Siegel ve Agranoff 1999; Huse ve Holland 2010).

2.2.1.1.1. Glioma

Tüm kanser tipleri içerisinde beyin tümörlerinin görülme insidansı 100.000’de 7 olup kansere bağlı ölümlerin %2 sini oluştururlar (Ferguson 2011).

Glia hücrelerinin alt grubu olan astrositlerin kanserleşmiş formlarına glioma veya astrositoma adı verilmektedir. Gliomalar beyin dokusunda görülen tümörlerin yaklaşık %80’ini oluşturmaktadır (van Tellingen ve ark. 2015; Lee 2010; Bauman ve ark. 1999; Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Glia hücrelerinin farklılaşması (Huse ve Holland 2010).

Astrosit kökenli glioma WHO (Dünya sağlık örgütü) tarafından dört evrede sınıflandırmıştır (Louis ve ark. 2016).

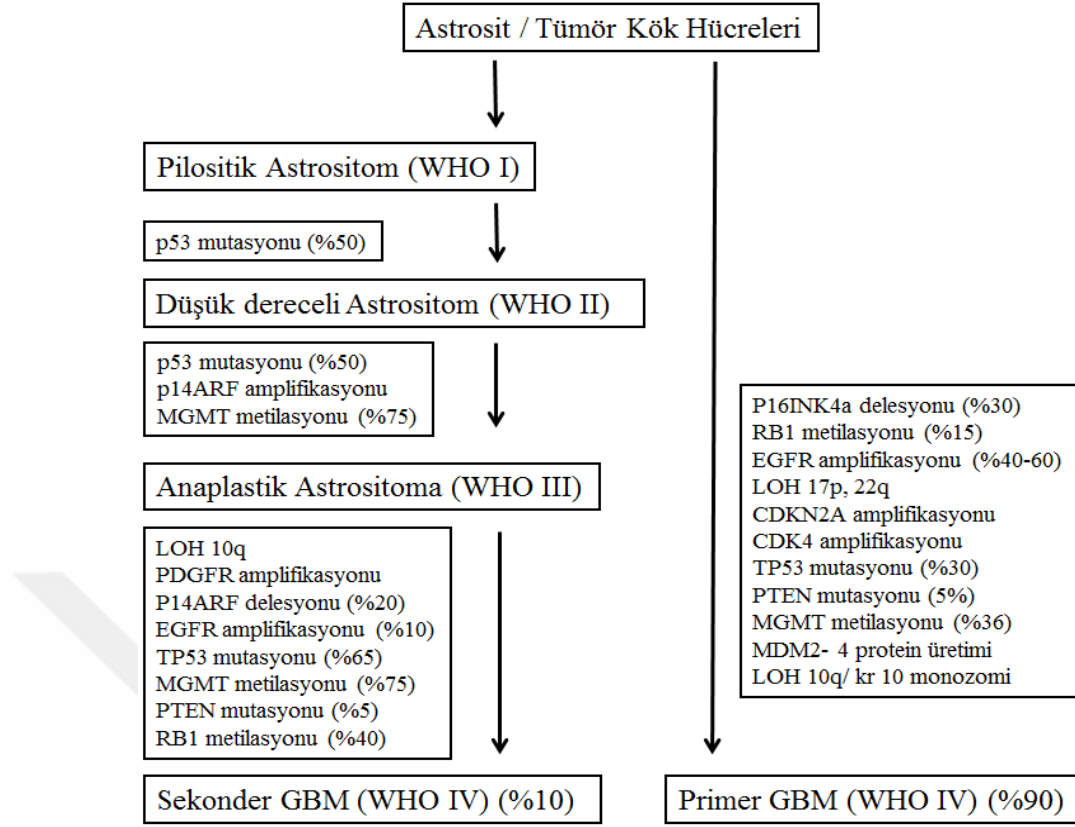
I. Evre: Pilositik Astrositom: Tanı konduktan sonra 20 yıl hayatta kalma oranı %80’dir. Genç yaştaki bireylerde gözlenir ve normal dokularda invazyona neden olmaz. Cerrahi işlemlerle veya kemoterapi ve radyoterapi ile tedavi edilebilir (Collins ve ark. 2015).

II. Evre: Düşük dereceli Astrositom: Ortalama yaşam süresi 5 ile 10 yıldır. Normal dokulara invazyon yapar ve tedavi olarak cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi uygulanır (Schiff 2015).

III. Evre Anaplastik Astrositoma (AA): Yüksek evre astrositomalarından olup ortalama yaşam süresi 2-3 yıldır (Alifieris ve Trafalis 2015).

IV. Evre: Glioblastoma: Yetişkinlerde en sık görülen malign beyin tümörüdür. Tanı konduktan sonra ortalama yaşam süresi 12 ile 15 aydır. Glioblastoma hücrelerinin oluşturduğu tümörler hücresel ve moleküler düzeyde geniş bir heterojenite göstermelerinden dolayı Glioblastoma ‘multiforme’ olarak da isimlendirilir (Young ve ark. 2009; Kanu ve ark. 2009).

GBM görüldüğü yaş grubu, tümör gelişim aşamaları ve moleküler bakımında “primer” ve “sekonder” GBM olarak iki sınıfa ayrılmaktadır (Şekil 2.5). Primer GBM, genellikle 55-60 yaş ve üzeri bireylerde görülür ve hastalık 3 aylık bir sürede ilerler. Sekonder GBM ise 45 yaş altı bireylerde görülmektedir. Sekonder GBM ise II. veya III. evre astrositomaların malign transformasyonundan gelişir. Hastalığın IV. evre GBM formuna ilerleme süresi ortalama 4-5 yıldır (Kanu ve ark. 2009; Sarkar ve ark. 2009; Hayden 2010).

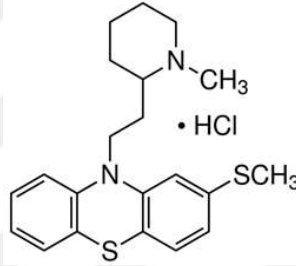


Şekil 2.5 Primer ve Sekonder GBM’deki önde gelen genetik mutasyonlar (Kanu ve ark, 2009).

Glioblastoma tedavisinde karşılaşılan en büyük sıkıntı uygulanan kemoterapi ve radyoterapiye karşı gelişen dirençtir. Kemoterapi tedavisinin başarısız olmasının önemli bir sebebi de kullanılan ilaçların kan-beyin bariyerine takılması veya geçebilmeyi başaran ilaçların da hücre ölüm yollarını uyarmadaki yetersizliğidir. Bunların dışında kontrolsüz çoğalması ve metastatik yapıda olması cerrahi müdahalelerin başarı oranını da önemli ölçüde azaltmaktadır (Louis ve ark. 2016; Adamson ve ark. 2009).

2.3. Tiyoridazin (THZ - Thioridazine)

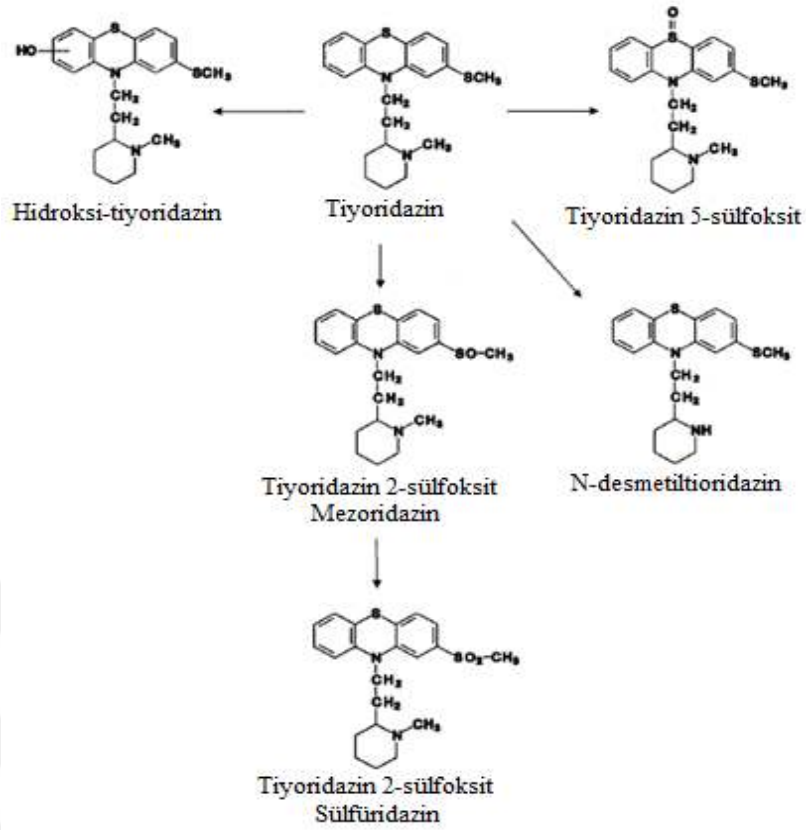
Tiyoridazin (10-[2- (1-metil-2-piperidil)etil]- 2-metiltiyo- fenotiyazin) moleküler ağırlığı 407.04 g/mol olan fenotiyazin ilaç grubuna dahil, piperidin içeren güçlü bir anti-psikotik ve anti-anksiyete ajanıdır (Strobl ve ark. 1990; Rho ve ark. 2011; Kang ve ark. 2012; Otręba ve ark. 2015; Şekil 2.6). Uzun yıllardır psikoz ve şizofreni gibi psikotik bozuklukların tedavisinde kullanılmaktadır (Cheng ve ark. 2015; Lu ve ark. 2015). Aynı zamanda ilerlemiş kanser tedavisinde kansere bağlı terleme ve depresyon tedavisinde de kullanıldığı bilinmektedir (Rho ve ark. 2011; Kang ve ark. 2012; Byun ve ark. 2012).



Şekil 2.6 Tiyoridazin'in molekül formülü (<http://www.sigmaaldrich.com> Erişim Tarihi: 07 Nisan 2017).

THZ' nin piperidin halkası sert hidrofobik üç halkalı bir gruptan meydana gelir (Kopeck ve Khandelia 2014). THZ, lipofilik bir bileşik olmasından mütevellit hızlı bir şekilde absorbe edilerek organlara yayılabilmekte ve kan-beyin bariyerinden kolayca geçebilmektedir (Daniel ve Wójcikowski 1999; Daniel 2003).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda THZ' nin anti-psikotik etkisinin yanı sıra tümör hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Strobl ve ark. 1990; Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Tiyoridazin'in metabolizması (Daniel ve ark. 1997).

Yapılan çalışmalarda THZ' nin meme kanseri (Strobl ve ark. 1990; Yin ve ark. 2015), melanoma (Glass-Marmor ve ark. 1996; Gil-Ad ve ark. 2006), monositik lösemi (Tuynder ve ark. 2004), lösemi (Zhelev ve ark. 2004), yumurtalık kanseri (Rho ve ark. 2011; Byun ve ark. 2012; Park ve ark. 2014), böbrek kanseri (Min ve ark. 2014), serviks kanseri (Mao ve ark. 2015), endometriyal kanser (Kang ve ark. 2012), prostat kanseri (Ronald ve ark. 2013; Csonka ve ark. 2013), mide kanseri (Mu ve ark. 2014), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (Sudo ve ark. 2015), pankreas kanseri (Chien ve ark. 2015), nöroblastoma (Gil-Ad ve ark. 2004) ve Glioblastoma (Min ve ark. 2014; Cheng ve ark. 2015) hücre hatları üzerinde sitotoksik etkileri gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu bu sitotoksik etkilerin farklı kanser tiplerinde farklı ölüm mekanizmaları üzerinden çalıştığı belirtilmektedir.

THZ'nin anti-kanser özelliğinden yola çıkarak yapılmış olan çalışmalarda GBM8401 ve U87MG Glioblastoma hücre hatları THZ' nin artan konsantrasyonları (1-10 μ M) ile 72 saat muamele edildiğinde sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Bu

etkiden yola çıkılarak yapılmış olan protein ekspresyonu çalışmasında kaspaz-3 protein miktarında bir değişim gözlenmezken, LC3-II protein miktarında önemli ölçüde artış görülmüş ve THZ' nin sitotoksik etkisinin otofaji üzerinden gerçekleşmiş olabileceği öne sürülmüştür (Cheng ve ark. 2015).

İnsan nöroblastoma (SH-SY5Y) ve fare glioblastoma (C6) hücre hatları THZ' nin artan konsantrasyonları (10-30 μM) ile 24 saat muamele edildiklerinde ise sitotoksik etkinin apoptoz mekanizması üzerinden olduğu kaspaz-3 artışı ile belirlenmiştir (SH- SY5Y için IC_{50} , $11 \pm 1,2 \mu\text{M}$ ve C6 için $13 \pm 1,5 \mu\text{M}$) (Gil-Ad ve ark. 2004). Farklı kanser tipleri ile ilgili yapılan çalışmalarda neoplastik bir ajan olan THZ' nin, meme kanseri hücre hattında (MCF-7) hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Strobl ve ark. 1990). Bununla birlikte, MDR fare T-lenfoma hücreleri THZ' nin artan konsantrasyonlarındaki (5-10-20 μM , 24 saat) sitotoksikite analizi sonucu belirlenen IC_{50} (9,56 $\mu\text{g/ml}$) değeri ile 90 dakika muamele edildiğinde ise populasyonun yaklaşık %50' sinin erken apoptoz ile öldüğü gösterilmiştir (Spengler ve ark. 2011). Ayrıca paclitaxel dirençli MDA-MB-361 ve BT-474 hücre hatlarında THZ muamelesi sonucu MDR-1 protein (multi drug resistance-1/çoklu ilaç direnci-1) ekspresyonunun baskılandığı, tümör hacminin azaldığı, apoptozun uyarıldığı ve tümör anjiogenezinin inhibe edilerek proliferasyonun azaldığı tespit edilmiştir (Yin ve ark. 2015). Ovaryum kanser hücre hatlarının (OVCAR-3 ve 2774) THZ ile 24 saat muamele edilmesi sonucunda ise IC_{50} değerleri sırasıyla 15 μM ve 25 μM olarak belirlenmiş, ayrıca vasküler endotelial büyüme faktörünün uyarıldığı ve HUVEC hücrelerinin migrasyonunda azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir (Byun ve ark. 2012).

Servikal (HeLa, Caski ve C33A) ve endometrial (HEC-1- A ve KLE) hücre hatlarına uygulanan THZ' nin hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu tetiklediği, aynı zamanda p53 transkripsiyonunu arttırarak hücre döngüsünde G1 fazını uyardığı ve Akt/mTOR/p70s6k sinyal yolağı aracılığıyla tümör büyümesini ve metastazı inhibe ettiği gösterilmiştir (Kang ve ark. 2012). Son zamanlarda yapılan çalışmaların birinde ise hepatoma hücre hatlarında (SNU449, LM3, huh7) THZ' nin artan konsantrasyonlarının (5-10-100 μM , 24 saat) hücre döngüsünü durdurarak

hücre proliferasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir (Lu ve ark. 2015).

Min ve ark yaptıkları çalışmada THZ' nin, TRAIL-aracılı apoptoz üzerindeki etkileri araştırılmıştır. THZ ve TRAIL kombinasyonunun glioma (U251MG), böbrek kanseri (Caki, ACHN ve A498) ve meme kanseri hücre hatlarının (MDA-MB231) apoptoza duyarlılığını arttırdığını ancak normal hücreler üzerinde bir etki göstermediğini saptamıştır (Min ve ark. 2014). PTEN-hasarlı kanser hücre hatlarında yapılan çalışmada ise THZ' nin PI3K/Akt sinyal yolağını inhibe ederek hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Kau ve ark. 2003). Yapılan bir başka çalışmada da THZ' nin paclitaxel dirençli MDA-MB-361 ve BT-474 meme kanser hücre hatlarında MDR-1 protein (multi drug resistance-1/çoklu ilaç direnci-1) ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Yu ve ark. 1998). THZ (10 μ M) ve gefitinib (10 μ M) kombinasyonunun akciğer kanser hücrelerine (H1975) hattında hücre çoğalmasını %65' e kadar inhibe ettiği ve apoptozu tetiklediği tespit edilmiştir (Sudo ve ark. 2015). Ovaryum kanserinde (SKOV-3) THZ'nin (20 μ M) sitotoksik etki gösterdiği ve bu etki sonucunda yapılan western blot analizlerinde kaspaz-3 aktivasyonunun arttığı gözlenmiş, sonuçlardan elde edilen veriler doğrultusunda sitotoksik etkinin ölüm tiplerinden apoptozu tetiklediği belirtilmiştir. Aynı zamanda THZ' nin Akt fosforilasyonunu baskıladığını ve hücre büyümesini G0/G1 fazında inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. THZ (20 μ M), cisplatin (20 μ M) ve paclitaxel (30 μ M) ile kombinlenerek yapılan çalışmalarda ise sitotoksitenin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (Rho ve ark. 2011).

Literatürde THZ ile in vitro çalışmaların yanı sıra bazı in vivo çalışmalar da mevcuttur. Fare ksenograft çalışmalarında GBM8401 ve U87MG hücre hatları kullanılarak oluşturulan modellerde THZ tedavisi sonucunda tümör çaplarında küçülme gözlenmiş (Cheng ve ark. 2015) ve ovaryum kanserinde de THZ tedavisi (25 mg/kg) sonucunda tümör çaplarında %70 küçülme meydana gelmiştir. Ayrıca Bcl-2, Survivin, c-Myc, Siklooksijenaz (COX-2), interselüler adhezyon molekül-1 (ICAM-1) ve X-bağılı apoptoz inhibitör proteinin (XIAP) THZ tedavisi uygulanan tümörlerde downregule olduğu gözlenmiş aynı zamanda tümör büyümesi ve angiogenezi de inhibe ettiği görülmüştür (Park ve ark. 2014). HCC (hepatosellüler

karsinom) hücre hatlarında fare ksenograft çalışmasında THZ tedavisinin DMSO tedavisinden daha fazla tümör boyut ve ağırlığını azalttığı gösterilmiştir (Lu ve ark. 2015). Deri altı tümörlerinden meme kanseri (MDA-MB231) ve monositik lösemi (U937) hücre hatlarında de THZ tedavisi (6,75 mg/kg) ile tümör çaplarında küçülme gözlenmiştir. Ayrıca translayon kontrol tümör proteini (TCTP) miktarında önemli ölçüde azalma tespit edilmiştir (Tuynder ve ark. 2004).

2.4. Hücre Ölüm Tipleri

Tüm organizmalarda olduğu gibi canlılığın en küçük birimini oluşturan hücrelerin yaşam döngüsü embriyonik dönemden itibaren kendi iç kontrolleriyle düzenlenmektedir. Çok hücreleri organizmalarda doku homeostazisi, mitozun ve hücre ölüm mekanizmalarının dengeli bir şekilde işlemesiyle sağlanmaktadır (Ameisen 2009). Ancak kanser hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar bu dengenin bozulmasına neden olur. Kanser tedavisine yönelik yapılan araştırmalarda kullanılan ilaçların genel hedefi kanserli hücrede ölüm yollarını tetikleyebilmeye yöneliktir. Bu nedenle kanser hücreleri üzerine yapılan çalışmalarda hücre ölüm mekanizmalarını anlamak ve bu mekanizmalarda meydana gelen mutasyonlara karşı bir yanıt oluşturmak amaçlanmaktadır (Constantinou ve Papas 2009; Marzban ve ark. 2015; Kaza ve ark. 2012).

2.4.1. Apoptoz

Apoptoz ilk olarak Carl Vogt tarafından 1842 yılında karada ve suda yaşayan organizmaların hücrelerinin normal gelişimleri esnasında gerçekleşen ölümü olarak tanımlanmıştır. 1972 yılında ise Kerr ve ark. hücre ölümünü fizyolojik olarak incelemiş ve hücrelerin öldüklerinde dokudan kopuyormuş gibi uzaklaşmasından yola çıkarak, apoptoz (Apo: ayrı, Ptozis: düşmek) terimini ilk kez literatüre kazandırmıştır (Peter ve ark. 1997).

Apoptoz, hücrenin planlı bir şekilde kendi kendini ölüme göndermeyi seçtiği bir yöntem yani başka bir ifadeyle hücrel intihardır (Lu ve ark. 2000). Temel olarak

belirli genler tarafından düzenlenen, RNA ile protein sentezi gerektiren ve enerjiye ihtiyaç duyan programlı bir hücre ölümüdür (Coskun ve Ozgur 2011). Apoptozda morfolojik olarak membran bütünlüğü korunarak hücre büzülür ve diğer hücrelerle olan bağlantısını kaybeder. Hücre küçük apoptotik cisimcikler oluşturarak parçalanır ve makrofajlar tarafından fagositoza uğrar (Martinez 2010).

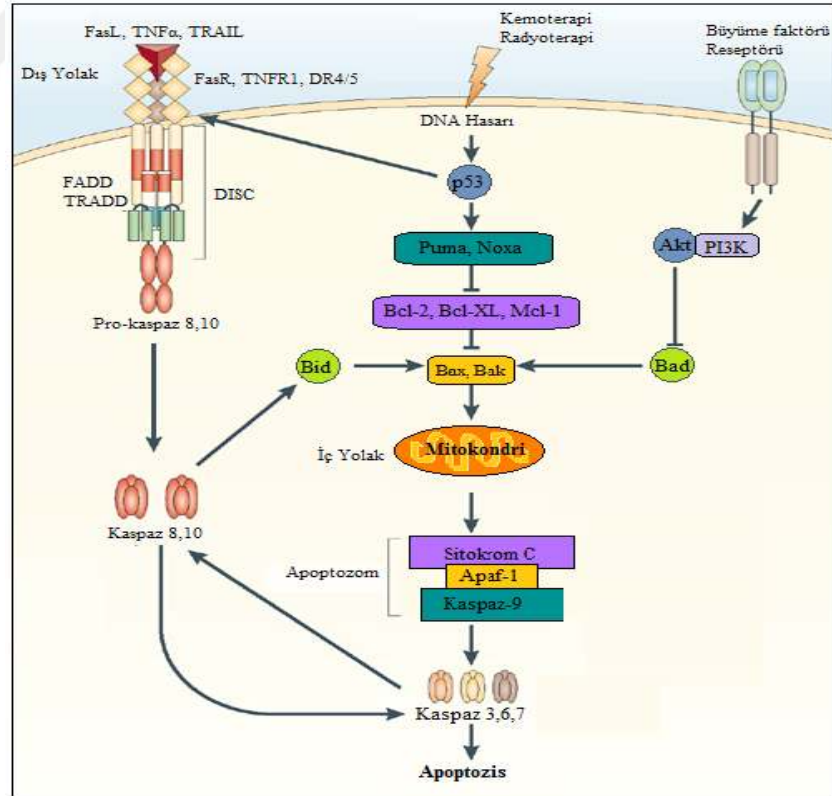
Embriyonik gelişimden itibaren doku homeostazisini koruma, organların düzenlenmesi, hasarlı ve yaşlı hücrelerin eliminasyonu ve patogeneze karşı etkin bir mekanizma olarak apoptoz iş görmektedir (Bellamy ve ark. 1995; Schwartzman ve Cidlowski 1993; Hu ve ark. 2001).

2.4.1.1. Apoptoz Mekanizması

Apoptoz hücre içi kaspazlar ile yönlendirilen, ölüm reseptörleri aracılı dış yolak ve mitokondri ilişkili iç yolak olmak üzere iki farklı mekanizma üzerinden tetiklenmektedir. Her iki mekanizmanın temelinde hücre içinde inaktif formda bulunan kaspazların (Sisteine bağlı aspartat yönlendirmeli proteazlar, Caspase) aktif hale geçerek apoptotik sinyallerin oluşması vardır. Kaspaz-2, 8, 9, 10 apoptoz başlatmada rol oynarken kaspaz-3, 6, 7 apoptotik hücrenin morfolojisinin oluşmasından sorumludur (He ve ark. 2014).

Dış yolakta (ölüm resptörü aracılı, extrinsic) apoptotik sinyal; hücre membranında bulunan ölüm reseptörlerine (FasR, Fas reseptör; TNFR1, Tümör nekroz faktör reseptörü-1; DR4/5, ölüm reseptörü 4/5) ölüm ligandlarının (FasL, Fas ligand; TNF α , tümör nekrozis faktör alfa; TRAIL, tümör nekroz faktörü ile ilgili apoptoz-indükleyici ligand) bağlanması ile başlar. Ligand-reseptör etkileşimi sonucu, membran ölüm reseptörlerinin hücre içi tarafında bulunan FADD (Fas ilişkili ölüm domaini) ve TRADD (TNF reseptör ilişkili ölüm domaini) aktive olarak başlatıcı kaspazlardan pro-kaspaz 8 ve pro-kaspaz 10' u aktif form olan kaspaz 8 ve kaspaz 10' a dönüştürür. Aktifleşen başlatıcı kaspazlar pro-kaspaz 3' ü aktif form olan kaspaz-3 haline getirir ve hücre apoptoza sürüklenir (Elmore 2007).

İç yolak (mitokondri aracılı, intrinsic); mitokondri membran bütünlüğünü etkileyerek hücrenin hayatta kalması ya da ölüme gitmesinde rol oynayan Bcl-2 (B-hücre lenfoma 2) protein ailesi tarafından düzenlenir. Bcl-2 ailesi pro-apoptotik (BAX, BAK, BFK, Bcl-XS, BID, BAD, NOXA, PUMA) ve anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bcl-B, MCL-1, BFL1/A1) olarak iki gruba ayrılır. Kemoteropatik ajanlar, iyonize radyasyon, büyüme faktörü eksikliği ve DNA hasarları pro-apoptotik Bcl-2 protein ailesinin aktive ederken anti-apoptotik Bcl-2 protein ailesini de nötralize eder. Pro-apoptotik sinyalin artması sonucunda mitokondri iç membran potansiyeli azalır ve mitokondri dış membran geçirgenliği artarak iki membran arası boşlukta bulunan sitokrom-c sitoplazmaya salınır. Sitokrom-c, APAF-1 (aptozisi aktive eden faktör-1, Apoptotic protease activating factor-1) ve pro-kaspaz 9 ATP varlığında apoptozom kompleksi oluşturulur. Apoptozom oluşumuyla aktive edilen kaspaz-9 sırasıyla kaspaz 3, 6, 7' yi aktive ederek hücreyi apoptoza sürükler (Favaloro ve ark. 2012; Lincz 1998; Şekil 2.8).



Şekil 2.8 Apoptozis iç ve dış yolak mekanizması. (Ashkenazi 2008).

2.4.2. Otofaji

Hücrenin kendi kendini sindirmesi olarak bilinen otofaji (auto; kendi, phagy; yeme) hücre içerisindeki makro moleküllerin ve organellerin kese içerisinde lizozoma gelerek lizozamda parçalanması ile son bulan bir mekanizmadır. Hücresel stres durumlarında, besin ve büyüme faktörü eksikliğinde, hücre homeostazisinin korunmasında, hücre metabolizmasının düzenlenmesinde, morfogenezde, hücre farklılaşmasında, yaşlanmada, hücre ölümünde ve bağışıklık sistemin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında görevlidir (Gallagher ve ark. 2016). Ayrıca çok hücreli organizmalarda otofaji aynı zamanda besin ve enerji dengesinin sağlanabilmesi için, proteinlerin veya gerekli hücresel bileşenlerin hücreye geri kazanılmasında da rol oynar (Ding ve ark. 2015; Mathew ve ark. 2007).

2.4.2.1. Otofaji mekanizması

Hücreye gelen sinyal tipi ve hücre içi yapıların lizozomlara taşındıkları yollara göre 3 farklı otofaji çeşidi vardır.

1. Şaperonlar aracılı otofaji, Lys-Phe-Glu-Arg-Gln (KFERQ) motifli proteinlerin lizozom zarına seçici bir biçimde taşınması ile gerçekleşir.
2. Mikrootofaji, hücrede hasar görmüş veya gerekli olmayan organellerin ve proteinlerin otofagozom aracılığıyla lizozoma aktarılarak doğrudan yıkılması için tasarlanmış seçici bir işlemdir.
3. Makrootofaji, otofajinin en sık gözlenen ve bilinen çeşididir (Kiang ve ark. 2010).

Otofajinin başlama aşamasında mTORC1 (Rapamisin memeli hedef kompleksi - 1) ve sınıf III PI3K kompleksi (sınıf III fosfatidilinositol-3-kinaz) olmak üzere iki büyük makromolekül kompleksi etkili olur.

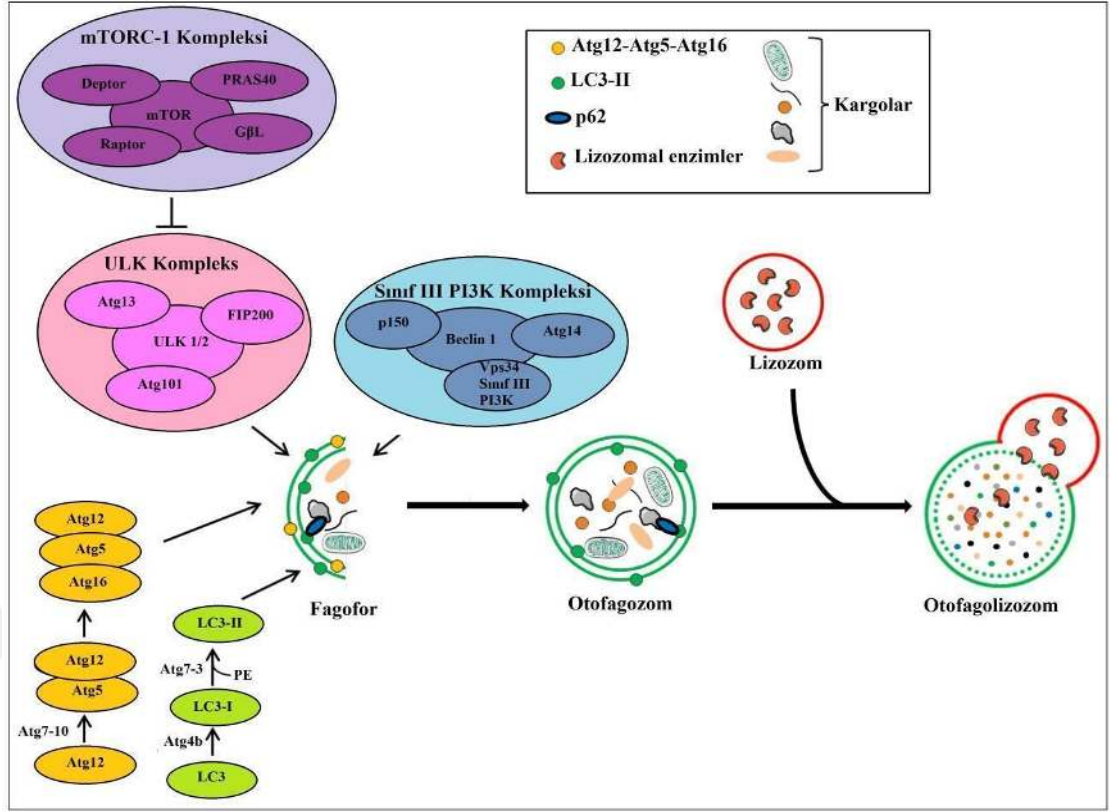
mTORC1 kompleksi; mTOR, Raptor (mTOR' un düzenleyici ilişkili protein), GβL (memeli G proteini β-altbirim benzeri protein), Deptor (DEP alanı içeren

mTOR etkileşen protein) ve PRAS40 (prolin- 40 kda'lık zengin Akt substrat) proteinlerinden oluşur. Hücredeki açlık, hipoksi ve çeşitli stres koşulları altında mTORC1 kompleksi; ULK1 / 2, Atg13 (otofajiye bağlı gen 13), FIP-200 (200 kda'lık fokal adezyon kinaz ailesi ile etkileşen protein) ve Atg101'den oluşan ULK kompleksi (UNC-51 benzeri kinaz) ile etkileşime girer. Aktifleşen ULK kompleksi otofagozom oluşumunu başlatır (Ding ve ark. 2015).

Sınıf III PI3K kompleksi sınıf III PI3K, Vps34 (vakuoler protein sıralama 34), p150, Beclin 1 ve Atg14'den oluşur. Bu kompleks Vsp34 ile aktivasyonu sonucu lipid bir molekül olan Psp3P üreterek otofagozomun uzamasında iş görür (Gallagher ve ark. 2016).

Öncü- otofagozom yapısının uzatılmasında iki ubikitin benzeri konjugasyon sistemi bulunur. Birinci konjugasyon sisteminde, Atg12, Atg 7 ve 10 aracılığıyla Atg5' e bağlanır. Daha sonra Atg16 çift kıvrımlı bölgeden Atg12-Atg5' e bağlanarak 800 kDa' luk makro bir kompleks oluşturarak otofagozomun dış zarına bağlanır ve otofagozom olgunlaştığı zaman dış zardan ayrılır. İkinci konjugasyon sisteminde, Atg4B inaktif halde bulunan LC3/Atg8 kompleksini C-terminal uçtan keserek LC3-I meydana getirir. LC3-I Atg3 ve Atg7 gerektiren ubikitin -benzeri reaksiyonda fosfatidiletanolamin (PE) ile birleşerek LC3-II formunu alır. LC3-II ve PE kompleksi otofagozomun iç zarına bağlanır (Ding ve ark. 2015; Mathew ve ark. 2007).

Otofagozom ve lizozom, Küçük GTPaz (Rab7 gibi), syntaxin 5, bazı SNARES (çözünebilir N-etilmaleimide duyarlı protein bağdaştırıcısı), LAMP1 ve LAMP2 (lizozom ile ilişkili membran proteini) ve sınıf C Vps proteinleri kapsayan çeşitli proteinler aracılığıyla füzyon oluşturur ve bunun sonucunda otofgazom içeriği parçalanır (Cohignac ve ark. 2014; Şekil 2.9).

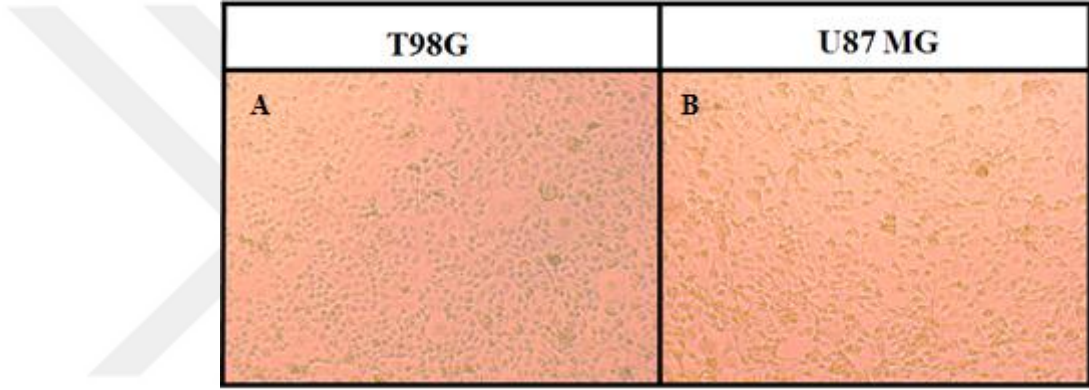


Şekil 2.9 Otofaji mekanizması (Cohignac ve ark. 2014).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Hatları Temini

İnsan GBM hücre hatları T98G ve U-87 MG, Tülay Aktaş Onkoloji Hastanesi Tıbbi Onkoloji Araştırma Laboratuvarı'nın Interlab Cell Line Collection (ICLC, İtalya) ve American Type Culture Collection (ATCC) (Wesel, Almanya)' den ticari olarak satın aldığı kanser hücre hatları panelinden temin edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Glioblastoma multiforme hücre hatları T98G (A) ve U-87 MG (B).

3.2. Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Pasajlanması

T98G hücre hattı %5 FBS (Fetal Dana Serum, Capricorn), %1 Penisilin/Streptomisin (Capricorn) ve %1 L-Glutamin (Capricorn) ilave edilen DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium, Capricorn) besiyerinde 37 °C' de %5 CO₂ içeren inkübatörde (Esco CO₂'li inkübatör) 10 cm'lik doku kültür kaplarında (Sarstedt TC Dish 100 mm, Standard 83,1802) çoğaltıldı.

U-87 MG hücre hattı %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin ve %1 L-Glutamin ilave edilen MEM (Minimum Essential Medium Eagle, Capricorn) besiyerinde 37 °C' de %5 CO₂ içeren inkübatörde 10 cm'lik doku kültür kaplarında çoğaltıldı.

Hücre devamlılığı sağlanması amacıyla 48 saat arayla kültür kaplarında çoğalan hücre hatlarının besiyerleri değiştirildi. Kültür kabındaki besiyeri vakum pompası (Vacuum Pump) ve steril pastör pipet (FL Medica) yardımıyla uzaklaştırıldı. Kültür kaplarına 24 saat için 5 ml olacak şekilde besiyeri eklenerek inkübatöre kaldırıldı.

Hücreler kültür kaplarında %80' in üzerinde hücre yoğunluğuna ulaştığında tripsinizasyon yöntemi ile pasajlama işlemi uygulandı.

- İlk olarak kültür kabında bulunan besiyeri vakum pompası yardımıyla uzaklaştırıldı.
- Kültür kaplarına 4 ml PBS (Fosfat Tuz Tamponu, invitrogen) eklenerek yüzey yıkandı ve PBS vakum pompası ile uzaklaştırıldı.
- Daha sonra kültür kaplarına 1,5 ml Tripsin-EDTA (%0,025'li, Capricorn) eklenerek 2-5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübatörden çıkartılan kültür kaplarına Tripsin-EDTA' nın enzimatik etkisini nötralize etmek için 4 ml besiyeri ilave edildi.
- Pipetaj işlemi ile toplanan hücreler 15 ml' lik falkon tüplere aktararak 2850 rpm de 5 dakika santrifüj (nüve) edildi.
- Santrifüj sonrası falkon tüpteki süpernatant vakum pompası ile uzaklaştırıldı. Tüpün dibinde kalan pellet 1 ml besiyerinde süspanse edildi.
- 24 saat için 5 ml besiyeri eklenen kültür kaplarına falkon tüpte çözölen hücre süspansiyonundan 250 µl eklenerek inkübatöre kaldırıldı.

3.3. Hücre Hatlarının Dondurulması ve Saklanması

Çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmak üzere hücre hatları dondurularak stok alındı.

- İlk olarak kültür kabında bulunan besiyeri vakum pompası yardımıyla uzaklaştırıldı.
- Kültür kaplarına 4 ml PBS eklenerek yüzey yıkandı ve PBS vakum pompası ile uzaklaştırıldı.

- Daha sonra kültür kaplarına 1,5 ml Tripsin-EDTA eklenerek 2-5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübatörden çıkartılan kültür kaplarına Tripsin' in enzimatik etkisini nötralize etmek için 4 ml besiyeri ilave edildi.
- Pipetaj işlemi ile toplanan hücreler 15 ml' lik falkon tüplere aktararak 2850 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası falkon tüpteki süpernatant vakum pompası ile uzaklaştırıldı.
- Tüpün dibinde kalan pellet 1 ml dondurma solüsyonunda (%90 FBS, %10 DMSO; Dimetil sülfoksit, Sigma) süspanse hale getirildi
- Süspanse hale gelen hücreler kriyo tüpe konularak -80 °C' deki dondurucuya (New Brunswick, Ultra-low Temperature Freezer) kaldırıldı.

3.4. Hücre Sayımı

Yapılan her bir deneyde belirli sayıda hücre ile işleme başlamak amacıyla Thoma lamı ile hücre sayımı yapıldı.

- Hücreler kültür kabından tripsinizasyon işlemi ile kaldırılarak falkon tüplere aktarıldı.
- 2850 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi.
- Tüpteki süpernatant vakum pompası ile uzaklaştırıldı, dipte kalan pellet 1 ml besiyerinde çözüldü.
- Süspanse hale gelmiş sıvıdan 50 µl çekilip 1,5 ml' lik mikrosantrifüj tüplerine konuldu ve üzerine 50 µl tripan-mavisi ilave edildi.
- Pipetaj yapıldıktan sonra 50 µl çekilip Thoma lamı üzerine konuldu ve inverted ışık mikroskobunda (Leica DMIL) hücreler sayıldı.

Hücre membran bütünlüğü bozulduğu için mavi renkli boyanan hücreler ölü, mavi renkli boyanmayan beyaz hücreler canlı kabul edildi. Thoma lamının üzerindeki beş bölgedeki hücreler sayılıp aşağıda belirtilen formüle göre 1ml' de bulunan hücre sayısı hesaplandı.

$$\text{Hücre/ml} = \frac{5 \text{ karede sayılan toplam hücre sayısı} \times \text{dilasyon faktörü} \times 10^4}{5}$$

Falkon tüp içerisinde süspanse halde bulunan hücreler, kurulacak deney planı için hesaplanan hücre sayısı doğrultusunda dilue edilerek hücre ekim işlemi gerçekleştirildi.

3.5. Hücre Kinetiği

THZ' nin hücre canlılığı çalışmalarında kullanılacak hücre sayısını belirleme amacıyla hücre kinetikleri oluşturuldu. T98G ve U-87 MG hücre hatlarının kinetiğini oluşturmak amacıyla 96 kuyucuklu plakalara 5×10^2 - 8×10^4 hücre/kuyucuk hücre ekildi. Her kuyucuğa 200 µl ortam ilave edildi. MTT yöntemi kullanılarak 24., 48., 72. ve 96. saatlerde absorbans değerleri ölçüldü.

3.6.Hücre Hatlarının İkilenme Sürelerinin Hesaplanması

Çalışmada kullanılacak olan T98G ve U-87 MG hücre hatlarının ikilenme sürelerinin hesaplanması için altı kuyucuklu plakalara $2,5 \times 10^5$ hücre/kuyucuk 24.,48.,72. ve 96. saatlerde ölçüm yapılacak şekilde ikişer tekrarlı olarak ekim yapıldı. Kuyucuklara 5 ml ortam eklendi ve kuyucukların 24, 48, 72 ve 96 saat sonraki sayımları yapıldı.

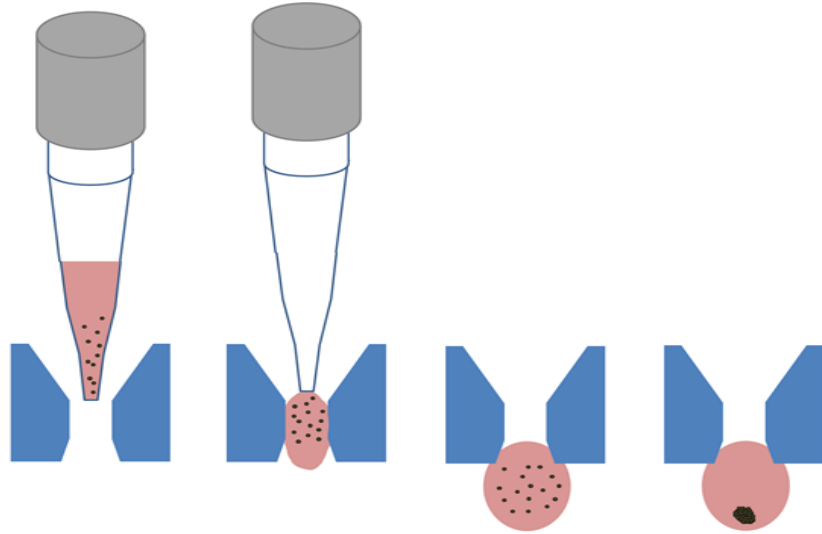
3.7.Tiyoridazin (THZ)' in Hazırlanması

Son konsantrasyon 24,5 µM olacak şekilde 10 mg toz halindeki THZ (sigma T9025) hassas terazide tarttırıp 1 ml distile su içerisinde çözüldü. Bir deney için kullanılacak en yüksek miktar hesaplanarak bu miktara uygun bir biçimde 1ml' lik tiyoridazin küçük hacimlere bölünerek (aliquatlar) – 20 °C' ye kaldırırdı.

3.8. Monolayer ve Sferoid Hücre Kültürlerine Tiyoridazin Uygulaması

Monolayer hücre kültürü için Thoma lamı ile hücre sayım işleminden sonra 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna 200 μ l içerisinde 10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücrelerin plakanın tabanına tutunmaları için 24 saat 37 °C, % 5 CO₂' de inkübasyona bırakıldı.

Sferoid hücre kültürü için asılı damla yöntemi kullanıldı. Hücreler, 96 kuyucuklu asılı damla plakalarına 45 μ l içerisinde 10^3 hücre olacak şekilde ekildi. Asılı damla yönteminin protokolü esas alınarak plakanın altındaki tabla haznelere 1'er ml, plakanın kendi haznelere 2'şer ml PBS eklenerek sferoid oluşumu gerçekleşmesi için 72 saat 37 °C, %5 CO₂' de inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.2). Sferoid form alan GBM hücrelerine aynı zamanda gliomasfer denilmektedir (Laks ve ark. 2016).



Şekil 3.2 Sferoid hücre kültürü için asılı damla yöntemi.

THZ' nin 24., 48. ve 72. saatlerdeki hücre canlılığını belirlemek için her iki hücre kültürüne de ilacın artan konsantrasyonları (100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 12,5 μ M, 15 μ M, 17,5 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M) uygulandı.

Monolayer hücre kültürü için hazırlanan 96 kuyucuklu plakalardan ortam

uzaklaştırdı. Her kuyucuk için hazırlanan ilaç konsantrasyonlarından 200 µl eklendi. Sferoid hücre kültürüne ise her kuyucuğa 5 µl eklendi.

3.9. THZ' in Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi ve IC₅₀ Değerinin Hesaplanması

U-87 MG ve T98G hücre hatlarının monolayer ve sferoid kültürlerine belirli zaman aralıklarında (24-72 saat) farklı konsantrasyonlarda (100 nM, 1 µM, 10 µM, 12,5 µM, 15 µM, 17,5 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM) THZ uygulandıktan sonra kolorimetrik bir yöntem olan MTT testi (3- [4,5- dimethylthiazol- 2- yl]- 2,5-diphenyl- tetrazolium bromide, Sigma) ile hücre canlılığı/zindeliği (viability/vitality) ölçüldü. MTT stok solüsyonu, 5 mg/ml olacak şekilde steril PBS içerisinde çözündürülerek hazırlandı. Stok MTT kuyucuktaki son hacimde 1:10 oranında olacak şekilde besiyerinde dilüe edildi.

Sferoid hücre kültürleri için hazırlanan 96 kuyucuklu asılı damla plakaları U tabanlı 96 kuyucuklu plakalara aktarıldı. Aktarım işlemi sırasında oluşan sferoidlerin dağılmamaları için U tabanlı plakaların her kuyucuğuna 50 µl hazır besiyeri eklendikten sonra sferoidler asılı damla kuyucuğu üzerinden 100 µl hava verilerek aktarıldı.

Monolayer hücre kültüründe 96 kuyucuklu plakalardan THZ içeren besiyeri vakum pompası ile uzaklaştırdı. Her kuyucuğa 200 µl dilüe edilen (1:10) MTT solüsyonu eklendi.

MTT ışığa duyarlı olduğu için 96 kuyucuklu plakalar alüminyum folyo ile sarıldı. 4 saat 37°C'de %5 CO₂ de inkübe edildi. 4 saat sonra MTT içeren ortam uzaklaştırıldı. Kuyucuklara 200 µl %100 DMSO eklenerek oluşan mor formazan kristallerinin çözülmesi için 15 dakika shaker da bekletildi. Oluşan mor formazan miktarı 570-690 referans aralıklarında mikropilaka okuyucu kullanılarak ölçüldü. % Hücre canlılığı, ilaç konsantrasyonları uygulanan Kuyucukların Absorbans Ortalaması / Kontrol Kuyucuklarının Absorbans Ortalaması olarak hesaplandı.

Sonuçlar Mikrosoft Excel (XP) ve Graphpad Prism yazılımı aracılığıyla grafiksel olarak değerlendirildi, ilacın hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon (50% Inhibition Concentration, IC₅₀) değeri hesaplandı.

3.10. Ölüm yolağına spesifik inhibitörlerin kullanımı

3.10.1. Apoptotik inhibitörler

Apoptoz yolağı üzerinden THZ' nin sitotoksik etkilerini incelemek amacıyla dış yolak için kaspaz-8 inhibitörü (Z-IETD-FMK, Kang ve ark. 2014; Antonopoulos ve ark. 2015) ve iç yolak için kaspaz-9 inhibitörü (Z-LEHD-FMK, Fukushima ve ark. 2008; Gomes ve Colquhoun 2012) kullanıldı. Kullanılan inhibitörler temelde pro-kaspaz8 ve pro-kaspaz-9' un katalitik bölgelerine spesifik olarak bağlanarak onların aktif formlarına geçmelerini engelleyerek apoptoz yolağının inhibe edilmesini sağlarlar.

3.10.1.1.Monolayer Hücre Kültürüne Cas 8 ve 9 İnhibitörlerinin Eklenmesi

- Kaspaz 8 ve kaspaz 9 inhibitörleri DMSO içinde 20 µl ve 10 mM olarak temin edildi ve -20 °C' de saklandı.
- Monolayer hücre kültürü için 96 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 200 µl' de 10⁴ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37 °C' de %5 CO₂'de inkübe edildi.
- Kaspaz inhibitörleri 20 µM olacak şekilde besiyerinde seyreltildi. 1000 µl besiyerine ana stoktan (10 mM) 2µl ilave edildi.
- Monolayer hücre kültüründe 24 saat sonra 96 kuyucuklu plakadaki hazır besiyeri vakum pompası ile uzaklaştırıldı.
- Kontrol ve THZ (IC₅₀ konsantrasyonunda) eklenecek kuyucuklara 100 µl besiyeri eklendi.
- Bir inhibitör eklenecek kuyucuğa 50 µl, iki inhibitör eklenecek kuyucuğa 25 µl ve üç inhibitör eklenecek kuyucuğa 16,6 µl inhibitör ilave edilerek 1 saat inhübüsyona bırakıldı.
- THZ' nin IC₅₀ konsantrasyonu hesaplanarak (kontrol grupları hariç) her

kuyucuğa 50 µl eklendi ve 24 saat inkübisyona bırakıldı.

- 24 saat sonunda kuyucuklardaki sıvı vakum pompası ile uzaklaştırıldı.
- Üzerlerine 200 µl MTT solüsyonu eklendi.
- Plakalar alüminyum ile ışık görmeyecek şekilde kaplandı ve 4 saat boyunca inkübatörde bekletildi.
- Plakalardaki MTT uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 200 µl DMSO eklenerek 15 dakika shakerde sallandı.
- Plakalar Elx800 absorbands okuyucuda 540-620 absorbands aralığında okutuldu.

3.10.1.2. Sferoid Hücre Kültürüne Cas 8 ve 9 İnhibitörlerinin Eklenmesi

- Sferoid hücre kültürü için asılı damla plakalarının tabandaki bölmesine 2 ml ekim yapılan bölmesinin yan kısımlarına 4 ml PBS eklendi.
- Her kuyucuğa 40 µl içerisinde 3×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 72 saat 37°C'de %5 CO₂'de sferoid oluşumu beklendi.
- Kaspaz inhibitörleri 20 µM olacak şekilde hazır besiyerinde seyreltildi. 1000 µl hazır besiyerine ana stokdan (10 mM) 2µl ilave edildi.
- Sferoid hücre kültüründe 72 saat sonunda her asılı damla kuyucuklarına bir inhibitör eklenecek kuyucuğa 5 µl, iki inhibitör eklenecek kuyucuğa 2,5 µl ve üç inhibitör eklenecek kuyucuğa 1,66 µl eklendi ve 16 saat inkübisyona bırakıldı.
- THZ' nin IC₅₀ konsantrasyonu hesaplanarak (kontrol grupları hariç) her kuyucuğa 5 µl eklendi ve 24 saat inkübisyona bırakıldı.
- U- tabanlı plakalara 50 µl besiyeri eklendi.
- 16 saat sonra asılı damla plakalarından 120 µl hava verilerek asılı damlacıklar U tabanlı plakalara aktarıldı.
- Üzerlerine 100 µl MTT solüsyonu eklenerek inkübatörde 8 saat beklendi. (U tabanlı plakada 100 µl hücreli hazır besiyeri olduğu için kuyucuklara eklendiğinde dilüsyon oranının değişmemesi için MTT solüsyonu %10 yerine %20 olarak hesaplanıp hazırlandı)
- Plakalardaki MTT uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 200 µl DMSO eklenerek 15 dakika shakerde sallandı.

- Plakalar Elx800 absorbands okuyucuda 540-620 absorbands aralığında okutuldu.

3.10.2. Otofajik inhibitör

THZ' nin sitotoksik etkisinin otofaji yolağı üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için otofaji mekanizmasını spesifik olarak inhibe eden klorokin difosfat tuzu (CQ) kullanıldı. Klorokin, endozomal asidifikasyonu önleyen bir lizozomotropik ajandır. CQ pH seviyesini yükselterek lizozomal enzimleri inhibe eder ve otofagozomla füzyonunu engeller. Bu sayede otofaji yolağı inhibitör kullanılarak inhibe edilmiş olur (Solomon ve Lee 2009; Liang ve ark. 2014).

3.10.2.1. Monolayer Hücre Kültürüne CQ İnhibitörlerinin Eklenmesi

- Klorokin difosfat tuzu 25 g toz olarak oda ısısında saklandı.
- Monolayer hücre kültürü için 96 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 200 µl' de 10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37°C' de %5 CO₂'de inkübe edildi.
- Klorokin 5 mg (0,005 g) hassas terazide tartıldı. Üzerine 9690 µl saf su eklenerek vortekste çözüldü. Son konsantrasyonu 1000 µM olarak hesaplandı ve +4 °C' de saklandı.
- Klorokin inhibitörü 50 µm olacak şekilde hazır besiyeri ile seyreltildi. 142,5 µl hazır besiyerinin üzerine 7,5 µl CQ (Ana stok 1000 µm) ilave edildi.
- Monolayer hücre kültüründe 24 saat sonra 96 kuyucuklu plakadaki hazır besiyeri vakum pompası ile uzaklaştırıldı.
- Kontrol ve THZ (IC₅₀ konsantrasyonunda) eklenecek kuyucuklara 100 µl besiyeri eklendi.
- Bir inhibitör eklenecek kuyucuğa 50 µl, iki inhibitör eklenecek kuyucuğa 25 µl ve üç inhibitör eklenecek kuyucuğa 16,6 µl inhibitör ilave edilerek 1 saat inhübüsyona bırakıldı.
- THZ' nin IC₅₀ konsantrasyonu hesaplanarak (kontrol grupları hariç) her kuyucuğa 50 µl eklendi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı.
- 24 saat sonunda kuyucuklardaki sıvı vakum pompası ile uzaklaştırıldı.

- Üzerlerine 200 µl MTT solüsyonu eklendi.
- Plakalar alüminyum ile ışık görmeyecek şekilde kaplandı ve 4 saat boyunca inkübatörde bekletildi.
- Plakalardaki MTT uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 200 µl DMSO eklenerek 15 dakika shakerde sallandı.
- Plakalar Elx800 absorbands okuyucuda 540-620 absorbands aralığında okutuldu.

3.10.2.2. Sferoid Hücre Kültürüne CQ İnhibitörlerinin Eklenmesi

- Sferoid hücre kültürü için asılı damla plakalarının tabandaki bölmesine 2 ml ekim yapılan bölmesinin yan kısımlarına 4 ml PBS eklendi.
- Her kuyucuğa 40 µl içerisinde 3×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 72 saat 37 °C’de %5 CO₂’ de sferoid oluşumu beklendi.
- Klorokin 5 mg (0,005 g) hassas terazide tartıldı. Üzerine 9690 µl saf su eklenerek vortekste çözüldü. Son konsantrasyonu 1000 µM olarak hesaplandı ve +4 °C’ de saklandı.
- Klorokin inhibitörü 50 µM olacak şekilde hazır besiyeri ile seyreltilti. 142,5 µl hazır besiyerinin üzerine 7,5 µl CQ (Ana stok 1000 µM) ilave edildi.
- Sferoid hücre kültüründe 72 saat sonunda her asılı damla kuyucuklarına bir inhibitör eklenecek kuyucuğa 5 µl, iki inhibitör eklenecek kuyucuğa 2,5 µl ve üç inhibitör eklenecek kuyucuğa 1,66 µl eklendi ve 16 saat inkübasyona bırakıldı.
- THZ’ nin IC₅₀ konsantrasyonu hesaplanarak (kontrol grupları hariç) her kuyucuğa 5 µl eklendi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı.
- U- tabanlı plakalara 50 µl besiyeri eklendi
- 16 saat sonra asılı damla plakaları 120 µl hava verilerek asılı damlacıklar U tabanlı plakalara aktarıldı.
- Üzerlerine 100 µl MTT solüsyonu eklenerek inkübatörde 8 saat beklendi. (U tabanlı plakada 100 µl hücreli hazır besiyeri olduğu için kuyucuklara eklendiğinde dilüsyon oranı değişmemesi için MTT solüsyonu %10 yerine %20 olarak hesaplanıp hazırlandı)
- Plakalardaki MTT uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 200 µl DMSO eklenerek 15

dakika shakerde sallandı.

- Plakalar Elx800 absorbands okuyucuda 540-620 absorbands aralığında okutuldu.

3.11. Hücre Ölüm Tiplerinin Belirlenmesi

THZ' nin sitotoksik etkisinin hangi ölüm mekanizması üzerinden etki ettiğinin tespiti için Muse analiz hücre kitleri ve doğrulama yöntemi olarak spesifik inhibitörler kullanıldı.

3.11.1. Muse® Annexin V & Dead Cell Kiti ve Ölüm Tipine Spesifik İnhibitörler ile Apoptozun Belirlenmesi

Muse® Annexin V & Dead Cell Kiti, adherent (yapışık) ve süspanse hücre hatlarında canlı, erken veya geç apoptoz ve ölü hücreleri floresans temelli nicel analizini yapan bir yöntemdir. Hücre zarı lipidlerinden fosfatidilserinin (PS) plazma membranının iç yüzeyinden dış yüzeyine translokasyonu sonucunda hücre membran bütünlüğü bozulur ve hücre apoptoza girmeye başlar. Yöntemde membran dış yüzeyüne transloke olan PS' e bağlanabilen kalsiyum bağımlı Anneksin V proteini ve bu bağlanmayı görünür hale getiren 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) boyası kullanılır. 7-AAD çift zincirli DNA' ya bağlanır. Apoptozun erken safhasında hücre membran bütünlüğü korunduğu için 7-AAD boyanması gözlenmez, ancak geç apoptoz safhasında hücre membran bütünlüğü bozulur ve 7-AAD DNA' ya bağlanır (Kerr ve ark. 1972; Hammill ve ark. 1999; Gaforio ve ark. 2002; Zembruski ve ark. 2012; Chen ve ark. 2017). Bu kit kullanılarak apoptozun erken ve geç evreleri ayrı ayrı gösterilebilmektedir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 Hücrelerin Apoptotik evrelerinin Anneksin V ve 7-AAD belirteçleri.

Belirteçler	Belirlenen Evreler			
	Canlı	Erken apoptoz	Geç apoptoz	Nekrotik Nükleer Debris
Annexin V	-	+	+	-
(7-AAD)	-	-	+	+

Kontrol hücrelerinin ve ilacın hem IC₅₀ konsantrasyonlarıyla hem de spesifik inhibitörler ile muamele edilen hücrelerin apoptoz evrelerinin belirlenmesi için;

Monolayer hücre kültüründe;

- Monolayer hücre kültüründe son hücre konsantrasyonu 1×10^5 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara 200 µl besiyerinde 24 saat 37°C ,% 5 CO₂' de inkübe edildi.
- 24 saat sonunda 96 kuyucuklu plakadaki hazır besiyeri vakum pompası ile uzaklaştırdı.
- Kontrol ve THZ (IC₅₀ konsantrasyonunda) eklenecek kuyucuklara 100 µl, inhibitör eklenecek kuyucuklara 50 µl besiyeri eklendi.
- Kaspaz 8 (20 µM), kaspaz 9 (20 µM) ve CQ (50 µM) inhibitörleri kuyucuklara 50 µl ilave edilerek 1 saat inhübüsyona bırakıldı.
- THZ' nin IC₅₀ konsantrasyonu hesaplanarak (kontrol grupları hariç) her kuyucuğa 50 µl eklendi ve 24 saat inkübisyona bırakıldı.
- Tripsinizasyon işlemi ile mikrosantrifüj tüplerine toplanan monolayer kültür hücreleri 1000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi.
- Pellet PBS ile çözüldü ve tekrar 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldü.
- Tüplerdeki pellet üzerine %1 FBS içeren 100 µl besiyeri eklendi ve pipetajla hücre süspansiyonu oluşturuldu.

- Oda sıcaklığına getirilmiş olan Muse® Annexin V ve ölü hücre kit solüsyonundan her tüpe 150 µl eklenip yavaşça pipetaj yapıldı.
- Karanlıkta, oda sıcaklığında, 20 dakika inkübe edildi.
- Muse hücre analiz cihazında Muse® Annexin V ve ölü hücre kit protokolüne uygun olarak analizi yapıldı.

Sferoid hücre kültüründe;

- Sferoid hücre kültürünü asılı damla yönteminde her kuyucukta 40 µl besiyerinde 3×10^3 hücre olacak şekilde toplam 60 kuyucuğa ekim yapılarak 72 saat 37°C, %5 CO₂' de inkübe edildi.
- Sferoid formu oluştuktan sonra inhibitör eklenecek kuyucuklara 5 µl inhibitör ilave edildi ve 16 saat boyunca inkübe edildi.
- THZ' nin IC₅₀ konsantrasyonu hesaplanarak (kontrol grupları hariç) her kuyucuğa 5 µl eklendi ve 24 saat inkübisyona bırakıldı.
- Asılı damla plakalarında oluşan sferoidler 1000 µl' lik pipetlerle üstten çekilerek mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
- Tüpler hücrelerin sferoid yapıdan ayrılıp tüpte homojen olarak dağılmalarını sağlamak için 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet PBS ile çözüldü ve tekrar 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldü.
- Tüplerdeki pellet üzerine %1 FBS içeren 100 µl besiyeri eklendi ve pipetajla hücre süspansiyonu oluşturuldu.
- Oda sıcaklığına getirilmiş olan Muse® Annexin V ve ölü hücre kit solüsyonundan her tüpe 150 µl eklenip yavaşça pipetaj yapıldı.
- Karanlıkta, oda sıcaklığında, 20 dakika inkübe edildi.
- Muse hücre analiz cihazında Muse® Annexin V ve ölü hücre kit protokolüne uygun olarak analizi yapıldı.

3.11.2 Muse® Autophagy LC3-antibody based Kit ve Ölüm Tipine Spesifik İnhibitörler ile Otofajinin Belirlenmesi

Muse® Autophagy LC3-antibody based Kit LC3 seviyesinin floresans temelli ölçümünü kullanarak analiz eden bir yöntemdir. Otofaji Reaktif A (Autophagy Reagent A) solüsyonu LC3' ün lizozomal parçalanmasını engelleyerek flow (akış) sitometri ile miktarının belirlenmesini sağlar. Spesifik otofaji reaktifleri, antikor ve sitozolik LC3 ile lipid formdaki LC3' ü ayırt ederek otofaji ölçümü yapar. Sitozolde bulunan LC3 ile otofagozoma tutunan LC3' ü birbirinden ayırmak ve korumak için iki farklı otofaji reaktifi kullanılır. Otofaji reaktif A LC3' ün lizozomal parçalanmasını önlemek amacıyla, otofaji reaktif B ise hücre membranının seçici geçirgenliğini bozarak otofagozomal LC3-II ile sitozolik LC3-I ayrımının yapılabilmesi için kullanılır. Flow sitometri kullanılarak LC3' ün yer değişimleri izlenerek sitozolik ve otofagozoma bağlı LC3 arasındaki ayrımı yapılabilmektedir. Otofagozomal LC3 seviyesini belirlemek için Anti-LC3 Alexa Fluor®555 yani anti-LC3 fare monoklonal antikor kullanılır (Fleming ve ark. 2011; Tian ve ark. 2011).

Kontrol hücrelerinin ve ilacın hem IC₅₀ konsantrasyonlarıyla hem de spesifik inhibitörler ile otofaji belirlenmesi için;

Monolayer hücre kültüründe;

- Monolayer hücre kültüründe son hücre konsantrasyonu 4×10^4 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara 200 µl besiyerinde 24 saat 37 °C ,% 5 CO₂ de inkübe edildi.
- 24 saat sonunda 96 kuyucuklu plakadaki hazır besiyeri vakum pompası ile uzaklaştırdı.
- Kontrol ve THZ (IC₅₀ konsantrasyonunda) eklenecek kuyucuklara 100 µl, inhibitör eklenecek kuyucuklara 50 µl besiyeri eklendi.
- Kaspaz 8 (20 µM), kaspaz 9 (20 µM) ve CQ (50 µM) inhibitörleri kuyucuklara 50 µl ilave edilerek 1 saat inhübüsyona bırakıldı.
- THZ' nin IC₅₀ konsantrasyonu hesaplanarak (kontrol grupları hariç) her kuyucuğa 50 µl eklendi ve 24 saat inkübüsyona bırakıldı.

- Tripsinizasyon işlemi ile mikrosantrifüj tüplerine toplanan monolayer kültür hücreleri 1000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi.
- Pellet PBS ile çözüldü ve tekrar 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi.
- İlaç ile muamele edilen hücreler açlık koşulları altında otofajinin uyarılması için 200 µl PBS + 0,2 µl Autophagy Reagent A (1:1000 dilution) 37°C de 2-6 saat inkübasyona bırakıldı. Kontrol hücrelerine sadece FBS içeren besiyeri eklendi.
- Bekleme süresinden sonra 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı.
- Her tüpe 100 µl PBS eklendi ve 2500 rpm' de 5 dakika 4 °C' de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Tüplerdeki pelletlerin üzerine 5 µl Anti-LC3 Alexa Fluor®555 ve 95 µl 1X Autophagy Reagent B eklendi. Yavaşça pipetaj yapıldı.
- Karanlıkta 30 dakika buz üzerinde bekletildi.
- 2500 rpm' de 4 °C' de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Her tüpe 200 µl 1X Assay Buffer eklendi ve Muse cihazıyla uyumlu program seçilerek analiz yapıldı.

Sferoid hücre kültüründe;

- Sferoid hücre kültürünü asılı damla yönteminde her kuyucukta 40 µl besiyerinde 3×10^3 hücre olacak şekilde toplam 60 kuyucuğa ekim yapılarak 72 saat 37°C, %5 CO₂' de inkübe edildi.
- Sferoid formu oluştuktan sonra inhibitör eklenecek kuyucuklara 5 µl inhibitör ilave edildi ve 16 saat boyunca inkübe edildi.
- THZ' nin IC₅₀ konsantrasyonu hesaplanarak (kontrol grupları hariç) her kuyucuğa 5 µl eklendi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı.
- Asılı damla plakalarında oluşan sferoidler 1000 µl' lik pipetlerle üstten çekilerek mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
- Tüpler hücrelerin sferoid yapıdan ayrılıp tüpte homojen olarak dağılmalarını sağlamak için 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar uzaklaştırıldı.
- Pellet PBS ile çözüldü ve tekrar 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi.
- İlaç ile muamele edilen hücreler açlık koşulları altında otofajinin uyarılması

için 200 µl PBS + 0,2 µl Autophagy Reagent A (1:1000 dilution) 37°C de 2-6 saat inkübüsyona bırakıldı. Kontrol hücrelerine sadece FBS içeren besiyeri eklendi.

- Bekleme süresinden sonra 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı.

- Her tüpe 100 µl PBS eklendi ve 2500 rpm' de 5 dakika 4 °C' de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.

- Tüplerdeki pelletlerin üzerine 5 µl Anti-LC3 Alexa Fluor®555 ve 95 µl 1X Autophagy Reagent B eklendi. Yavaşça pipetaj yapıldı.

- Karanlıkta 30 dakika buz üzerinde bekletildi.

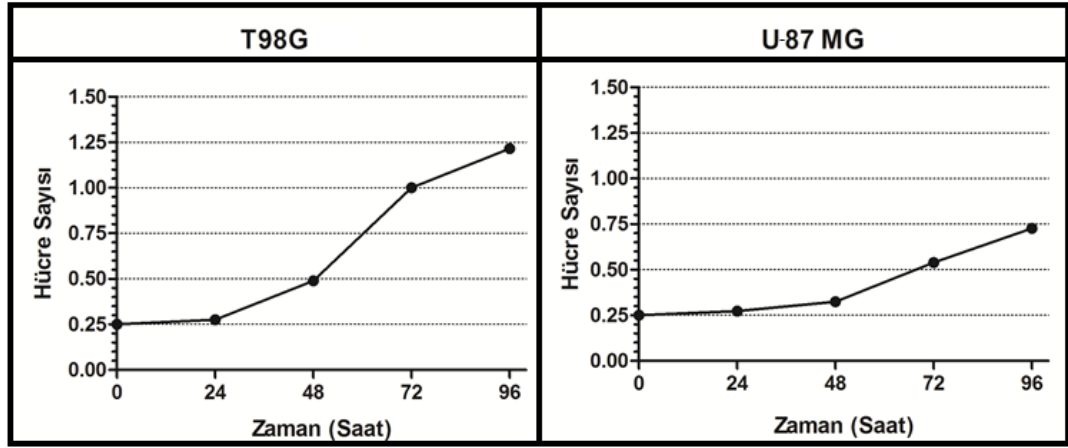
- 2500 rpm' de 4 °C' de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.

- Her tüpe 200 µl 1X Assay Buffer eklendi ve Muse cihazıyla uyumlu program seçilerek analiz yapıldı.

4. BULGULAR

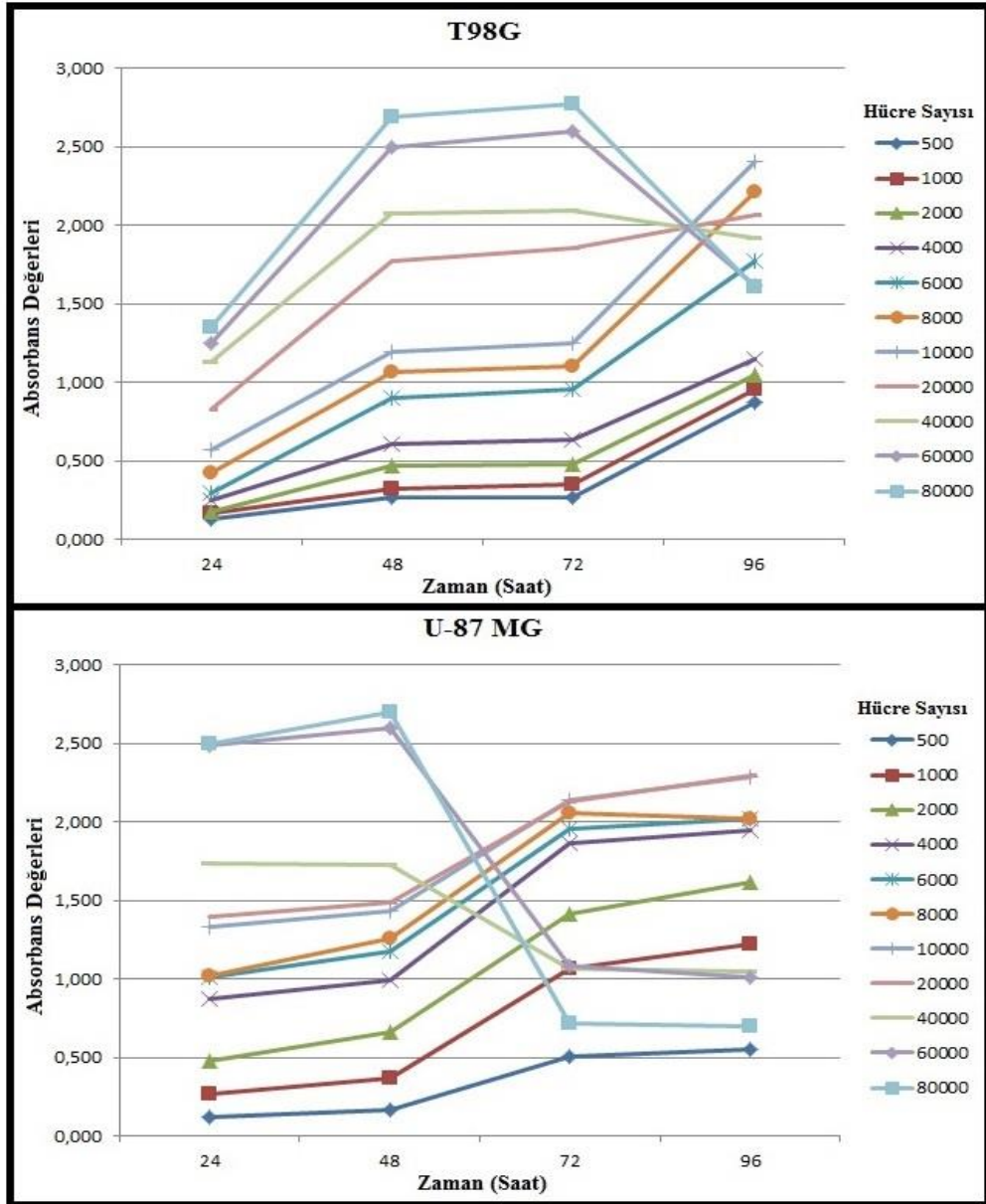
4.1. T98G ve U-87 MG Hücre Hatlarının İkilenme Sürelerinin Belirlenmesi ve Kinetiğinin Oluşturulması

24., 48., 72. ve 96. saatlerde sayımları yapılan T98G ve U-87 MG hücre hatlarının ikilenme süreleri hesaplandı (Şekil 4.1). Buna göre T98G ve U-87 MG'nin ikilenme süreleri sırasıyla 48 ve 72 saat olarak belirlendi.



Şekil 4.1. T98G hücre hattının ikilenme süresi 48 saat, U-87 MG hücre hattının ikilenme süresi ise 72 saat olarak belirlendi.

T98G ve U-87 MG hücre hatlarının 24., 48., 72. ve 96. saatlerdeki absorbans değerleri MTT yöntemi kullanılarak ölçüldü (Şekil 4.2). Sitotoksite çalışmalarında kullanılacak olan hücre sayısını belirlemek için şekilde gösterilen hücre sayıları dikkate alınarak absorbans değerleri karşılaştırıldı. Deney protokolüne uygun olması için 48 saat temel alınarak absorbans değerinin 1.000 üzerinde olan hücre sayıları belirlendi. Her iki hücre hattı için kuyucuk başına ekilecek hücre sayısının 10^4 hücre/kuyucuk olması uygun görüldü.

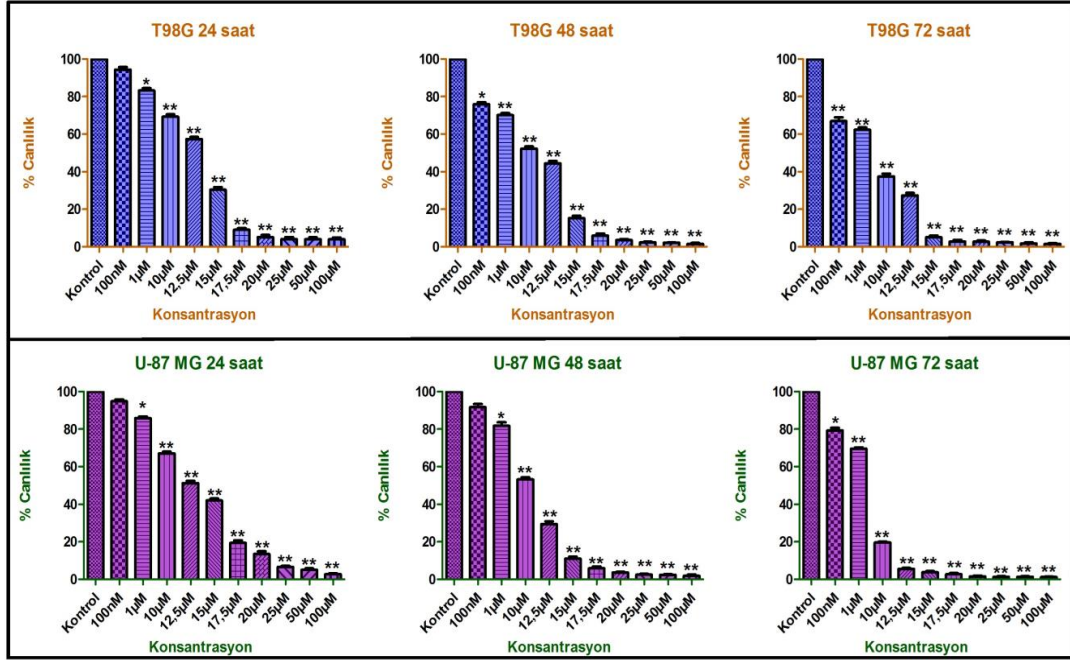


Şekil 4.2 sitotoksite çalışmalarında kullanılacak hücre sayısının hesaplanmasında absorbans değeri 1.000 üzerinde olan eğriler değerlendirildi. T98G ve U-87 MG hatları için ekilecek hücre sayısı 10^4 hücre/kuyucuk olarak belirlendi.

4.2. GBM Hücre Hatlarının Monolayer ve Sferoid Kültürlerinde THZ' nin Hücre Canlılığa Etkisi (MTT Analizi)

Monolayer GBM hücre kültürlerinde (T98G, U-87 MG) THZ' nin sitotoksik etkisi hem artan konsantrasyonlarda (100nM-100µM) hem de zamana (24, 48, 72

saat) bağılı olarak analiz edildi (Şekil 4.3). Kontrol grubuna göre canlılık oranları şekil 4.3’ de gösterilen hücre hatlarında THZ’ nin 24. saatte anlamlı bir etki yarattığı 48. ve 72. saatlerde etkisinin 24. saatten sonra fazla değişiklik göstermediği saptanmıştır. Çalışmanın bu aşamasından sonra THZ’ nin 24. saatteki etkileri göz önünde bulundurularak deneylere devam edilmeye karar verildi.



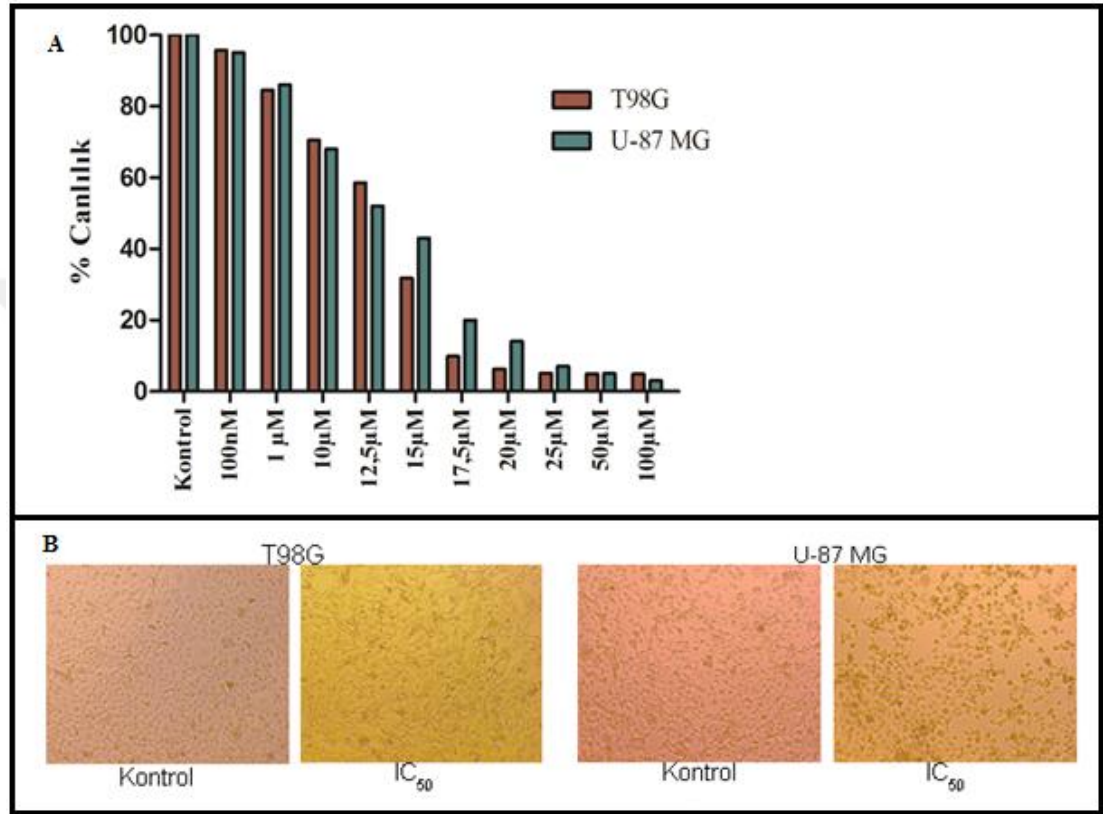
Şekil 4.3 Monolayer hücre kültüründe T98G ve U-87 MG hücre hatlarının 24.,48.,72. saatteki hücre canlılıklarının MTT yöntemi ile belirlenmesi (*p<0.01,**p<0.001).

4.2.1. Monolayer Hücre Kültüründe THZ’ nin Hücre Canlılığa Etkisi

Monolayer kültürde T98G ve U-87 MG hücre hatlarında THZ’ nin hücre canlılığına 24. saatteki etkisi Tablo 4.1’ de gösterilmiştir (Şekil 4.4 A). T98G ve U-87 MG hücrelerinin 24. saatteki IC₅₀ değeri 12,67 µM ve 12,80 µM olarak istatistik programı Graphpad Prism 5 kullanılarak hesaplandı (Şekil 4.4 B).

Tablo 4.1. Monolayer kültürde GBM hücre hatlarının yüzdesel canlılık oranları.

Konsantrasyon	Kontrol	100nM	1µM	10µM	12,5µM	15µM	17,5µM	20µM	25µM	50µM	100µM
T98G	100	96	84	71	59	32	10	7	5	4	4
U-87 MG	100	96	87	68	52	43	21	15	7	6	3



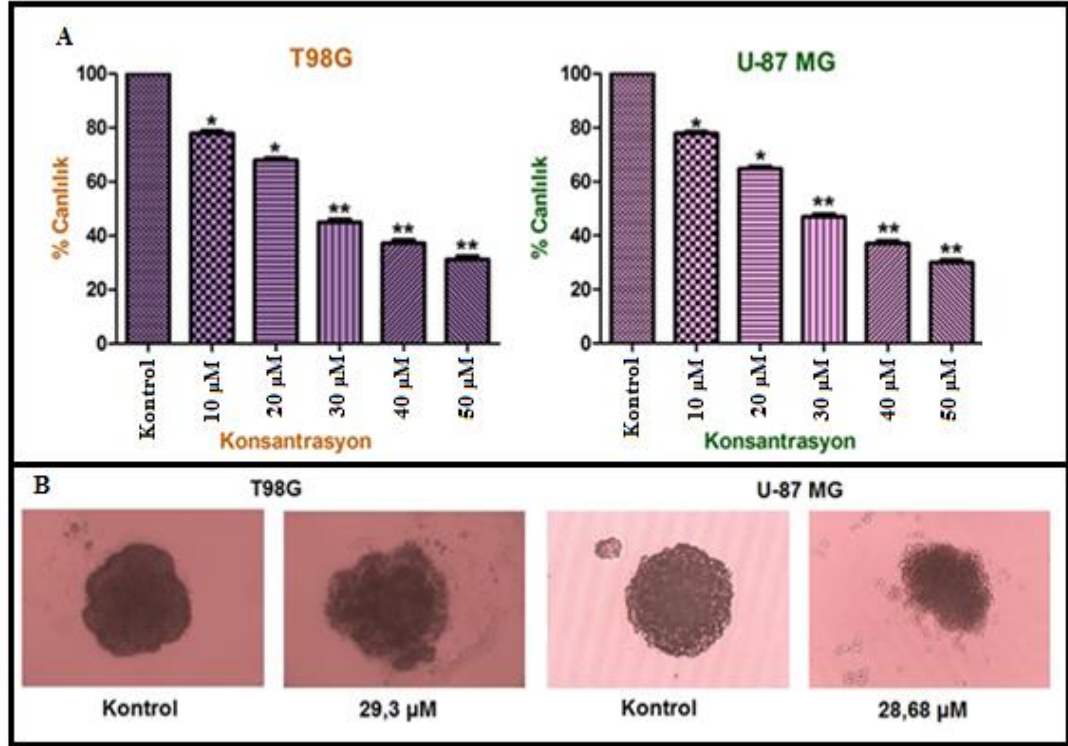
Şekil 4.4 Monolayer kültürde 24. saatte THZ’ nin artan konsantrasyonu ile muamele edilen GBM hücre hatlarının canlılık yüzdeleri (A). THZ’nin IC₅₀ değerinin faz-kontrast mikroskopunda 10x büyütmede çekilen görüntüleri (B).

4.2.2. Sferoid Hücre Kültüründe THZ’ nin Hücre Canlılığına Etkisi

Sferoid kültürde T98G ve U-87 MG hücre hatlarında THZ’ nin hücre canlılığına 24. saatteki etkisi Tablo 4.2’ de gösterilmiştir (Şekil 4.5 A). T98G ve U-87 MG hücrelerinin 24. saatteki IC₅₀ değeri 29,30 µM ve 28,68 µM olarak Graphpad Prism 5 programında hesaplandı (Şekil 4.5 B).

Tablo 4.2. Sferoid kültürde GBM hücre hatlarının yüzdesel canlılık oranları.

Konsantrasyon	Kontrol	10µM	20µM	30µM	40µM	50µM
T98G	100	78	65	48	38	30
U-87 MG	100	79	68	46	37	33



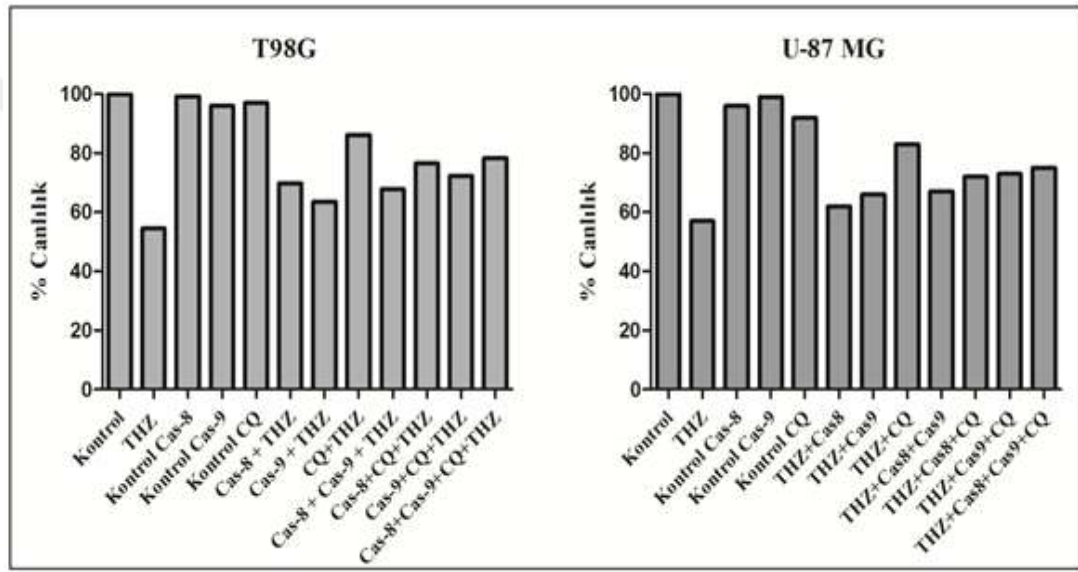
Şekil 4.5 Sferoid kültürde 24. saatte THZ' in artan konsantrasyonu ile muamele edilen GBM hücre hatları yüzde canlılık oranları (A); GBM hücre hatlarının IC₅₀ değerinin faz-kontrast mikroskopunda 10x büyütmede çekilen görüntüleri (B).

4.3. Apoptotik ve Otofajik Ölüm Çeşidine Özgü İnhibitörler Kullanılarak Hücre Canlılık Oranlarının Saptanması

4.3.1. Monolayer Hücre Kültürü Bulguları

Monolayer hücre kültüründe THZ' nin IC₅₀ konsantrasyonu ile 24 saat inkübe edilen T98G ve U-87 MG hücre hatlarında apoptoz inhibitörleri olan kaspaz-8 inhibitörü (Z-IETD-FMK) ve kaspaz-9 inhibitörü (Z-LEHD-FMK) ve otofaji

inhibitörü olan klorokindifosfat ile ilgili bulgular Şekil 4.6’ da gösterilmiştir. Diğer taraftan Tablo 4.3’ de görülebileceği üzere, Otofaji inhibitörü olan CQ varlığında THZ’ nin IC₅₀ değeri ile muamele edilen monolayer GBM hücre hatlarında hücre canlılığı %86 (T98G) ve %83 (U-87 MG) olarak hesaplandı. Ancak apoptoz inhibitörlerinde elde edilen canlılıklar %70 (T98G Cas-8) , %64 (T98G Cas-9) ve %62 (U-87 MG Cas-8), %66 (U-87 MG Cas-9) olarak belirlendi. Elde edilen veriler, CQ inhibitörü varlığında THZ’ nin sitotoksik etkisinin görülmediğini, Cas-8 ve Cas-9 inhibitörleri varlığında ise THZ’ nin hücre canlılığını düşürdüğünü göstermektedir.



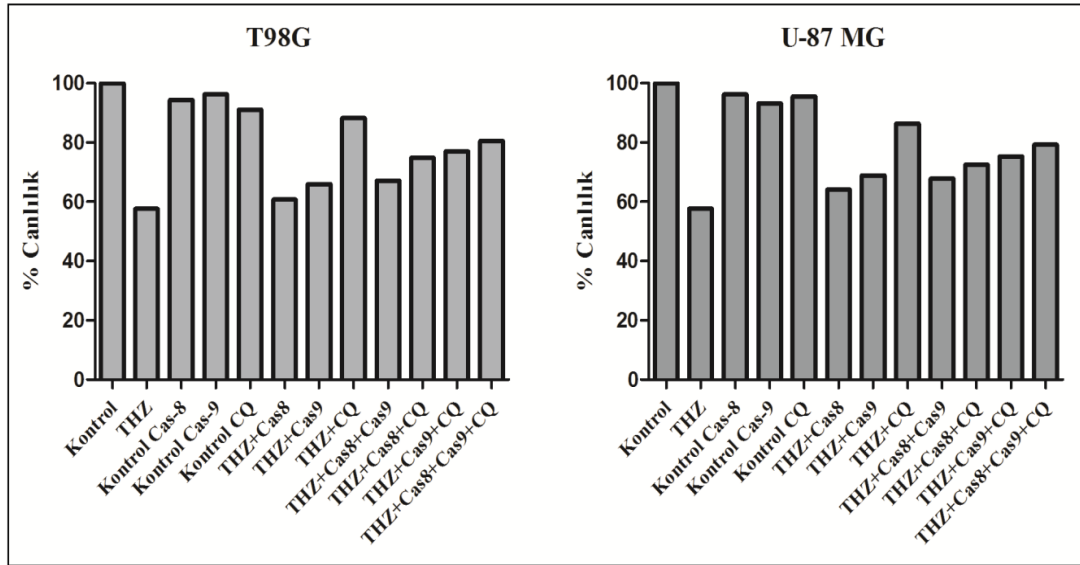
Şekil 4.6 Monolayer GBM hücre hatlarında apoptoz ve otofaji inhibitörlerinin canlılık oranları.

Tablo 4.3 Monolayer GBM hücre hatlarında apoptoza ve otofajiye özgü inhibitörlerin MTT yöntemiyle belirlenen oransal canlılıkları.

% Canlılık	Kontrol	THZ (IC ₅₀)	Kontrol Cas-8	Kontrol Cas-9	Kontrol CQ	THZ + Cas-8	THZ + Cas-9	THZ + CQ	THZ + Cas-8 + Cas-9	THZ + Cas-8 + CQ	THZ + Cas-9 + CQ	THZ + Cas-8 + Cas-9 + CQ
T98G	100	55	99	96	97	70	64	86	68	77	72	78
U-87 MG	100	57	96	99	92	62	66	83	67	72	73	75

4.3.2. Sferoid Hücre Kültürü Bulguları

Sferoid hücre kültüründe THZ'in IC₅₀ konsantrasyonu ile 24 saat inkübe edilen T98G ve U-87 MG hücre hatlarında apoptoz inhibitörleri olan kaspaz-8 ve kaspaz-9 ve otofaji inhibitörü klorokindifosfat ile ilgili bulgular Şekil 4.7' de gösterildi. MTT yöntemi ile saptanan canlılık oranları Tablo 4.4 görülebilmektedir. Tablo değerlerimiz incelendiğinde, Otofaji inhibitörü olan CQ varlığında THZ' nin IC₅₀ değeri ile muamele edilen sferoid GBM hücre hatlarında hücre canlılığı %88 (T98G) ve %86 (U-87 MG) olarak görebilmektedir. Ancak apoptoz inhibitörlerinde elde edilen canlılıklar %61 (T98G Cas-8) , %66 (T98G Cas-9) ve %64 (U-87 MG Cas-8), %69 (U-87 MG Cas-9) olarak belirlendi. Bu veriler; CQ inhibitörü varlığında THZ' nin etkisiz kaldığını, Cas-8 ve Cas-9 inhibitörleri varlığında ise THZ' nin hücre canlılığını azalttığını göstermektedir.



Şekil 4.7 Sferoid GBM hücre hatlarında apoptoz ve otofaji inhibitörlerinin canlılık oranları.

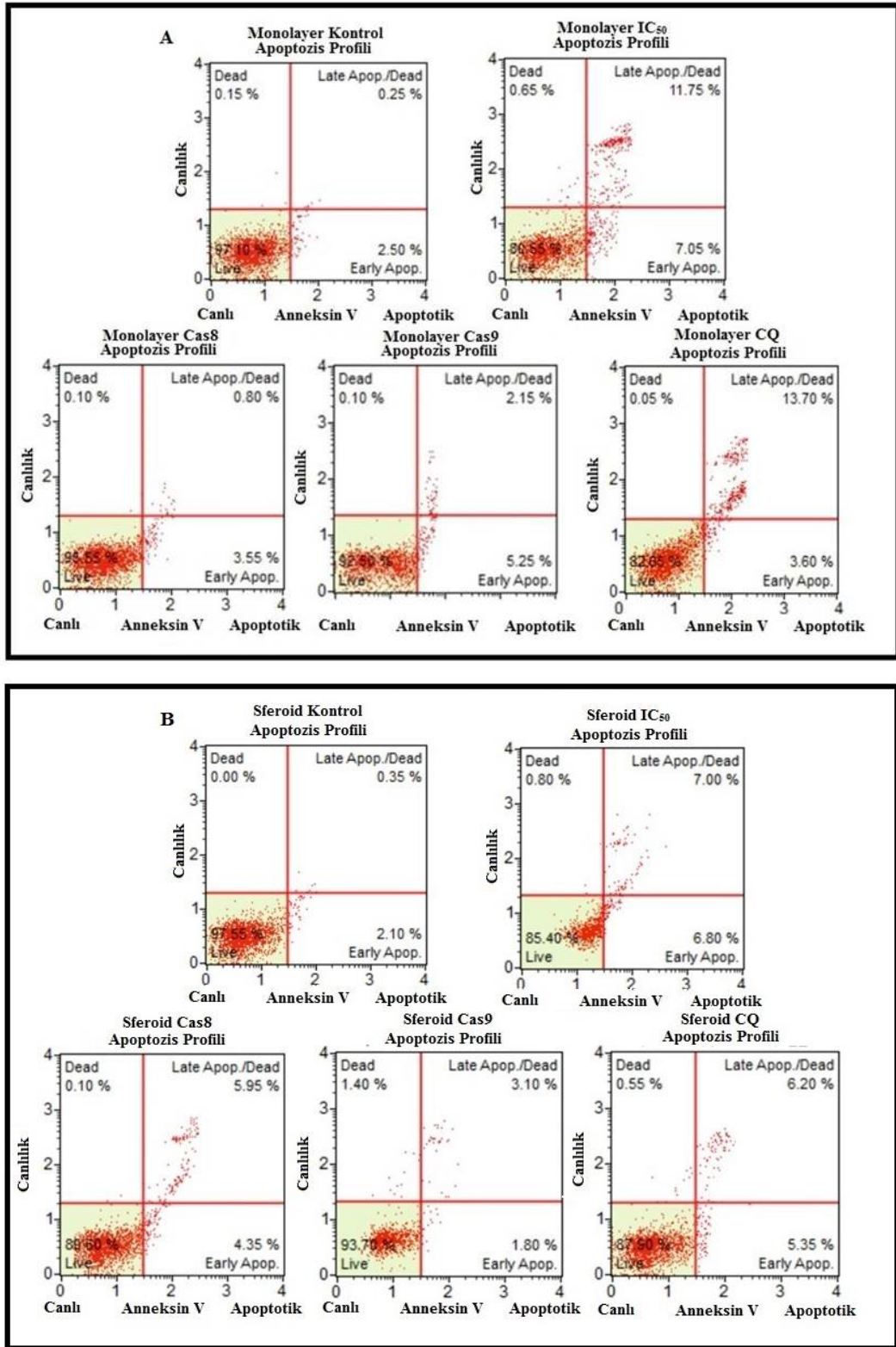
Tablo 4.4 Sferoid GBM hücre hatlarında spesifik inhibitörlerin MTT yöntemiyle belirlenen oransal yüzdelik canlılıkları.

% Canlılık	Kontrol	THZ (IC ₅₀)	Kontrol Cas-8	Kontrol Cas-9	Kontrol CQ	THZ + Cas-8	THZ + Cas-9	THZ + CQ	THZ + Cas-8 + Cas-9	THZ + Cas-8 + CQ	THZ + Cas-9 + CQ	THZ + Cas-8 + Cas-9 + CQ
T98G	100	58	94	96	91	61	66	88	67	75	77	81
U-87 MG	100	58	96	93	96	64	69	86	68	73	75	79

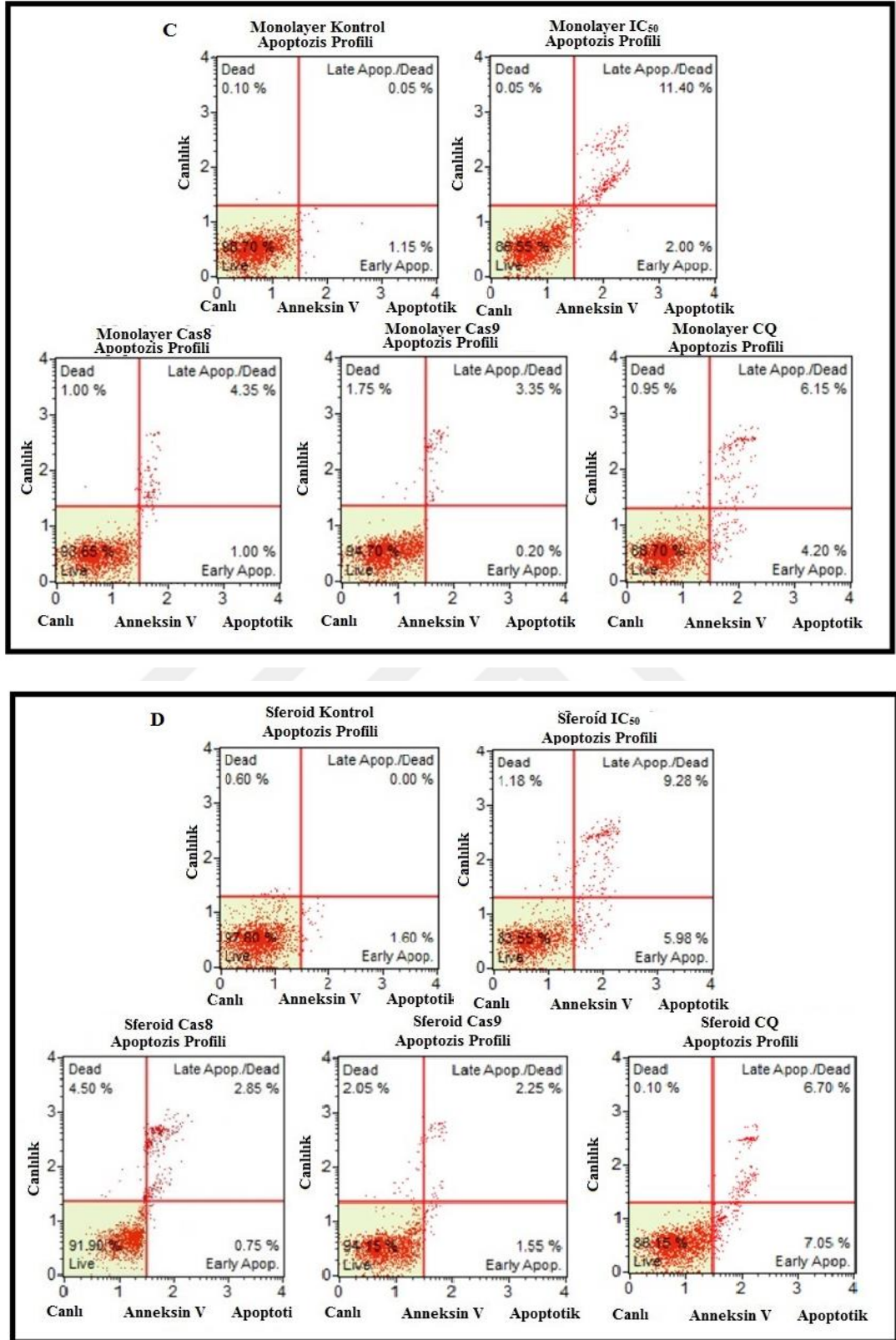
4.4. Monolayer ve Sferoid Hücre Kültürlerinde THZ' nin Tetiklediği Ölüm Mekanizması Çeşidinin Saptanması

4.4.1. Apoptoz Yönünden Değerlendirme

Muse[®] Annexin V & Dead Cell Kiti aracılığıyla THZ ile 24 saat muamele sonrası monolayer ve sferoid GBM hücre kültürlerinin analizinden elde edilen veriler T98G hücre hattı için Şekil 4.8' de U-87 MG hücre hattı için de Şekil 4.9 'de görülebilmektedir. Kontrol grubunda hücre canlılığı %90' nın üzerinde ölçüldü, THZ ile muamele edilen grubun canlılığının %80' in üzerinde olduğu tespit edildi. Apoptoz inhibitörleri varlığında canlılığın %90' lara geri yükseldiği, otofaji inhibitörü varlığında ise canlılığın tekrardan %80' lere düştüğü gözlemlendi. Bu veriler bize, THZ' nin IC₅₀ konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen hücre hatlarında sitotoksik etkinin monolayer hücrelerde %19,45 (T98G) ve %13,45 (U-87 MG), sferoid hücrelerde ise %14,6 (T98G) ve %16,45 (U-87 MG) apoptoz aracılı gerçekleştiğini ortaya koydu (Tablo 4.5).



Şekil 4.8. Monolayer ve sferoid GBM hücre kültürlerinde THZ' nin IC₅₀ konsantrasyonuyla (A: Monolayer IC₅₀: 12,67 μ M, B: Sferoid IC₅₀: 29,31 μ M) muamele edilen T98G hücrelerinin apoptotik evreleri.



Şekil 4.9 Monolayer ve Sferoid GBM hücre kültürlerinde THZ' nin IC₅₀ konsantrasyonuyla (C: Monolayer IC₅₀: 12,80 µM, D: Sferoid IC₅₀: 29,30 µM) muamele edilen U-87 MG hücrelerinin apoptotik evreleri.

Tablo 4.5. Monolayer ve sferoid kültürleri yapılan T98G ve U-87 MG hücre hatlarının THZ' nin IC₅₀ konsantrasyonlarıyla muamelesi sonrası canlı ve apoptotik yüzdelere karşılaştırılması.

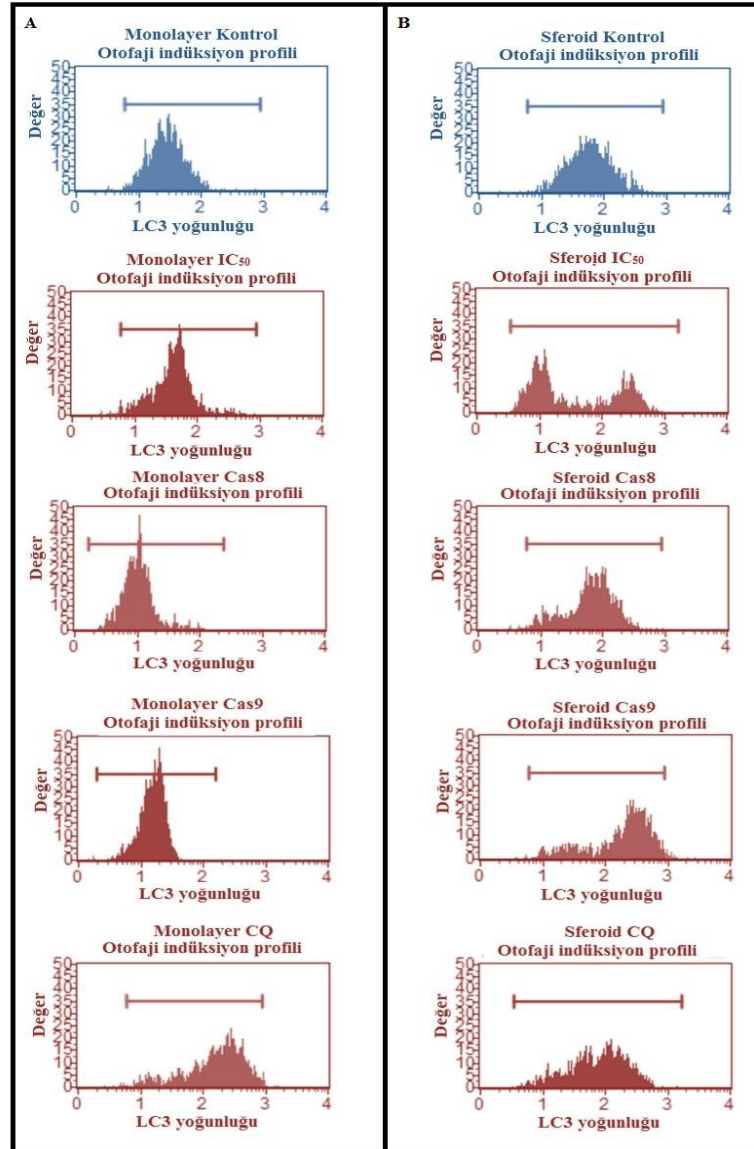
T98G	Monolayer					Sferoid				
Muse Annexin V & Dead Cell kitiyle ölçülen parametreler	Kontrol	IC ₅₀	Cas8	Cas9	CQ	Kontrol	IC ₅₀	Cas8	Cas9	CQ
% Canlılık	97,10	80,55	95,55	92,50	82,65	97,55	85,40	89,60	93,70	87,90
% Erken Apoptoz	2,50	7,05	3,55	5,25	3,60	2,10	6,80	4,35	1,80	5,35
% Geç Apoptoz	0,25	11,75	0,80	2,15	13,70	0,35	7,00	5,95	3,10	6,20
% Ölü	0,15	0,65	0,10	0,10	0,05	0,00	0,80	0,10	1,40	0,55

U-87 MG	Monolayer					Sferoid				
Muse Annexin V & Dead Cell kitiyle ölçülen parametreler	Kontrol	IC ₅₀	Cas8	Cas9	CQ	Kontrol	IC ₅₀	Cas8	Cas9	CQ
% Canlılık	98,70	86,55	93,65	94,70	88,70	97,80	83,55	91,90	94,15	86,15
% Erken Apoptoz	1,15	2,00	1,00	0,20	4,20	1,60	5,98	0,75	1,55	7,05
% Geç Apoptoz	0,05	11,40	4,35	3,35	6,15	0,00	9,28	2,85	2,25	6,70
% Ölü	0,10	0,05	1,00	1,75	0,95	0,60	1,18	4,50	2,05	0,10

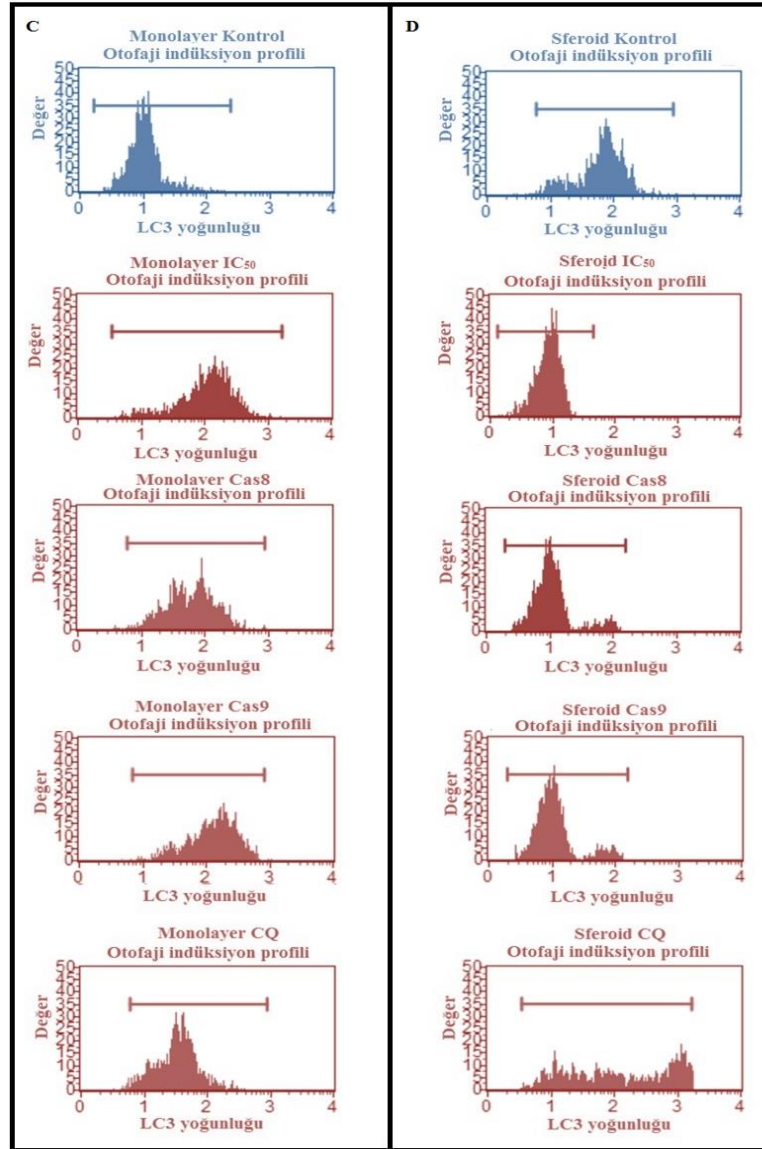
4.4.2. Otofajik Yönden Değerlendirme

Aynı biçimde Muse® Autophagy LC3 Kiti aracılığıyla THZ ile muamele sonrası monolayer ve sferoid GBM hücre kültürlerinin LC3 yoğunluğundaki değişiklikler T98G hücre hatları için Şekil 4.10' de U-87 MG hücre hatları için Şekil 4.11' de gösterilmiştir. Kontrol gruplarında otofaji indüksiyon oranı 1,0 olarak ölçüldü. THZ ile muamele edilen gruplarda otofaji indüksiyon oranının monolayer hücrelerde 6,5

(T98G) ve 5,6 (U-87 MG); sferoid hücrelerde 3,3 (T98G) ve 4,5 (U-87 MG) kat artarken apoptoz inhibitörleri varlığında monolayer hücrelerde yaklaşık olarak 4,6 (T98G) ve 3,3 (U-87 MG); sferoid hücrelerde 2,6 (T98G) ve 3,1 (U-87 MG) kat arttığı; ancak otofaji inhibitörü varlığında otofaji indüksiyon oranının monolayer hücrelerde 1,7 (T98G) ve 1,1 (U-87 MG); sferoid hücrelerde de 1,5 (T98G) ve 1,3 (U-87 MG) olduğu gözlemlendi. Bu veriler, THZ' nin IC₅₀ konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen hücre hatlarında sitotoksik etkinin ağırlıklı olarak otofaji aracılı gerçekleştiğini göstermektedir (Tablo 4.6).



Şekil 4.10. Monolayer ve sferoid GBM hücre kültürlerinde THZ' nin IC₅₀ konsantrasyonu (A: Monolayer IC₅₀: 12,67 μ M, B: Sferoid IC₅₀: 29,31 μ M) muamele edilen T98G hücrelerinin otofaji indüksiyon oranı ve ortalama otofaji yoğunluğu.



Şekil 4.11. Monolayer ve sferoid GBM hücre kültürlerinde THZ' nin IC₅₀ konsantrasyonuyla (Monolayer IC₅₀: 12,80 μ M, Sferoid IC₅₀: 29,30 μ M) muamele edilen U-87 MG hücrelerinin otofaji indüksiyon oranı ve ortalama otofaji yoğunluğu.

Tablo 4.6 THZ' nin IC₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilmiş monolayer ve sferoid kültürleri yapılan T98G ve U-87 MG hücre hatlarının otofaji indüksiyon oranının ve ortalama otofaji yoğunluğunun karşılaştırılması.

T98G	Monolayer					Sferoid				
Muse® Autophagy LC3-Antibody Based kitiyle ölçülen parametreler	Kontrol	IC ₅₀	Cas8	Cas9	CQ	Kontrol	IC ₅₀	Cas8	Cas9	CQ
Total hücre sayısı	995	975	981	983	998	977	992	986	972	995
Ortalama Otofaji yoğunluğu	35,3	232,9	141,9	165,9	59,0	80,8	270,1	218,3	215,0	86,0
Otofaji İndüksiyon Oranı	1,0	6,5	4,0	4,7	1,7	1,0	3,3	2,7	2,6	1,1

U-87 MG	Monolayer					Sferoid				
Muse® Autophagy LC3-Antibody Based kitiyle ölçülen parametreler	Kontrol	IC ₅₀	Cas8	Cas9	CQ	Kontrol	IC ₅₀	Cas8	Cas9	CQ
Total hücre sayısı	987	978	999	971	982	994	986	973	985	990
Ortalama Otofaji yoğunluğu	45,7	254,3	143,2	158,1	67,2	84,5	379,8	250,4	273,7	108,3
Otofaji İndüksiyon Oranı	1,0	5,6	3,1	3,5	1,5	1,0	4,5	3,0	3,2	1,3

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda THZ' nin GBM için model oluşturan T98G ve U-87 MG hücre hatlarındaki sitotoksik etkisinin ve tetiklediği ölüm mekanizmalarının hem monolayer hem de sferoid hücre kültüründe karşılaştırmalı olarak ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu alanda gerçekleştirilen bazı farklı araştırmalarda, monolayer ve sferoid hücre kültürlerinde yapılan sitotoksik çalışmalar sonucunda elde edilen IC_{50} değerlerinin sferoid kültürde monolayer kültüre oranla daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Ergüven ve ark. 2011; Lv ve ark. 2016). Örneğin, T98G hücre hattı ile yapılan bir çalışmada Noskapin (Nos)' in monolayer ve sferoid kültürlerindeki IC_{50} sonuçları sırasıyla 10 μM ve 97 μM olarak hesaplanmıştır (Ergüven ve ark. 2011). Aynı şekilde, U-87 MG hücrelerinde Temozolomid (TMZ), Lomustin (CCNU) ve Cisplatin (DDP)' in monolayer ve sferoid kültürde elde edilen IC_{50} değerleri sırasıyla 123,30 μM ve 702,20 μM (TMZ IC_{50}); 7,78 μM ve 326,70 μM (CCNU IC_{50}); 11,94 μM ve 34,39 μM (DDP IC_{50}) olarak belirlenmiştir (Lv ve ark. 2016). Biz de çalışmamızın ilk aşamasında THZ' nin T98G ve U-87 MG GBM hücre hatlarındaki sitotoksik etkisini monolayer ve sferoid hücre kültüründe MTT yöntemi ile karşılaştırmalı olarak belirledik. Çalışmalarımız sonucunda THZ ile muamele edilen GBM hücre hatlarında IC_{50} değerlerini monolayer kültürde 12,67 μM (T98G) ve 12,80 μM (U-87 MG); sferoid kültürde ise 29,30 μM (T98G) ve 28,68 μM (U-87 MG) olarak saptadık. Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda, sferoid hücre kültürlerindeki IC_{50} değerlerinin monolayer kültüre oranla daha yüksek olmasının daha önce yapılan çalışmaları desteklediğini düşünmekteyiz.

Literatürde THZ' nin glioblastoma hücre hatlarındaki anti-tümör etkisi ile ilgili az sayıda çalışma bulunduğu ve bu çalışmaların monolayer kültür ile sınırlı kaldığı gözlenmiştir. Örneğin, Cheng ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada GBM hücre hatlarından olan GBM8401 ve U-87 MG hücre hatları monolayer kültürde THZ ile 72 saat muamele edildiğinde IC_{50} değerlerinin 10 μM altında olduğu görülmüştür (Cheng ve ark. 2015).

Çalışmamızın ikinci aşamasında ise T98G ve U-87 MG GBM hücre hatlarında

THZ' nin sitotoksik etkisinin hangi hücre ölüm mekanizması üzerinden olduğu monolayer ve sferoid hücre kültürlerinde hem Muse hücre analiz cihazına uygun kitler hem de ikinci bir yöntem olarak mekanizmaya uygun spesifik inhibitörler kullanılarak MTT yöntemiyle araştırıldı. Çalışmamız sonucunda THZ' nin IC₅₀ değeri ile muamele edilen GBM hücre hatlarında Muse® Annexin V & Dead Cell Kiti kullanılarak belirlenen sitotoksik etkinin monolayer hücrelerde %19.45 (T98G) ve %13.45 (U-87 MG), sferoid hücrelerde ise %14.6 (T98G) ve %16.45 (U-87 MG) apoptoz aracılı gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte Muse® Autophagy LC3 Kiti aracılığıyla, monolayer kültürde THZ' nin IC₅₀ konsantrasyonu ile muamele edilen T98G hücrelerinde kontrol grubuna oranla otofaji indüksiyon oranında 6,5 katlık bir artış; U-87 MG hücre hattında ise 4,6 katlık bir artış gözlenmiştir. Sferoid hücre kültüründe ise IC₅₀ değerleri ile muamele edilen T98G ve U-87 MG hücre hatlarında otofaji indüksiyon oranındaki artış sırasıyla 2,15 ve 2,4 kat olarak hesaplanmıştır.

İnhibitörler ile yaptığımız sitotoksikite çalışmaları sonucu otofaji inhibitörü olan CQ ile muamele edildikten sonra THZ' nin IC₅₀ değeri eklenen monolayer GBM hücre hatlarında canlılık %86 (T98G) ve %83 (U-87 MG); sferoid GBM hücre hatlarında canlılık %88 (T98G) ve %86 (U-87 MG) olarak hesaplanmıştır. Apoptoz inhibitörlerinden Cas-8 ve Cas-9 varlığında ise monolayer kültürde elde edilen canlılıklar %70 (T98G Cas-8) , %64 (T98G Cas-9) ve %62 (U-87 MG Cas-8), %66 (U-87 MG Cas-9) olarak belirlenmiştir. Sferoid kültürde ise elde edilen canlılıklar %61 (T98G Cas-8) , %66 (T98G Cas-9) ve %64 (U-87 MG Cas-8), %69 (U-87 MG Cas-9) olarak tespit edilmiştir. Muse hücre analiz cihazında yapılan ölçümler sonucunda, Muse® Annexin V & Dead Cell Kitinde, apoptoz inhibitörleri varlığında monolayer kültürde elde edilen canlılıklar %95,55 (T98G Cas-8) , %92,50 (T98G Cas-9) ve %93,65 (U-87 MG Cas-8), %94,70 (U-87 MG Cas-9); sferoid kültürde %89,60 (T98G Cas-8) , %93,70 (T98G Cas-9) ve %91,90 (U-87 MG Cas-8), %94,15 (U-87 MG Cas-9) olarak belirlenirken CQ inhibitörü varlığında monolayer hücrelerde canlılık %82,65 (T98G) ve %88.70 (U-87 MG); sferoid hücrelerde canlılık %87,90 (T98G) ve %86,15 (U-87 MG) olarak belirlenmiştir. Muse® Autophagy LC3 Kitinde, apoptoz inhibitörleri varlığında otofaji indüksiyon oranının monolayer hücrelerde yaklaşık olarak 4,6 (T98G) ve 3,3 (U-87 MG); sferoid

hücrelerde 2,6 (T98G) ve 3,1 (U-87 MG) kat arttığı; otofaji inhibitörü varlığında da otofaji indüksiyon oranının monolayer hücrelerde 1,7 (T98G) ve 1,1 (U-87 MG); sferoid hücrelerde de 1,5 (T98G) ve 1,3 (U-87 MG) kat arttığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak otofaji yolağının inhibitör kullanılarak durdurulması sonucunda THZ' nin sitotoksik etkisinin azaldığı gözlenmiştir. Bu bilgiler ışığında THZ' nin GBM hücre hatlarındaki sitotoksik etkisini otofaji yoluyla gösterdiği kanısına varılmıştır. Farklı araştırma grupları tarafından kanser hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarda THZ' nin farklı kanser tiplerinde farklı ölüm mekanizmalarını tetiklediği gösterilmiştir. Örneğin, fare meme kanseri modeli 4T1' de THZ' nin 20 µM konsantrasyonuyla zamana bağlı (24, 48 ve 72 saat) muamelesi sonucu apoptozis artışı Annexin V yöntemi ile akım sitometrisinde gösterilmiştir (Yin ve ark. 2015). Ayrıca endometrial kanser hücrelerinin 10 µM THZ ile 24 saat muamele edilmesi sonucu apoptoz miktarındaki artış yine akım sitometrisi ile belirlenmiştir (Meng ve ark. 2016). Bunların aksine yapılan bir başka çalışmada, osteosarkom hücre hattının (U-2 OS) 14 µM THZ ile muamele edilmesi sonucu LC3-II miktarında artış gözlenmiş ve ölüm mekanizmasının otofaji olduğu belirlenmiştir (Ashoor ve ark. 2013). Yapılan bir başka çalışmada ise GBM hücre hatlarında THZ' nin sitotoksik etkisi sonucu LC3-II miktarında artış olduğu ancak kaspaz-3 miktarında bir değişiklik gözlenmediği belirtilmiştir (Cheng ve ark. 2015).

Otofaji ile kanser arasında karmaşık bir ilişki olduğu bilinmektedir. Günümüze kadar yapılan araştırmalardan elde edilen verilerin ışığında otofajinin kanserde etkisiz kaldığı, tümör oluşumunu desteklediği veya tümör baskılayıcı olarak rol oynadığı gösterilmiştir (Sung ve ark. 2016). Bu rollerin farklılaşmasındaki temel noktalar kanserin doku tipi, tümörün evresi ve sahip olunan onkojenik mutasyon olduğu düşünülmektedir (Liu ve ark. 2017). Apoptoz, kemoterapi ajanlarının uyardığı hücre ölüm tiplerinin birincil formu olmasına rağmen otofajik hücre ölümü de anti-kanser ilaçlarıyla indüklenebilen alternatif bir ölüm mekanizması olarak öne sürülmektedir (Ding ve ark. 2015). GBM tedavisinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapi nedeniyle büyüme faktörü reseptörleri ve Ras' ın uyarımının artması PI3K-Akt-mTOR yolağının aktivitesinin artması sonucu tedavinin etkisi azalmaktadır. GBM' de sıkça rastlanan PTEN mutasyonunun da PI3K-Akt-mTOR yolağını inhibe ederek

kontROLSÜZ hücre bölünmesine ve böylelikle apoptozun inaktif halde kalmasına neden olduğu tespit edilmiş ve bu şekilde tedavide apoptoza karşı bir direnç olduğu öne sürülmüştür (Sharma ve ark. 2014; Sharma ve ark. 2014). Farklı kanser tiplerinde yapılmış anti-kanser çalışmalarında ise THZ' nin sitotoksik etkisini PI3K-Akt-mTOR yolağını inhibe ederek farklı ölüm mekanizmalarını aktifleştirdiği tespit edilmiştir (Li ve ark. 2016; Park ve ark. 2014; Min ve ark. 2015). Anti-kanser ajanlar veya otofajiyi indükleyen bileşikler kullanıldığında ise bazı kanser tipleri için tedaviyi destekleyici etki yarattığını düşündüren çalışmalar mevcuttur. mTOR inhibitörleri ve bu yolda kullanılan ajanların otofajiyi uyardığı, kemoterapi ve radyoterapi ile kombinlendiğinde anti-kanser etkisini desteklediği gösterilmiştir (Karakas ve Gozuacik 2014).

Sonuç olarak, monolayer ve sferoid hücre kültürleri arasındaki farklılığı bir kez daha bu araştırma ile ortaya koyarken, THZ' nin GBM hücre hatlarında otofaji yoluyla sitotoksositeye neden olduğunu da saptamış olduk. Yaptığımız bu araştırma bir kez daha gösterdi ki; sitotoksosite çalışmalarında *in vivo* ortam uyumu dikkate alınarak, hem monolayer hem de sferoid kültürlerde yapılması gerekliliği yanısıra THZ'nin GBM kanser tedavisini destekleyici bir anti kanser ajanı olarak da rol oynayabileceği ileri sürülebilir.

6. KAYNAKLAR

Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK, Bigner DD. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs*. 2009;18(8):1061-83.

Aijian AP, Garrell RL. Digital microfluidics for automated hanging drop cell spheroid culture. *J Lab Autom*. 2015;20(3):283-95.

Alifieris C, Trafalis DT. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther*. 2015;152:63-82.

Allen NJ, Barres BA. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*. 2009;457(7230):675-7.

Ameisen JC. The Origin and Evolution of Programmed Cell Death, *Cell Death* 2009 13-20.

Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(3):5517-27.

Antonopoulos C, Russo HM, El Sanadi C, Martin BN, Li X, Kaiser WJ, Mocarski ES, Dubyak GR. Caspase-8 as an Effector and Regulator of NLRP3 Inflammasome Signaling. *J Biol Chem*. 2015;14;290(33):20167-84.

Ashkenazi A. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(12):1001-12.

Ashoor R, Yafawi R, Jessen B, Lu S. The contribution of lysosomotropism to autophagy perturbation. *PLoS One*. 2013;22;8(11):e82481.

Bauman G, Lote K, Larson D, Stalpers L, Leighton C, Fisher B, Wara W, MacDonald D, Stitt L, Cairncross JG. Pretreatment factors predict overall survival for patients with low-grade glioma: a recursive partitioning analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999 ;45(4):923-9.

Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol.* 1995;6(1):3-16.

Binder DC, Davis AA, Wainwright DA. Immunotherapy for cancer in the central nervous system: Current and future directions. *Oncoimmunology.* 2015; 11;5(2):e1082027.

Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today.* 2013;18(5-6):240-9

Byun HJ, Lee JH, Kim BR, Kang S, Dong SM, Park MS, Lee SH, Park SH, Rho SB. Anti-angiogenic effects of thioridazine involving the FAK-mTOR pathway. *Microvasc Res.* 2012;84(3):227-34.

Chen HM, Luo H, Zeng WB, Liu B, Huang JC, Liu M, Zeng YJ, Zheng Q, Li JQ, Sun XG, Zhou YC. Salvianolic acid B attenuates oxidized low-density lipoprotein-induced endothelial cell apoptosis through inhibition of oxidative stress, p53, and caspase-3 pathways. *Chin J Integr Med.* 2017;24.

Cheng HW, Liang YH, Kuo YL, Chuu CP, Lin CY, Lee MH, Wu AT, Yeh CT, Chen EI, Whang-Peng J, Su CL, Huang CY. Identification of thioridazine, an antipsychotic drug, as an antiglioblastoma and anticancer stem cell agent using public gene expression data. *Cell Death Dis.* 2015;7;6:e1753.

Chien W, Sun QY, Lee KL, Ding LW, Wuensche P, Torres-Fernandez LA², Tan SZ², Tokatly I³, Zaiden N², Poellinger L², Mori S², Yang H², Tyner JW⁴, Koeffler HP⁵. Activation of protein phosphatase 2A tumor suppressor as potential treatment of pancreatic cancer. *Mol Oncol.* 2015;9(4):889-905.

Cohignac V, Landry MJ, Boczkowski J, Lanone S. Autophagy as a possible underlying mechanism of nanomaterial toxicity. *Nanomaterials* 2014;4(3), 548-582.

Collins VP, Jones DT, Giannini C. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015;129(6):775-88.

Constantinou C, Papas KA, Constantinou AI. Caspase-independent pathways of programmed cell death: the unraveling of new targets of cancer therapy? *Curr Cancer Drug Targets*. 2009;9(6):717-28.

Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2011; 20: 145.

Csonka Á, Spengler G, Martins A, Ocsóvszki I, Christensen JB, Hendricks O, Kristiansen JE, Amaral L, Molnar J. Effect of thioridazine stereoisomers on the drug accumulation of mouse lymphoma and human prostate cancer cell lines in vitro. *In Vivo*. 2013;27(6):815-20.

Daniel WA, Syrek M, Mach A, Wójcikowski J, Boksa J. Pharmacokinetics of thioridazine and its metabolites in blood plasma and the brain of rats after acute and chronic treatment. *Pol J Pharmacol*. 1997 Nov-Dec;49(6):439-52.

Daniel WA, Wójcikowski J. The role of lysosomes in the cellular distribution of thioridazine and potential drug interactions. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999;158(2):115-24.

Daniel WA. Mechanisms of cellular distribution of psychotropic drugs. Significance for drug action and interactions. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003;27(1):65-73.

Ding Q, Bao J, Zhao W, Hu Y, Lu J, Chen X. Natural autophagy regulators in cancer therapy: a review. *Phytochemistry Reviews*. 2015, Volume 14, Issue 1, pp 137–154

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.

Ergüven M, Bilir A, Yazihan N, Ermis E, Sabancı A, Aktas E, Aras Y, Alpman V. Decreased therapeutic effects of nescapine combined with imatinib mesylate on human glioblastoma in vitro and the effect of midkine. *Cancer Cell Int*. 2011;8;11(1):18.

Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*. 2012;4(5):330-49.

Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol.* 2013; 31(2):108-15.

Ferguson SD. Malignant gliomas: diagnosis and treatment. *Dis Mon.* 2011;57(10):558-69.

Fleming A, Noda T, Yoshimori T, Rubinsztein DC. Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. *Nat Chem Biol.* 2011;7(1):9-17.

Frederick L, Nolan C, Scott C, Slade E, Cell biology and cancer: molecular to global perspectives. *Rediscovering Biology.* 2003; s: 1-17.

Fukushima S, Kato S, Maeda M, Shigemori M. Caspase-9 pathway activation by inhibiting endogenous fibroblast growth factor signaling in human glioma cells. *Int J Oncol.* 2008;32(2):467-73.

Gaforio JJ, Serrano MJ, Algarra I, Ortega E, Alvarez de Cienfuegos G. Phagocytosis of apoptotic cells assessed by flow cytometry using 7-Aminoactinomycin D. *Cytometry.* 2002;1;49(1):8-11.

Gallagher LE, Williamson LE, Chan EY. Advances in Autophagy Regulatory Mechanisms. *Cells.* 2016;13;5(2).

Gil-Ad I, Shtaiif B, Levkovitz Y, Dayag M, Zeldich E, Weizman A. Characterization of phenothiazine-induced apoptosis in neuroblastoma and glioma cell lines: clinical relevance and possible application for brain-derived tumors. *J Mol Neurosci.* 2004;22(3):189-98.

Gil-Ad I, Shtaiif B, Levkovitz Y, Nordenberg J, Taler M, Korov I, Weizman A. Phenothiazines induce apoptosis in a B16 mouse melanoma cell line and attenuate in vivo melanoma tumor growth. *Oncol Rep.* 2006;15(1):107-12.

Glass-Marmor L, Morgenstern H, Beitner R. Calmodulin antagonists decrease glucose 1,6-bisphosphate, fructose 1,6-bisphosphate, ATP and viability of melanoma cells. *Eur J Pharmacol.* 1996;17;313(3):265-71.

Gomes RN, Colquhoun A. E series prostaglandins alter the proliferative, apoptotic and migratory properties of T98G human glioma cells in vitro. *Lipids Health Dis.* 2012;11;11:171.

Grimm SA, Chamberlain MC. Anaplastic astrocytoma. *CNS Oncol.* 2016;5(3):145-57.

Günter J, Wolint P, Bopp A, Steiger J, Cambria E, Hoerstrup SP, Emmert MY. Microtissues in cardiovascular medicine: regenerative potential based on a 3d microenvironment. *Stem Cells Int.* 2016;2016:9098523.

Hammill AK, Uhr JW, Scheuermann RH. Annexin V staining due to loss of membrane asymmetry can be reversible and precede commitment to apoptotic death. *Exp Cell Res.* 1999;25;251(1):16-21.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74

Hayden EC. Genomics boosts brain-cancer work. *Nature.* 2010;21;463(7279):278.

He YC, Zhou FL, Shen Y, Liao DF, Cao D. Apoptotic death of cancer stem cells for cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2014;12;15(5):8335-51.

Hsiao AY, Tung YC, Qu X, Patel LR, Pienta KJ, Takayama S. 384 hanging drop arrays give excellent Z-factors and allow versatile formation of co-culture spheroids. *Biotechnol Bioeng.* 2012;109(5):1293-304.

Hu R, Zhai Q, Liu W, Liu X. An insight into the mechanism of cytotoxicity of ricin to hepatoma cell: roles of Bcl-2 family proteins, caspases, Ca(2+)-dependent proteases and protein kinase C. *J Cell Biochem.* 2001;81(4):583-93.

Huse JT, Holland EC. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nature Reviews Cancer.* 2010; 10, 319-331.

Kang MH, Kim IH, Nam TJ. Phloroglucinol induces apoptosis via apoptotic signaling pathways in HT-29 colon cancer cells. *Oncol Rep.* 2014;32(4):1341-6.

- Kang S, Dong SM, Kim BR, Park MS, Trink B, Byun HJ, Rho SB. Thioridazine induces apoptosis by targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in cervical and endometrial cancer cells. *Apoptosis*. 2012;17(9):989-97.
- Kanu OO, Hughes B, Di C, Lin N, Fu J, Bigner DD, Yan H, Adamson C. Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin Med Oncol*. 2009;8;3:39-52.
- Karakas HE, Gozuacik D. Autophagy and cancer. *Turkish Journal of Biology* 2014;38(6):720-739.
- Katt ME, Placone AL, Wong AD, Xu ZS, Searson PC. In vitro tumor models: advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. *Front Bioeng Biotechnol*. 2016;12;4:12.
- Kau TR, Schroeder F, Ramaswamy S, et al. A chemical genetic screen identifies inhibitors of regulated nuclear export of a Forkhead transcription factor in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer Cell*. 2003;4(6):463-76.
- Kaza N, Kohli L, Roth KA. Autophagy in brain tumors: a new target for therapeutic intervention. *Brain Pathol*. 2012;22(1):89-98.
- Keely P, Nain A. Capturing relevant extracellular matrices for investigating cell migration. *F1000Res*. 2015; 7;4. pii: F1000 Faculty Rev-1408. 2015
- Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng*. 2003;20;83(2):173-80.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57.
- Kiang JG, Garrison BR, Gorbunov NV. Radiation Combined Injury: DNA Damage, Apoptosis, and Autophagy. *Adaptive Medicine*. 2010;2(1): 1-10.

Kopec W, Khandelia H. Reinforcing the membrane-mediated mechanism of action of the anti-tuberculosis candidate drug thioridazine with molecular simulations. *J Comput Aided Mol Des.* 2014;28(2):123-34.

Laks DR, Crisman TJ, Shih MY, Mottahedeh J, Gao F, Sperry J, Garrett MC, Yong WH, Cloughesy TF, Liao LM, Lai A, Coppola G, Kornblum HI. Large-scale assessment of the gliomasphere model system. *Neuro Oncol.* 2016;18(10):1367-78.

Lee CH, Jung KW, Yoo H, Park S, Lee SH. Epidemiology of Primary Brain and Central Nervous System Tumors in KoreaJ Korean Neurosurg Soc. 2010; 48(2): 145–152.

Li H, Juan L, Xia L, Wang Y, Bao Y, Sun G. Thioridazine Sensitizes Esophageal Carcinoma Cell Lines to Radiotherapy-Induced Apoptosis In Vitro and In Vivo. *Med Sci Monit.* 2016;25;22:2624-34.

Liang X, Tang J, Liang Y, Jin R, Cai X. Suppression of autophagy by chloroquine sensitizes 5-fluorouracil-mediated cell death in gallbladder carcinoma cells. *Cell Biosci.* 2014;3;4(1):10.

Lieberman MA, Marks AD. Marks' Basic Medical Biochemistry. 3. Bölüm: Gene expression and the synthesis of proteins, 18. Kısım The Molecular Biology of Cancer. 4. baskı, Wolter Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, ABD, 2013. s: 317-335.

Lincz LF. Deciphering the apoptotic pathway: all roads lead to death. *Immunol Cell Biol.* 1998;76(1):1-19.

Liu T, Liu X, Li W. Tetrandrine, a Chinese plant-derived alkaloid, is a potential candidate for cancer chemotherapy. *Oncotarget.* 2016;28;7(26):40800-40815.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016; 131(6):803-20.

Lu J, Ashwell KW, Waite P. Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2000;15;25(14):1859-66.

Lu M, Li J, Luo Z, Zhang S, Xue S, Wang K, Shi Y, Zhang C, Chen H, Li Z. Roles of dopamine receptors and their antagonist thioridazine in hepatoma metastasis. *Onco Targets Ther*. 2015;22;8:1543-52.

Lv D, Yu SC, Ping YF, Wu H, Zhao X, Zhang H, Cui Y, Chen B, Zhang X, Dai J, Bian XW, Yao XH. A three-dimensional collagen scaffold cell culture system for screening anti-glioma therapeutics. *Oncotarget*. 2016;30;7(35):56904-56914.

Macdonald F, Ford CHJ, Casson AG. *Molecular Biology of Cancer*. 2. baskı, Garland Science/BIOS Scientific Publishers, New York, ABD, 2004, s: 1-6.

Manome Y, Mizuno S, Akiyama N, Fujioka K, Saito H, Hataba Y, Kobayashi T, Watanabe M. Three-dimensional cell culture of glioma and morphological comparison of four different human cell lines. *Anticancer Research*. 2010; 30: 383-390.

Mao M, Yu T, Hu J, Hu L. Dopamine D2 receptor blocker thioridazine induces cell death in human uterine cervical carcinoma cell line SiHa. *J Obstet Gynaecol Res*. 2015;41(8):1240-5.

Martinez JD, Parker MT, Fultz KE, Ignatenko NA, Gerner EW. *Burger's medicinal chemistry and drug discovery*. 1. Bölüm; Molecular biology of cancer. 6. baskı, John Wiley & Sons, Inc. New York, ABD, 2003, s: 2-5.

Martinez MM, Reif RD, Pappas D. Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Anal Methods*, 2010;2, 996-1004.

Marzban H, Del Bigio MR, Alizadeh J, Ghavami S, Zachariah RM, Rastegar M3. Cellular commitment in the developing cerebellum. *Front Cell Neurosci*. 2015;12;8:450.

Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(12):961-7.

Meng Q, Sun X, Wang J, Wang Y, Wang L. The important application of thioridazine in the endometrial cancer. *Am J Transl Res*. 2016;15;8(6):2767-75.

Millet LJ, Gillette MU. Over a century of neuron culture: from the hanging drop to microfluidic devices. *Yale J Biol Med*. 2012; 85(4):501-21

Min KJ, Seo BR, Bae YC, Yoo YH, Kwon TK1. Antipsychotic agent thioridazine sensitizes renal carcinoma Caki cells to TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated inhibition of Akt signaling and downregulation of Mcl-1 and c-FLIP(L). *Cell Death Dis*. 2014;20;5:e1063.

Mu J, Xu H, Yang Y, Huang W, Xiao J, Li M, Tan Z, Ding Q, Zhang L, Lu J, Wu X, Liu Y. Thioridazine, an antipsychotic drug, elicits potent antitumor effects in gastric cancer. *Oncol Rep*. 2014;31(5):2107-14.

Otręba M, Beberok A, Wrześniok D, Rok J, Buszman E. Effect of thioridazine on antioxidant status of HEMn-DP melanocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2015;388(10):1097-104.

Pantazaki AA, Lialiaris TS. A combined biochemical and cytogenetic study of thioridazine-induced damage to nucleic acids. *Mutagenesis*. 1999; 14(2):243-8.

Park MS, Dong SM, Kim BR, Seo SH, Kang S, Lee EJ, Lee SH, Rho SB1. Thioridazine inhibits angiogenesis and tumor growth by targeting the VEGFR-2/PI3K/mTOR pathway in ovarian cancer xenografts. *Oncotarget*. 2014;15;5(13):4929-34.

Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;25;94(24):12736-7.

Rho SB, Kim BR, Kang S. A gene signature-based approach identifies thioridazine as an inhibitor of phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K)/AKT pathway in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol*. 2011;120(1):121-7.

Ronald S, Awate S, Rath A, Carroll J, Galiano F, Dwyer D, Kleiner-Hancock H, Mathis JM, Vigod S, De Benedetti A. Phenothiazine Inhibitors of TLKs Affect

Double-Strand Break Repair and DNA Damage Response Recovery and Potentiate Tumor Killing with Radiomimetic Therapy. *Genes Cancer*. 2013;4(1-2):39-53.

Sarkar C, Jain A, Suri V. Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian J Cancer*. 2009;46(2):108-19.

Schiff D. Low-grade gliomas. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2015;21(2 Neuro-oncology):345-54.

Schmal O, Seifert J, Schäffer TE, Walter CB3, Aicher WK, Klein G. Hematopoietic stem and progenitor cell expansion in contact with mesenchymal stromal cells in a hanging drop model uncovers disadvantages of 3D culture. *Stem Cells Int*. 2016;2016:4148093.

Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev*. 1993;14(2):133-51.

Senkowski W, Zhang X, Olofsson MH, Isacson R, Höglund U, Gustafsson M, Nygren P, Linder S, Larsson R, Fryknäs M. Three-dimensional cell culture-based screening identifies the anthelmintic drug nitazoxanide as a candidate for treatment of colorectal cancer. *Mol Cancer Ther*. 2015;14(6):1504-16.

Sharma K, Goehre R, Beckta JM, Valerie K, Gewirtz DA. Autophagy and radiosensitization in cancer. *EXCLI J*. 2014; 25;13:178-91.

Sharma K, Le N, Alotaibi M, Gewirtz DA. Cytotoxic autophagy in cancer therapy. *Int J Mol Sci*. 2014;5;15(6):10034-51.

Siegel GJ, Agranoff BW. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 32. Kısım: Blood-brain-cerebrospinal fluid barriers. 6. baskı. Lippincott Williams & Wilkins, 1999. s:671-690.

Solomon VR, Lee H. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur J Pharmacol*. 2009;25;625(1-3):220-33.

Spengler G, Molnar J, Viveiros M, Amaral L. Thioridazine induces apoptosis of multidrug-resistant mouse lymphoma cells transfected with the human ABCB1 and inhibits the expression of P-glycoprotein. *Anticancer Res.* 2011;31(12):4201-5.

Strobl JS, Kirkwood KL, Lantz TK, Lewine MA, Peterson VA, Worley JF 3rd. Inhibition of human breast cancer cell proliferation in tissue culture by the neuroleptic agents pimozide and thioridazine. *Cancer Res.* 1990;50(17):5399-405.

Sudo M, Mori S, Madan V, Yang H, Leong G, Koeffler HP. Short-hairpin RNA library: identification of therapeutic partners for gefitinib-resistant non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2015;20;6(2):814-24.

Sung B, Chung HY, Kim ND. Role of Apigenin in Cancer Prevention via the Induction of Apoptosis and Autophagy. *J Cancer Prev.* 2016;21(4):216-226

Sung KE, Beebe DJ. Microfluidic 3D models of cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014; 79-80:68-78.

Thoma CR, Stroebel S, Rösch N, Calpe B, Krek W, Kelm JM. A high-throughput-compatible 3D microtissue co-culture system for phenotypic RNAi screening applications. *J Biomol Screen.* 2013; 18(10):1330-7.

Thoma CR, Zimmermann M, Agarkova I, Kelm JM, Krek W. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;69-70:29-41.

Tian Y, Bustos V, Flajolet M, Greengard P. A small-molecule enhancer of autophagy decreases levels of Abeta and APP-CTF via Atg5-dependent autophagy pathway. *FASEB J.* 2011;25(6):1934-42.

Tuynder M, Fiucci G, Prieur S, Lespagnol A, Géant A, Beaucourt S, Duflaut D, Besse S, Susini L, Cavarelli J, Moras D, Amson R, Telerman A. Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(43): 15364–15369.

van Tellingen O, Yetkin-Arik B, de Gooijer MC, Wesseling P, Wurdinger T, de Vries HE. Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. *Drug Resist Updat*. 2015;19:1-12.

Verkhratsky A, Butt A. *Glial neurobiology*. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, England 2007. s:3-12

Yin T, He S, Shen G, Ye T, Guo F, Wang Y. Dopamine receptor antagonist thioridazine inhibits tumor growth in a murine breast cancer model. *Mol Med Rep*. 2015;12(3):4103-8.

Young N, Pearl DK, Van Brocklyn JR. Sphingosine-1-phosphate regulates glioblastoma cell invasiveness through the urokinase plasminogen activator system and CCN1/Cyr61. *Mol Cancer Res*. 2009 Jan;7(1):23-32

Yu D, Liu B, Jing T, Sun D, Price JE, Singletary SE, Ibrahim N, Hortobagyi GN, Hung MC. Overexpression of both p185c-erbB2 and p170mdr-1 renders breast cancer cells highly resistant to taxol. *Oncogene*. 1998;23;16(16):2087-94.

Zembruski NC, Stache V, Haefeli WE, Weiss J. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Anal Biochem*. 2012;1;429(1):79-81.

Zhelev Z, Ohba H, Bakalova R, Hadjimitova V, Ishikawa M, Shinohara Y, Baba Y. Phenothiazines suppress proliferation and induce apoptosis in cultured leukemic cells without any influence on the viability of normal lymphocytes. Phenothiazines and leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2004;53(3):267-75.

7. EKLER

EK 1



MANİSA
CELALBAYAR
ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÖNETİM KURULU KARAR ÖRNEĞİ

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
03.09.2015	21	20

Karar 6- Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı öğrencisi Ezgi Ersöz'ün "**Gliomasferlerde Tiyoridazin Aracılı Hücre Ölüm Çeşitlerinin Araştırılması**" başlıklı tez konusunun Etik Kurul Onayı alınması kaydı ile kabulüne **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi

(İmza)
Prof. Dr. Ayşe AKTAŞ
Enstitü Müdürü

(İmza)
Yrd. Doç. Dr. Süheyla
RAHMAN
Müdür Yardımcısı

(İmza)
Yrd. Doç. Dr. Şebnem
ŞENOL
Müdür Yardımcısı
(İzinli)

(İmza)
Prof. Dr. Necip KUTLU
Üye

(İmza)
Doç. Dr. Sezgi Çınar
PAKYÜZ
Üye

(İmza)
Doç. Dr. Mehmet GÖRAL
Üye

Özcan GERÇEKER
Enstitü Sekreteri
Raportör

Ash Gibidir
29.06.2015



Aynur PALAMUTÇUOĞLU
Fakülte Sekreteri



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÖNETİM KURULU KARAR ÖRNEĞİ

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
09.10.2015	24	25

Karar 13- Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı Yüksek Lisans öğrencisi Ezgi ERSÖZ'ün Tezi ile ilgili, Etik Kurul Onayına gerek olmadığı anlaşıldığından, tez'in hiçbir aşamasında insan üzerinde çalışma yapılmayacağından ve çalışma boyunca bütün veriler, laboratuvar ortamında çoğaltılan hücrelerden elde edileceğinden etik kurul şartının kaldırılmasına, **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi.

(İmza) Prof. Dr. Ayşe AKTAŞ Enstitü Müdürü		
(İmza) Yrd. Doç. Dr. Süheyla RAHMAN Müdür Yardımcısı	(İmza) Yrd. Doç. Dr. Şebnem ŞENOL Müdür Yardımcısı	(İmza) Prof. Dr. Necip KUTLU Üye
(İmza) Doç. Dr. Sezgi Çınar PAKYUZ Üye (Katılmadı)	(İmza) Doç. Dr. Mehmet GÖRAL Üye	
Özcan GERÇEKER Enstitü Sekreteri Raporör		

Aslı Gibidir
29.06.2017



Aynur PAŞAMUTÇUOĞLU
Fakülte Sekreteri

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tez Adı "Gliomasferlerde Tiyoridazin Aracılı Hücre Ölüm Çeşitlerinin Araştırılması."

Tezime ilişkin 05/05/2017 tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallık raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4'tür.

Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Tarih ve İmza
09/05/2017

Adı Soyadı :Ezgi ERSÖZ
Öğrenci No :141353004
Anabilim Dalı :Tıbbi Biyoloji
Programı :Yüksek Lisans

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR.
(Unvan, Ad Soyad, İmza)
Prof. Dr. Mehmet KORKMAZ

Açıklamalar

1-Tez Çalışması Orijinallık Raporu (TÇOR), TURNITIN İntihal Tespit Programı kullanımı için kişisel hesap alma hakkı bulunan tez danışmanları, Enstitülerde görevlendirilen personeller, Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nda görevlendirilen kütüphaneciler tarafından alınır.

2-Sayfa sayısı 400'den az olan tezler için tez savunmasından önce ve başarılı olması durumunda düzeltmelerden sonra olmak üzere 2 kez TÇOR alınır.(400 sayfadan fazla olan tezler 400 ve katları şeklinde bölünerek Turnitin veri tabanına yüklenmesi gerekmektedir. Bu gibi durumlarda benzerlik oranının hesaplanmasına ilişkin detaylı forma, kütüphane web sayfasında bulunan Turnitin kullanım kılavuzlarının altından erişilebilir.)

3-TÇOR, tezin yalnızca Kapak Sayfası, Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan kısmının tek bir dosya olarak intihal tespit programına yüklenmesi ile alınır.

Programa yükleme yapılırken Dosya Başlığı (document title) olarak tez başlığının tamamı, Yazar Adı (author's first name) olarak öğrencinin adı, Yazar Soyadı (author's last name) olarak öğrencinin soyadı bilgisi yazılır.

4- TURNITIN İntihal tespit programına yüklenen dosyanın süreçlenmesinde, ilgili programdaki filtreleme seçenekleri aşağıdaki şekilde ayarlanır: - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 5 words)

5-İsteğe bağlı ayarlar kısmından; "Ödevleri şuraya gönder?" seçeneği mutlaka DEPO YOK şeklinde işaretlenmesi gerekmektedir; aksi durumda aynı tezin ikinci kez yüklenmesi durumunda benzerlik %100 çıkacaktır ve depodan tezi silmek çok uzun süre gerektirecektir.

6- Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra, kaydedilmiş olan ekranın görüntüsünü sağ üst köşesinde yüzdelik sayı olarak belirtilen "benzerlik oranı," raporlamaya tabi tutulmuş olan dosyanın "toplam sayfa sayısı" ve raporlama işleminin yapıldığı "tarih" bilgisi, "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallık Raporu" formuna işlenir.

7- Benzerlik oranında tüm sorumluluk öğrenciye aittir.

8-Tez savunma sınavı sonrasında başarılı bulunan öğrenci, tez savunma sınavı tarihi sonrasında tezde yapılmış muhtemel değişiklikleri içeren dosya kullanılarak alınmış ikinci bir intihal raporundaki bilgiler kullanılarak hazırlanmış ve tez danışmanı tarafından onaylanarak imzalanmış ikinci bir "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallık Raporu"nu Enstitüye teslim etmekle yükümlüdür.

9-Turnitin Hakkında Bilgiler: <http://kutuphane.cbu.edu.tr/turnitin.9370.tr.html>



exposed to the electromagnetic field it is determined to change the phosphorylation and expression levels of proteins. In a study in human endothelial cell lines exposed to 900 MHz electric field for an hour it has been observed that increased expression levels of Hsp27 and P38MAPK. In P38MAPK value, our study is consistent with the literature. Our study is the first study in eye tissue. Conclusion: Electromagnetic fields can cause cellular damage in rat ocular cells.

PS-01 59

Monolayer ve gliomasfer insan glioblastoma multiforme kültürlerinde tiyoridazin'in sitotoksik etkisinin karşılaştırılması

Ersöz Ezgi¹, Özer Özge², Can Osman Burak³, Uzunoğlu Selim¹, Uslu Rüçhan⁴, Karaca Burçak⁴

¹Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, 45010 Yunusemre/Manisa

²Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji AD, Moleküler Biyoloji Programı, 45140, Muradiye/Manisa

³Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi AD, 45010 Yunusemre/Manisa

⁴Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tülay Aktaş Onkoloji Hastanesi, İç Hastalıkları AD, Medikal Onkoloji BD, 35100, Bornova/İzmir

Çalışmanın amacı, antipsikotik bir ilaç olan Tiyoridazin'in iki boyutlu (2B, tek katmanlı-monolayer) ve üç boyutlu (3B, gliomasfer) insan glioblastoma multiforme (GBM) kültürleri (U-87 MG) üzerindeki sitotoksik etkisinin karşılaştırılmasıdır. Gliomasferlerin oluşturulması için asılı damla (hanging-drop) yöntemi kullanıldı. U-87 MG hücre kültürünün monolayer ve gliomasfer formları Tiyoridazin'in artan konsantrasyonlarıyla (10 µM -50 µM) 24 saat muamele edildi. Hücre canlılığının ölçülmesinde XTT testi kullanıldı. Tiyoridazin'in IC50 değerleri CalcuSyn 2.1 yazılımında hesaplandı. Hesaplanan IC50 değerlerinin doğrulanması amacıyla hücre morfolojilerinin görüntülenmesinde faz-kontrast mikroskobu kullanıldı. Grafiklerin çizimi ve verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism 6.0 yazılımı ile yapıldı. Monolayer ve gliomasferin 24 saatlik kültürlerinde Tiyoridazin'in konsantrasyona bağlı olarak artan sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlendi. IC50 değerleri monolayer U-87 MG için 9±2 µM, gliomasfer U-87 MG için ise 22.8±4 µM olarak hesaplandı. Tiyoridazin'in IC50 değerleriyle muamele edilen monolayer hücre popülasyonunun azaldığı, gliomasfer formasyonunun ise dağıldığı gözlemlendi. Sonuç olarak, insan GBM monolayer ve gliomasfer kültürlerinde Tiyoridazin'in sitotoksik bir ajan olduğu gösterildi. U-87 MG gliomasferlerindeki hücrelerin monolayer kültüre kıyasla Tiyoridazin'e daha dirençli olduğu belirlendi.

Comparison of thioridazine's cytotoxic effect in human glioblastoma multiforme monolayer cell cultures and glioma spheres

Ersöz Ezgi¹, Özer Özge², Can Osman Burak³, Uzunoğlu Selim¹, Uslu Rüçhan⁴, Karaca Burçak⁴

¹Celal Bayar University, School of Medicine, Department of Medical Biology, 45010, Yunusemre, Manisa, Turkey

²Celal Bayar University, Institute of Natural and Applied Sciences, Department of Biology, Section of Molecular Biology, 45140, Muradiye, Manisa, Turkey

³Celal Bayar University, School of Medicine, Department of Radiation Oncology, 45010, Yunusemre, Manisa, Turkey

⁴Ege University, Faculty of Medicine, Department of Medical Oncology, Bornova / Izmir, Turkey

The aim of this study was to compare the cytotoxic effects of Thioridazine, an antipsychotic drug, in two- (2D, monolayer) and three-dimensional (3D, glioma spheres) human glioblastoma multiforme cell cultures (U-87 MG). Hanging drop method was used to form glioma spheres. Monolayer and glioma spheres (24 hours) forms of U-87 MG cell cultures were treated with the increasing concentrations (10 µM – 50 µM) of Thioridazine. The XTT assay was used to determine cell viability. The IC50 values of Thioridazine were calculated from XTT data by using CalcuSyn 2.1 software. The validation of the calculated IC50 values was assessed by phase-contrast microscopy. Statistical analysis was carried out by GraphPad 6.0 software. Thioridazine decreased cell viability in a concentration dependent manner in both 24 hour monolayer cultures and glioma spheres. IC50 values were calculated as 9±2 µM and 22.8±4 µM for monolayer U-87 MG cell culture and glioma spheres, respectively. Thioridazine decreased cell population in monolayer cell cultures, while 3D formation was disrupted in glioma spheres. In conclusion, it was found that Thioridazine was cytotoxic in 24 hour monolayer cell cultures and glioma spheres. U-87 MG glioma spheres were found to be more resistant to Thioridazine as compared to monolayer cultures.

PS-01 60

Expression study of E2F-target genes in osteosarcoma (U2OS) and glioblastoma (T98G) cell lines after knocking down ARID3A and ARID3B

Saadat Khandakar Asm¹, Arman Kaifee¹, Arslan Ahmet¹, Iseki Sachiko¹, Ohtani Kiyoshi¹, Ikeda Masa Aki¹

¹Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Gaziantep University, Gaziantep, Turkey

ÖZGEÇMİŞ

Adı	EZGİ	Soyadı	ERSÖZ
Doğum Yeri	Melikgazi	Doğum Tarihi	13.08.1990
Uyruğu	T.C	Telefon	0555 492 8035
E-mail	ezgiersoz1308@gmail.com		

Eğitim Düzeyi	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	2014-Devam etmekte
Lisans	Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (Zooloji Ağırlıklı)	2008 – 2013
Lise	Bornova Anadolu Lisesi	2004 – 2008

İş Deneyimi Görevi	Kurum	Süre	Yer
Stajyer	Ege Üniversitesi Tülay Aktaş Onkoloji Hast. Araştırma Lab.	Temmuz 2014 – Şubat 2016	Bornova, İZMİR
Stajyer	Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Zooloji AD. Laboratuvarı	Haziran-Temmuz 2012	Bornova, İZMİR

Yayınlar

Ezgi ERSÖZ, Osman Burak CAN, Selim UZUNOĞLU. Eksozomların Kanserdeki Rolü. CBU Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 2016 / Cilt 3, Sayı 1.

Ezgi ERSÖZ, Özge ÖZER, Osman Burak CAN, Selim UZUNOĞLU, Rüçhan USLU, Burçak KARACA. Monolayer ve gliomasfer insan glioblastoma multiforme kültürlerinde Tiyoridazin'in sitotoksik etkisinin karşılaştırılması. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27-30 Ekim 2015, Ölüdeniz, Fethiye.

Proje ve Projede Yaptığı Görevler

- Yüksek Lisans Bitirme Tezi. Gliomasferlerde Tiyoridazin aracılı hücre ölüm çeşitlerinin araştırılması. CBU Bilimsel araştırma projeleri koordinasyon birimi tarafından desteklenen 2015-184 numaralı proje de araştırmacı olarak yer aldım. Danışman: Prof. Dr. Mehmet KORKMAZ. Celal Bayar Üniversitesi, 2017.

- TÜBİTAK 1001 Projesi. “Bor ve Türevlerinin Bening Prostat Hiperplazisi (BPH) Üzerine Anti-Proliferatif ve Anti-Enflamatuvar Etki Mekanizmasının Araştırılması” TÜBİTAK destekli 113 S 700 No’lu Projede araştırmacı bursiyer olarak yer aldım.

- Lisans Bitirme Tezi. HIV (Human Immunodeficiency Virus) Danışman: Prof. Dr. Uğur KAYA. Ege Üniversitesi, 2013.

Analitik Temel Bilgiler

- DNA, RNA, Protein İzolasyonu,
- PCR, Jel Elektroforezi,
- Mikrotom İle Kesit Alma,
- Histokimyasal Teknikler,
- SDS-PAGE, ELISA
- Monolayer ve sferoid Hücre Kültürü Uygulama Ve Yöntemleri.

Eğitimler/Sertifikalar

- 01.12.2016 İş Sağlığı ve Güvenliği İşe Başlama Eğitimi Katılım Sertifikası.
Celal Bayar Üniversitesi
- 30.06-01.07.2016 ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi. (AKED)
Anadolu Kariyer Eğitim Danışmanlık
- 30.06-01.07.2016 ISO 14001 Çevre Yönetim Sistemi. (AKED) Anadolu
Kariyer Eğitim Danışmanlık
- 30.06-01.07.2016 ISO 9001:2015 İç Tetkikçi. (AKED) Anadolu Kariyer
Eğitim Danışmanlık
- 30.06-01.07.2016 ISO 9001:2015 Kalite Yönetim Sistemi. (AKED) Anadolu
Kariyer Eğitim Danışmanlık
- 30.06-01.07.2016 ISO 50001 Enerji Yönetim Sistemi. (AKED) Anadolu
Kariyer Eğitim Danışmanlık
- 30.06-01.07.2016 ISO 27001 Bilgi Güvenliği Yönetim Sistemi. (AKED)
Anadolu Kariyer Eğitim Danışmanlık
- 30.06-01.07.2016 ISO 10002 Müşteri Şikâyet Yönetimi. (AKED) Anadolu
Kariyer Eğitim Danışmanlık
- 30.06-01.07.2016 OHSAS 18001 İş Sağlığı ve Güvenliği. (AKED) Anadolu
Kariyer Eğitim Danışmanlık
- 30.06-01.07.2016 Entegre Yönetim Sistemi. (AKED) Anadolu Kariyer
Eğitim Danışmanlık
- 30.06-01.07.2016 İş Yeri Organizasyonu. (AKED) Anadolu Kariyer Eğitim
Danışmanlık
- 30.06-01.07.2016 Risk Yönetimi. (AKED) Anadolu Kariyer Eğitim
Danışmanlık
- 30.06-01.07.2016 Stratejik Yönetim. (AKED) Anadolu Kariyer Eğitim
Danışmanlık
- 27-30.10.2016 XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi.
- Akademik İngilizce Eğitimi. Akademik Batı Dilleri Eğitim Kurumu.
- 18.05.2015 Bilim ve Gelişim sempozyumu: batı anadolu'da bilim ve gelişim
topluluğu Dokuz Eylül Üniversitesi

- 01.04.2015 1.Onkolojide araştırma uygulamaları kursu-hazırlık. Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü
- 31.03.2015 Laboratuvar Güvenliği ve uygulamaları Eğitimi. Celal Bayar Üniversitesi
- 22-23.01.2015 Proje hazırlama ve yürütme çalıştayı. Celal Bayar Üniversitesi
- 03.12.2012 GLP- Good Laboratory Practice. TSC Management Systems Training Academy
- 02.12.2012 GMP- Good Manufacturing Practice. TSC Management Systems Training Academy
- 01.12.2012 ISO 22000: 2005. TSC Management Systems Training Academy
- 19-22.04.2012 7. Moleküler Biyoteknoloji Bahar Okulu. Karadeniz Teknik Üniversitesi
- 30.04.2009 Gençler Geleceğe Hazırlanıyor. E.Ü. İstatistik Araştırma Topluluğu

Bilgisayar Bilgisi

- Microsoft Office Programları
- Adobe Photoshop CS6
- Graphpad Prism 5
- CalcuSyn 2.0

Eğitim Sınav Sonuçları

- Lisans Bitirme Puanı: 2.50 / 4.00, 14.06.2013.
- Lise: Bitirme puanı: 76.39 / 100, 2008.

Katılınan Aktiviteler

- Resim (Bornova Belediyesi Resim Kursu'na dair “Katılım Belgesi” ve kursun sonunda açılan sergide yapmış olduğum çeşitli resimlerim sergilendi.).
- Basketball World Cup 10: İzmir’de yapılan turnuvaya çağrılarak, turnuva süresince çalışmalarda bulundum.
- Tiyatro (2005-2006 tarihleri arasında Bornova Anadolu Lisesinde görsel sanat etkinliklerine dair “Teşekkür Belgesi”).



