



**İXAZOMİB VE FUMAGİLLİN KOMBİNASYONUNUN
GLİOMA HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİK, APOPTOTİK
VE ANTİANJİOGENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Fjolla AHMETİ

Eskişehir 2024

**İXAZOMİB VE FUMAGİLLİN KOMBİNASYONUNUN GLİOMA
HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİK, APOPTOTİK VE ANTİANJİOGENİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fjolla AHMETİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ocak 2024

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Fjolla Ahmeti'nin "Ixazomib ve Fumagillin kombinasyonunun glioma hücrelerinde sitotoksik, apoptotik ve antianjiogenik etkilerinin araştırılması" başlıklı tezi 12/01/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Miriş DİKMEN	
Üye	: Prof.Dr. Zerrin CANTÜRK	
Üye	: Doç. Dr. Volkan KILIÇ	

Enstitü Müdürü

ÖZET

İXAZOMİB VE FUMAGİLLİN KOMBİNASYONUNUN GLİOMA HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİK, APOPTOTİK VE ANTİANJİOGENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Fjolla AHMETİ

Farmakoloji Ana Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ocak 2024

Danışman: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Bu çalışmada, ixazomib ve fumagillin kombinasyonunun glioma hücreleri üzerindeki sitotoksik/sinerjistik, apoptotik ve antianjiyojenik etkilerini araştırmayı amaçladık. Sitotoksik etkilerini değerlendirmek için U87MG, SHSY-5Y ve C6 glioma hücre hatları ile, HUVEC endotelial hücreleri kullanmıştır. Sitotoksik etkiler MTT yöntemi ile belirlenmiş ve CDI değerleri hesaplanmıştır. Belirli konsantrasyonların gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde U87MG glioma hücrelerinde proliferasyon ve migrasyon etkileri çalışılmıştır. Hücre akış sitometride annexin V-PI yöntemi kullanılarak glioma hücrelerinde apoptotik etkiler belirlenmiştir.

İxazomib ve fumagillinin tekli ve kombine uygulamalarında, konsantrasyon artışına bağlı olarak tüm hücre hatlarında kontrole göre sitotoksik etkiye artış bulunmuştur. CDI değerlerine göre kombine uygulamalarda özellikle HUVEC endotel hücreleri ile U87MG ve SHSY5Y glioma hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda sinerjistik etki olduğu belirlenmiştir. İxazomib ve fumagillin kombinasyonunun erken apoptotik hücre oranları U87-MG hücrelerinde 5+50 µM da; SHSY-5Y hücrelerinde de 5+100 µM da olduğu görülmüştür. İxazomib (5µM) ve Fumagillinin (50 µM) tekli ve kombin uygulaması (5+50 µM), U87-MG hücre hattında hücre proliferasyonunu zaman bağımlı inhibe etmiş ve kontrole göre bu konsantrasyonların benzer migrasyonu inhibe edici etki gösterdiği analiz edilmiştir.

Sonuç olarak, glioma glioma hücrelerinde bir proteazom inhibitörü olan ixazomib ile bir antifungal ilaç olan fumagillin'i sinerjistik/sitotoksik, apoptotik ve antianjiyojenik etkilerinin anlaşılması, glioma tedavisinde etkili terapötik yaklaşımların geliştirilmesine katkıda bulunacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Sitotoksik etkiler, Apoptotik etkiler, Antianjiyojenik etkiler, İxazomib, Fumagillin.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF CYTOTOXIC, APOPTOTIC, AND ANTIANGIOGENIC EFFECTS OF IXAZOMIB AND FUMAGILLIN COMBINATION ON GLIOMA CELLS

Fjolla AHMETI

Department of Pharmacology

Anadolu University, Institution of Graduate School, January 2024

Supervisor: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

In this study, we aimed to investigate the cytotoxic/synergistic, apoptotic and antiangiogenic effects of the combination of ixazomib and fumagillin on glioma cells. U87MG, SHSY-5Y and C6 glioma cell lines and HUVEC endothelial cells were used to evaluate their cytotoxic effects. Cytotoxic effects were determined by the MTT method and CDI values were calculated. Proliferation and migration effects of certain concentrations were studied in U87MG glioma cells in a real-time cell analysis system. Apoptotic effects were determined in glioma cells using the annexin V-PI method in cell flow cytometry.

In single and combined applications of ixazomib and fumagillin, an increase in cytotoxic effect was found in all cell lines compared to the control, depending on the increase in concentration. According to CDI values, it was determined that combined applications had a synergistic effect at high concentrations, especially on HUVEC endothelial cells and U87MG and SHSY5Y glioma cells. Early apoptotic cell rates of ixazomib and fumagillin combination were observed at 5+50 μ M in U87-MG cells; It was also observed to be present at 5+100 μ M in SHSY-5Y cells. Single and combined application (5+50 μ M) of Ixazomib (5 μ M) and Fumagillin (50 μ M) inhibited cell proliferation in a time-dependent manner in the U87-MG cell line, and it was analyzed that these concentrations showed similar migration inhibitory effects compared to the control.

In conclusion, we believe that understanding the synergistic/cytotoxic, apoptotic and antiangiogenic effects of ixazomib, a proteasome inhibitor, and fumagillin, an antifungal drug, on glioma glioma cells will contribute to the development of effective therapeutic approaches in glioma treatment.

Keywords: Cytotoxic effects, Apoptotic effects, Antiangiogenic effects, Ixazomib, Fumagillin.

TEŞEKKÜR

Danışmanım Miriş Dikmen için, araştırmamı şekillendirmede ve becerilerimi güçlendirmede rehberliğiniz ve uzmanlığınız paha biçilmezdi. Akademik gelişimime olan sarsılmaz bağlılığınız, beni yeni zirvelere taşıdı ve sürekli bir ilham kaynağı oldu. İçgörülü geri bildiriminiz, sabırlı rehberliğiniz ve yeteneklerime olan inancınız beni ileriye götürdü. Mentorluğunuz ve bunun akademik ve kişisel gelişimim üzerindeki etkisi için gerçekten minnettarım.

Aileme, tüm bu yolculuk boyunca desteğiniz ve sevginiz için sahip olduğum muazzam minnettarlığı kelimeler yeterince ifade edemez. Teşvikiniz, anlayışınız ve fedakarlıklarınız tezimi üzerine inşa ettiğim temel oldu. En zor zamanlarımda bile bana olan inancınız benim itici gücüm oldu. İster gece geç saatlerde yapılan sayısız tartışma, ister dinlemeye kulak verme, ister sadece rahatlatıcı bir mevcudiyet sağlamak için orada bulunma olsun, desteğiniz ölçülemez bir hediye oldu.

Sevgili dostlarım, yeteneklerime olan inancınız, beyin fırtınası yapmak için harcadığımız sayısız saat ve sonsuz teşvik sözleriniz beni ileriye iten yakıt oldu. Dostluğunuz ve sarsılmaz desteğiniz bu yolculuğu sadece katlanılabilir değil aynı zamanda keyifli hale getirdi. Başarılarımı kutladığınız, kendimden şüphe duyduğum anlarda orada olup moralimi yükselttiğiniz ve bana akademik yoğunluğun ortasında molalar verip neşe bulmamı hatırlattığınız için teşekkür ederim.

Nazik sözlerle, yardım eli ya da sessiz anlayışla beni büyük ve küçük şekillerde destekleyen herkese, katkılarınızın yolculuğumda silinmez bir iz bıraktığını bilin.

Sonsuz teşekkürler.

Fjolla AHMETI

12 /01/2024

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Fjolla Ahmeti

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xixiii
GÖRSELLER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Kanser ve Hücre Döngüsü	5
2.3. Kanser ve Apoptoz	7
2.4. Sitotoksosite	8
2.5. Migrasyon ve İnvazyon	9
2.6. Glioblastoma	9
2.7 Proteozom İnhibitorleri	11
2.7.1. Gliomada proteazom inhibitörünün neden olduğu apoptoz mekanizmaları.....	12
2.7.2. İxazomib.....	13
2.8. Antifungal Ajanlar	15
2.8.1. Fumagillin	15

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER.....	18
3.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	18
3.2. Kullanılan Malzemelerin Steril Edilmesi	19
3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	20
3.3.1. Stoktan hücre çıkarma ve hücrelerin kültüre alınması.....	20
3.3.2. Hücrelerin pasajlanması	20
3.3.3. Hücre sayımları	21
3.4. Kullanılan Maddelerin Hazırlanması.....	21
3.4.1.İxazomib	22
3.4.2. Fumagillin	22
3.5. MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi.....	22
3.5.1. Kombine konsantrasyonların sinerjistik/sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi	24
3.5.2. İstatistiksel analiz	24
3.6. Akış Sitometri Yöntemi ile Apoptotik Etkilerin Belirlemesi.....	24
3.7. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Cihazında Proliferasyon ve Migrasyon Çalışmaları.....	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	27
4.1. İxazomib, Fumagillin ve Kombinasyonlarının HUVEC U87-MG, C6 ve SH-SY5Y Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Etkilerin Değerlendirilmesi ...	27
4.1.1. İxazomib, Fumagillin ve kombinasyonlarının HUVEC hücrelerinde 48 saat sitotoksik etkilerin değerlendirilmesi	27
4.1.2. İxazomib, Fumagillin ve kombinasyonlarının U87-MG hücrelerinde 48 saat sitotoksik etkilerin değerlendirilmesi	28
4.1.3. İxazomib, Fumagillin ve kombinasyonlarının C6 hücrelerinde 48saat sitotoksik etkilerin değerlendirilmesi	30

4.1.4. İxazomib, Fumagillin ve kombinasyonlarının SHSY-5Y hücrelerinde 48 saat sitotoksik etkilerin değerlendirilmesi	32
4.2. İxazomibin Fumagillin ve Kombinasyonlarının HUVEC, U87-MG, C6 ve SHSY-5Y Hücreleri Üzerinde Sinerjistik/Antagonistik Etkilerinin Değerlendirilmesi	33
4.3. Apoptik Etkinin, Akış Sitometride AnnexinV-PI Yöntemi ile Değerlendirilmesi.	38
4.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Deney Sonuçları	44
4.4.1. U87-MG hücre hattı üzerinde İxazomib, Fumagillin ve kombin uygulamasının proliferasyon etkilerinin değerlendirilmesi.	44
4.4.2. U87-MG hücre hattı üzerinde İxazomib, Fumagillin ve kombin uygulamasının migrasyon etkilerinin değerlendirilmesi.	46
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	48
KAYNAKÇA.....	51
ÖZGEÇMİŞ	59

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo. 3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar.....	18
Tablo. 4.1. HUVEC hücrelerine İxazomib, Fumagillin ve kombine uygulamaların 48. saat için hücre canlılık (%) oranları (ortalama $\pm$ standart sapma) ve CDI değerleri. (Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı.).....	34
Tablo. 4.2. U87-MG hücrelerine İxazomib, Fumagillin ve kombine uygulamaların 48. saat için hücre canlılık (%) oranları (ortalama $\pm$ standart sapma) ve CDI değerleri. (Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı.).....	35
Tablo. 4.3. C6 hücrelerine İxazomib, Fumagillin ve kombine uygulamaların 48 saat için hücre canlılık (%) oranları (ortalama $\pm$ standart sapma) ve CDI değerleri. (Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı.)	36
Tablo. 4.4. SHSY5Y hücrelerine İxazomib, Fumagillin ve kombine uygulamaların 48 saat için hücre canlılık (%) oranları (ortalama $\pm$ standart sapma) ve CDI değerleri. (Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı.).....	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Normal ve kanser hücresi bölünmesi	4
Şekil 2.2. Hücre döngüsü kontrol noktaları, hücre büyümesini, tutuklanmasını veya apoptozu belirleyen karmaşık etkileşim ağını düzenler	6
Şekil 2.3. 26S Proteozom ve proteozom inhibitörlerinin bağlanma bölgelerinin gösterilmesi.....	12
Şekil 2.4. İxazomib'in kimyasal yapısı.	13
Şekil 2.5. İxazomib etki mekanizması.....	14
Şekil 2.6. Fumagillin'in kimyasal yapısı.....	16
Şekil 2.7. Sinyal kaskadların normal çalışmasını (siyah oklar) ve Fumagillin'in MetAP2 üzerindeki etkisini (kırmızı süresiz oklar) göstermektedir. Fumagillin (F), MetAP2'ye kovalent olarak bağlanır ve çeşitli seviyelerde G proteini, SRC ve ARF sinyal yol.....	17
Şekil 3.1. Tetrazolyum tuzunun (MTT), suda çözünmeyen formazana dönüştürülmesi.....	23
Şekil 4.1. İxazomib ve Fumagillinin tekli ve kombin uygulamalarının % HUVEC hücre canlılığı üzerine etkileri (n=7) (ortalama ± standart sapma), ****p < 0.0001. (Kontrol: %0.1 dmso içeren medyum)	27
Şekil 4.2. İxazomib ve Fumagillinin tekli ve kombin uygulamalarının %U87-MG hücre canlılığı üzerine etkileri (n=7) (ortalama ± standart sapma), ****p < 0.0001. (Kontrol: %0.1 dmso içeren medyum)	29
Şekil 4.3. İxazomib ve Fumagillinin tekli ve kombin uygulamalarının %C6 hücre canlılığı üzerine etkileri (n=7) (ortalama ± standart sapma), ****p < 0.0001. (Kontrol: %0.1 dmso içeren medyum)	31
Şekil 4.4. İxazomib ve Fumagillinin tekli ve kombin uygulamalarının %SHSY-5Y hücre canlılığı üzerine etkileri (n=7) (ortalama ± standart sapma), ****p < 0.0001. (Kontrol: %0.1 dmso içeren medyum)	32
Şekil. 4.5. SHSY-5Y Hücre Hattı Üzerinde İxazomib Ve Fumagillin'in 48 Saatlik Akış Sitometride Annexin V-PI Apoptoz Sonuçları.....	40
Şekil. 4.6. U87-MG Hücre Hattı Üzerinde İxazomib Ve Fumagillin'in 48 Saatlik Akış Sitometride Annexin V-PI Apoptoz Sonuçları.....	41

Şekil 4.7 a. U87-MG hücrelerinde İxazomib ve Fumagillinin tekli ve kombin uygulaması, hücre proliferasyon etkilerinin değerlendirilmesi	45
Şekil 4.7 b. İxazomib ve Fumagillinin tekli ve kombin uygulaması, hücre proliferasyon etkilerinin değerlendirilmesi.....	45
Şekil 4.8 İxazomib ve Fumagillinin tekli ve kombin uygulaması, hücre migrasyonu migrasyonun normalize hali	46



GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 3.1. SHSY-5Y hücre hattının mikroskopik görüntüsü (100µm)	21
Görsel 3.2. U87-MG hücre hattının mikroskopik görüntüsü (500µm)	21
Görsel 3.3. HUVEC hücre hattının mikroskopik görüntüsü (100µm).....	22
Görsel 3.4. C6 hücre hattının mikroskopik görüntüsü (100µm)	22
Görsel 4.1. Apoptotik ölüm geçiren SHSY-5Y hücrelerinin mikroskopik görüntüsü...	39
Görsel 4.2. Apoptotik ölüm geçiren U87-MG hücrelerinin mikroskopik görüntüsü	39



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AML	:Akut miyeloid lösemi
ARF	:ADP-Ribozilasyon Faktörü
CDI	: İlaç etkileşiminin katsayısı
DMEM	:Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil sulfoksit
EDTA	:Etilen Diamin Tetra Asetik asit
EMEM	:Eagle's Minimum Essential Medium
FBS	:Fetal Bovine Serum
Fum-PD	:Fumagillin Sn2 ön ilacı
GBM	:Glioblastoma
MEM	:Minimum Essential Medium
MetAP	:Metyonin aminopeptidaz
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
PI	:Proteozom İnhibitorler
PBS	:Phosphate-buffered saline Fosfat Tamponlu Tuz
Rb	: Retinoblastoma protein
SRC	:Proto-Onkogen Tirozin-Protein Kinaz Src
TMZ	:Temozolomid

1. GİRİŞ

Proteazom inhibisyonu etkili bir antikanser tedavi yöntemi olarak son yıllarda giderek önem kazanmıştır. Proteazom, normal hücresel işleyişin ayrılmaz bir parçası olan hasarlı ve ubiquitinlenmiş proteinlerin parçalanmasından sorumludur. Antitümör etki için 26S proteozom kompleksi hedef alınarak birçok proteozom inhibitörü geliştirilmiş ve test edilmiştir. Bu proteozom inhibitörleri, farklı tümör tiplerinde apoptozu harekete geçirerek antitümör etkiye sahiptirler. Klinikte birçok proteozom inhibitörü için multipl myeloma ve solid tümörlerin tedavisi için çalışmalar bulunmaktadır.

2003'ten beri multipl miyelom tedavisi için Bortezomib intravenöz olarak uygulanan onaylanmış bir proteozom inhibitörüdür. İxazomib (MLN2238) de, bu hasta popülasyonu için FDA tarafından onaylanan ikinci nesil ilk oral proteazom inhibitörüdür.

Bortezomib araştırmalarının arkasından da, İxazomibin, yakın zamanda multipl miyelomaya karşı etkili olduğunu kanıtlanmıştır. Lenfomanın fare ksenograft modellerinde, İxazomib'in güçlü ve geri dönüşümlü bir proteazom inhibitörü olduğu gösterilmiştir.

Proteozom inhibitörleri kendilerine özgü bir etki mekanizmasına sahiptirler. Bunlar; hücre adezyonunun bozulması, sitokin bağımlı yaşam yollarının kesilmesi (NF-kB gibi), anjiyogenезin inhibe olması, endoplazmik retikulum stresinin aktivasyonu, proapoptotik genlerin yukarı-regülasyonu ya da anti-apoptotik genlerin aşağı-regülasyonudur.

Kanser veya daha sıklıkla kanser tedavileri, hastanın bağışıklık sistemini zayıflatabilir ve immünsupresyon ortaya çıkar. Kanser ilişkili immünsupresyonun sıklığı ve derecesi, uygulanan ilaçlara ve kanserin türüne göre değişmekle birlikte, bağışıklık sistemi zayıflayan hastada fırsatçı enfeksiyon risklerini de doğurur. Hem bakteriler, hem virüsler, hem mantarlar, bağışıklık sistemi baskılanmış kişide fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan antifungaller; azoller, polienler, flusitozin ve ekinokandinlerdir.

İxazomib, tercihen 20S proteazomun beta 5 alt birimine bağlanan ve kimotripsin benzeri aktivitesini inhibe eden, tersine çevrilebilir bir proteazom inhibitörüdür. Glioma hücreleri üzerinde sitotoksik ve antianjiyojenik etkilere sahip olduğu gösterilen bir proteazom inhibitörüdür. Fumagillin de, *Aspergillus fumigatus* fresenius'dan elde edilmiş bir sekonder metabolit olup, metiyonin aminopeptidazı inhibe eden bir mikotoksindir.

İxazomib ve Fumagillin kombinasyonu, glioma hücreleri üzerinde gelişmiş sitotoksik, apoptotik ve antianjiyojenik etkilere yol açabilir. Kombinasyon tedavisinin sitotoksik etkilerini değerlendirmek için MTT testi gibi bir hücre canlılığı testi gerçekleştirmiş. Bu tahlil, hücrelerin metabolik aktivitesini ölçer ve İxazomib ve Fumagillin ile tedaviyi takiben glioma hücrelerinin yaşayabilirliğini değerlendirmek için kullanılabilir.

Kombinasyon tedavisinin apoptotik etkilerini değerlendirmek için akış sitometrisine dayalı bir tahlil, Annexin V/PI boyaması kullanılmıştır. Bu tahlil, erken apoptozun ayırt edici özelliği olan fosfatidilserinin hücre zarı üzerinde dışsallaşmasını ölçer.

Özet olarak, İxazomib ve Fumagillin kombinasyonu, sitotoksikite, apoptoz ve antianjiyojenik etkilere neden olarak glioma hücreleri üzerinde sinerjistik etkilere sahip olabilir.

Kandidemi insidansı ve epidemiyolojisi, hasta grupları arasında büyük farklılık göstermektedir. Malignitesi olan hastalarda kandidemi önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olmaktadır.. Biz bu çalışmamızda solid bir kanser hücresi olan U87-MG glioma hücresi üzerinde antineoplastik bir ilaç olan İxazomib ile antimikrobiyal bir ilaç olan Fumagillin kombin uygulamasının sitotoksik, apoptotik etkileri ile hem glioma hem de HUVEC endotel hücrelerinde de antianjiyojenik etkilerini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Ulusal kanser enstitüsüne göre kanser, vücuttaki bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü ve vücudun diğer bölgelerine yayıldığı bir hastalıktır (http-1). Anormal hücre büyümesi (neoplasia), hastalığın biyolojik uç noktasıdır (Shelton, 2010).

Kanser, esas olarak kritik hücre düzenleyici proteinleri kodlayan genleri mutasyona uğratan çevresel faktörlerin neden olduğu potansiyel olarak ölümcül bir hastalıktır. Bu hastalıkta, anormal hücre davranışı normal dokuları tahrip eder ve hayati organlara yayılarak yaygın bir hastalığa yol açar. Geniş anormal hücre kitleleri genellikle hastalığın ilerlemesinin bir göstergesi olarak kabul edilir (Alison vd., 2011).

Normal hücrelerde, genler hücre büyümesinden, ölümüne kadar birçok mekanizmada rol oynamaktadır. Genetik değişiklikler, tüm kromozomlarda genetik materyalde kazanç veya kayba veya tek bir DNA nükleotidini etkileyen tek nokta mutasyonu gibi çeşitli düzeylerde meydana gelebilir (Mandal, 2019). Kanser, hücrelerimizin çalışma şeklini, özellikle de nasıl büyüyüp bölündüklerini kontrol eden genlerdeki değişikliklerden kaynaklanır. Bunlar:

Protoonkogen - hücrelerin sinyalizasyon mekanizmasında büyüme, farklılaşma, çoğalma ve apoptozis gibi iç sinyal yollarının normal düzeninde görevli proteinlerin sentezininin gerçekleşmesini sağlayan genlerdir (Özen, 2021).

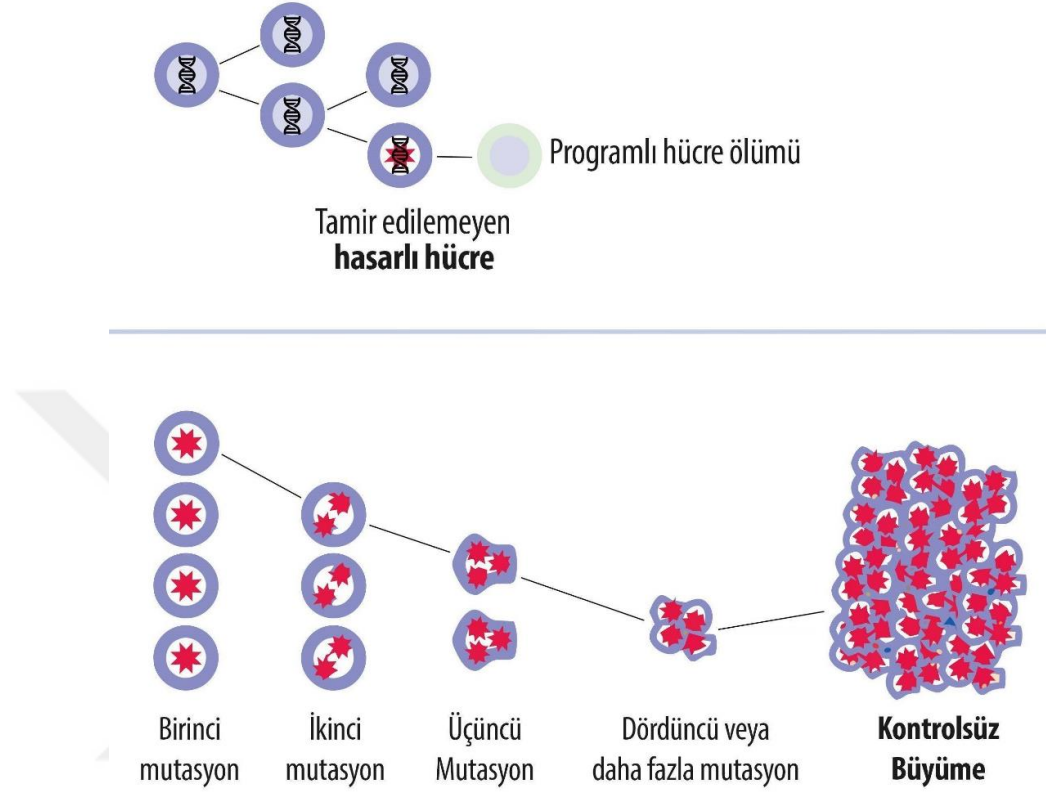
Onkogenler – bunlar kanser oluşumu ile ilişkili genlerdir. Kanser oluşumunda, protoonkogenlerin uygunsuz seviyelerde eksprese edilmesi veya mutasyon nedeniyle değiştirilmiş normal gen ifadeleri etkili olmakta ve kanserli hücre oluşumuna yol açmaktadır (Mandal, 2019).

Tümör baskılayıcı genler – bu genler anormal hücre bölünmesini engeller ve DNA'sı hasar görmüş hücrelerin ölümünü tetiklemektedir. Kanserli hastalarda bu tümör baskılayıcı genler genetik değişiklikler nedeniyle görevlerini tam anlamı ile gerçekleştiremezler. Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşümünde birçok gende meydana gelen değişiklikler rol oynar (Mandal, 2019).

Kanser, vücudun birçok farklı bölgesinde ortaya çıkabilen hastalık grubunu ifade eder. Bununla birlikte, aşağıdaki özellikler tüm kanser türlerinde ortaktır:

- Anormal hücre büyümesi
- Diğer dokuları istila etme kapasitesi

- Kan damarları veya lenfatik kanallar yoluyla uzak organlara yayılma kapasitesi (metastaz)



Şekil 2.1 Normal ve kanserli hücrelerde hücre bölünmesi (Mandal, 2019)

Kanser hücreleri, normal hücrelerin hücre çekirdeğindeki DNA'nın (deoksiribonükleik asit) hasar gördüğü veya mutasyona uğradığı durumlardan kaynaklanır. DNA hasar gördüğünde, hücre genellikle ya hasarı onarır ya da ölür. Ancak kanser hücrelerinde hasar gören DNA onarılmaz ve hücre ölümüne gidemez ise, bunun yerine, kusurlu DNA'yı içeren daha birçok anormal hücre meydana gelir. DNA hasarı kalıtsal olabilir veya kişinin yaşamının herhangi bir noktasında kendiliğinden oluşabilir. DNA hasarı, belirli toksinlere maruz kalındığında tetiklenebilir, ancak kansere neden olabilecek birden çok faktör vardır ve genellikle kesin bir nedenini saptamak zordur (<http-1>).

Bir gendeki tek bir mutasyon, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına izin vermek için yeterli değildir. Bu alanda yapılan kapsamlı araştırmalar sonucunda, hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına yol açan dört veya daha fazla mutasyon tanımlanmıştır. Normal hücrelerde DNA'sı hasar görmüş hücreler belirli genlerin etkisi

altında hasarlı bölgeyi onarmaya çalışırlar. Hasar onarılamaz hale geldiğinde programlanmış hücre ölümü (apoptoz) başlar (Şekil 2.1) (http-1; Mandal, 2019).

Ulusal kanser enstitüsüne göre 100'den fazla kanser türü vardır. Aşağıda belirli hücre türlerini kapsayan bazı kanser kategorileri listelenmektedir:

Karsinom: Karsinomlar en sık görülen kanser türüdür. Vücudun iç ve dış yüzeylerini kaplayan hücreler olan epitel hücreleri tarafından oluşturulurlar. Mikroskop altında bakıldığında genellikle sütun benzeri bir şekle sahip olan birçok epitel hücresi vardır (http-1).

Sarkomlar: Sarkomlar, kas, yağ, kan damarları, lenf damarları ve fibröz doku (tendonlar ve bağlar gibi) dahil olmak üzere kemik ve yumuşak dokularda oluşan kanserlerdir (http-1).

Lösemi: genellikle kemik iliği ve kanı etkileyen bir tür kan kanseridir. Bu hastalık, vücutta aşırı miktarda anormal beyaz kan hücresi üretilmesi sonucu ortaya çıkar. Normalde, kan hücreleri vücutta belirli bir düzen içinde üretilir ve ölçülü bir şekilde yenilenir. Ancak lösemi durumunda, bu düzen bozulur ve anormal hücreler kontrolsüz bir şekilde üretilir. Akut lenfoblastik lösemi, akut miyeloid lösemi, kronik lenfositik lösemi ve kronik miyeloid lösemi dahil olmak üzere çeşitli lösemi türleri vardır (http-1).

Lenfoma: Lenfoma, lenfatik sistemde başlayan lenfositlerden (T hücreleri veya B hücreleri) köken alan kanser türlerini ifade eder (Gül, 2013).

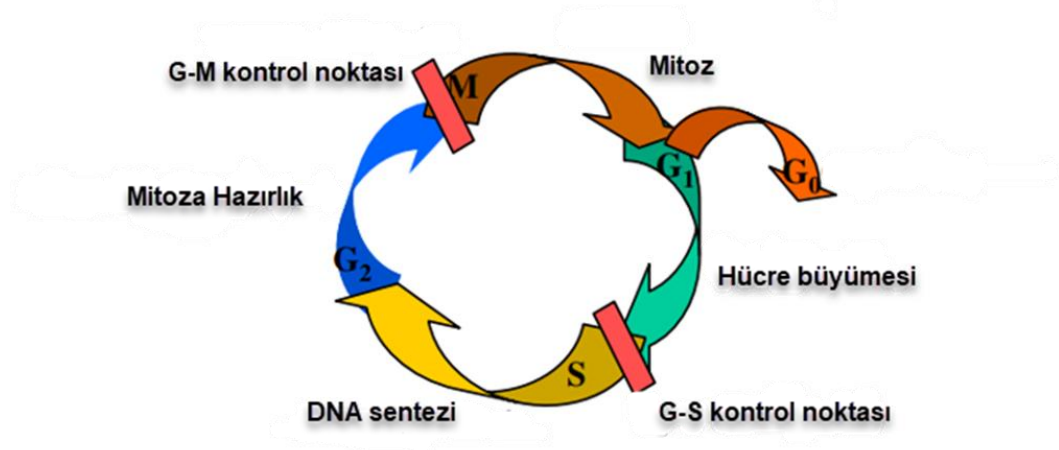
Multiple miyeloma: Multipl miyelom, B hücresinden türetilen plazma hücrelerinin neoplastik monoklonal proliferasyonu ile karakterize edilen malign kanserdir (Akın, 2007).

Melanom: Melanom, melanin yapan özel hücreler olan melanosit haline gelen hücrelerde oluşan kanserdir (http-1).

Beyin ve Omurilik Tümörleri: Beyin ve omurilik tümörlerinin farklı türleri vardır. Bu tümörler, oluştukları hücre tipine ve tümörün merkezi sinir sisteminde ilk oluştuğu yere göre adlandırılırlar (http-1).

2.2. Kanser ve Hücre Döngüsü

Hücre bölünmesi, esas olarak DNA replikasyonu ve replike olmuş kromozomların iki ayrı hücreye ayrılması ile karakterize bir süreçtir. Hücre bölünmesi mitoz (M), yani nükleer bölünme süreci ve ara faz (iki M fazı arasındaki ara dönem: interfaz) dönemlerini içerir (Şekil 2.2) (Vermeulen, vd 2005).



Şekil 2.2. Hücre döngüsü kontrol noktaları, hücre büyümesini, tutuklanmasını veya apoptozu belirleyen karmaşık etkileşim ağını düzenler (Foster, 2008).

Kötü huylu hücrelerin çoğu, normal hücrelere kıyasla yüksek oranda çoğalır, kötü huylu hücreler, hücre çoğalmasını sürdürmek için protein sentezi ve yanlış katlanmış ve/veya katlanmamış proteinlerin temizlenmesi için artan bir gereksinime sahiptir (Ishida, 2018).

Mutasyonlar çoğunlukla proto-onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelir. Proto-onkogenler normal olarak farklı hücre proliferasyon seviyelerinde hareket eder, ancak mutasyona uğradığında tümör büyümesini destekleyebilir. Benzer şekilde, tümör baskılayıcı genlerin mutasyonu, hücre döngüsü ilerlemesinin inhibisyonunu engelleyerek anormal büyümeyi kolaylaştırır. Normal koşullar altında, büyüme düzenleyici mekanizmalar homeostazı sürdürmeye çalışır. Hücre içindeki homeostaz, proliferasyon, büyümenin durması ve apoptoz arasındaki denge ile düzenlenir (Foster, 2008).

Hücre döngüsünün herhangi bir aşaması tamamlanmadan bir sonraki sürece geçerse, genetik materyal tam ve doğru bir şekilde kopyalanamadığı için hücre zarar görebilir. Hücre döngüsündeki kontrol noktaları G-S geçişinde, G-M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişindedir. Bu kontrol noktaları, hücrenin döngüye devam edip etmeyeceğine karar verir (Şekil 2.2) (Gloria, 2014).

2.3. Kanser ve Apoptoz

"Apoptoz" terimi ilk olarak 1972'de John Kerr tarafından tanımlanmıştır ve bir hücreden "apoptotik cisimler" oluşumunun morfolojik özelliğini ifade eder (Lawen, 2003).

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, plazma zarı taşması, hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve parçalanması gibi tipik morfolojik özelliklere sahip bir süreçtir. Hücre ölümü, canlı sistemlerdeki dinamik dengenin kontrolü için temel bir stratejidir ve temelde farklı iki hücre ölümü şekli, apoptoz ve nekroz tanımlanmıştır. Nekroz, şiddetli hipoksi/iskemi, aşırı sıcaklıklar ve mekanik travma gibi şiddetli çevresel bozulmalara tepki olarak hücre zarının erken bozulmasına ve düzenli hücre yapılarının ilerleyici bozulmasına neden olan bir süreçtir. Buna karşılık, apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, evrim boyunca sıkı bir şekilde düzenlenen ve korunan enerji gerektiren bir hücre içi makinenin aktivasyonunu içerir (Vermeulen. vd., 2005).

Apoptoz, hücre büzülmesi, plazma zarı taşması, hücre ayrılması, nükleer yoğunlaşma, DNA parçalanması, mitokondriyal parçalanma, plazma zarı fosfatidilserinin (PS) dışsallaştırılması ve apoptotik kaspazların aktivasyonunu içeren bir dizi ortak morfolojik ve biyokimyasal özellik ile karakterize edilir.

Apoptotik hücre ölümünün bir ölçüsü olarak akış sitometrisi ile parçalanmış DNA'nın saptanmasıdır. İnternükleozomal DNA fragmentasyonu, apoptozun önemli bir göstergesidir (Henry vd, 2013).

Apoptoz morfolojik bir olgudur. Işık (veya tercihen elektron) mikroskobu yardımıyla bakıldığında, apoptotik hücrenin özellikleri arasında kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanma (piknoz), plazma zarı taşması ve hücre büzülmesi yer alır. Sonunda hücreler, inflamatuvar bir yanıtı tetiklemeden fagositoz tarafından temizlenen küçük zarla çevrili parçalara (apoptotik cisimler) ayrılır (Reed, 2005).

Sistein aspartile özgü proteazlar için kaspazlar olarak bilinen aspartik asit kalıntılarındaki substratlarını parçalayan bir hücre içi sistein proteaz ailesinin aktivasyonu, apoptoz olarak tanıdığımız bu morfolojik değişikliklere neden olur (Reed, 2005).

Apoptozun yaşamın ayrılmaz bir parçası olduğu düşünüldüğünde birçok hastalığın patogenezinde rol oynayabileceği açıktır. Normalde apoptoz istenmeyen, yaralanmış ve virüs ile enfekte olmuş hücreleri ortadan kaldırır, ancak bu süreç bozulduğunda kanser,

ateroskleroz ve otoimmün bozukluklar gibi apoptozun baskılanmasıyla bağlantılı hastalıklar meydana gelmektedir (Vermeulen vd., 2005).

Kanserde çok fazla hücre birikmesi, aşırı hücre çoğalmasının ve/veya yetersiz apoptozun sonucudur. Proapoptotik genlerdeki inaktive edici mutasyonların yansısı antiapoptotik proteinlerin artan ekspresyonu veya aktivitesi, yetersiz apoptoz ve malign hücrelerin büyümesi ile sonuçlanır (Vermeulen vd., 2005).

Halen anti-kanser tedavisinde kullanılan çoğu ilaç, hem reseptör aracılı hem de mitokondriyal aracılı yollarla apoptozu indükleyerek hedef hücreleri öldürür. Hücrelerin çeşitli kemoterapötik ajanlarla tedavisinin ardından mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması, sitokrom c salınımı ve farklı kaspazların aktivasyonunun meydana geldiği bildirilmiştir (Vermeulen. vd., 2005).

2.4. Sitotoksiste

Sitotoksiste, belirli maddelerin hücrelerde hasara veya ölüme neden olma yeteneğini ifade eder. Kanser bağlamında, sitotoksiste genellikle kemoterapi ilaçlarının veya radyasyon tedavisinin kanser hücrelerini öldürme kabiliyetini ifade eder. Bu tedaviler, kanser hücreleri gibi hızla bölünen hücreleri hedefleyerek ve büyüme ve bölünme yeteneklerini bozarak çalışır (Adan vd., 206).

Kemoterapi ilaçları, DNA sentezine veya hücre bölünmesine müdahale ederek hızla bölünen hücreleri hedeflemek üzere tasarlanmıştır (Moll ve Dobbelstein, 2014). Bununla birlikte, bu ilaçlar kemik iliği, saç kökleri ve sindirim sistemi gibi hızlı bölünen normal hücreleri de etkileyerek anemi, saç dökülmesi ve mide bulantısı gibi yan etkilere neden olabilir (Simrat vd., 2022).

Radyasyon tedavisi, kanser hücrelerini DNA'larına zarar vererek öldürmek için yüksek enerjili radyasyon kullanır. Kemoterapi gibi radyasyon tedavisi de çevre dokulardaki sağlıklı hücrelere zarar vererek yorgunluk, cilt tahrişi ve sindirim sorunları gibi yan etkilere yol açabilir (Baskar vd., 2012).

Glioma hücrelerinde sitotoksistenin önemi, bu tümörleri tedavi etmek için daha etkili ve hedefe yönelik bir yaklaşım sağlama potansiyeli kapsar. Sitotoksik ajanlar, sağlıklı beyin dokusunu zarar görmeden bırakırken kanser hücrelerini seçici olarak hedefleyerek ve öldürerek, tedavi sonuçlarını iyileştirmenin ve gliomalar için geleneksel terapilerle ilişkili yan etkileri azaltmanın bir yolunu sunabilir(Minniti vd., 2009).

2.5. Migrasyon ve İnvazyon

Hücre invazyonu ve göçünün incelenmesi, altta yatan biyolojik ve moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını sağlamak için büyük önem taşımaktadır (Kirstein, 2009).

Hücre invazyonu, özellikle kanser hücreleri ile ilgili olarak bitişik dokulara saldırı ve yıkımdır. Hücre göçü, genellikle kimyasal sinyale yanıt olarak hücrelerin bir bölgeden diğerine hareketidir ve embriyonik gelişim, hücre farklılaşması, yara iyileşmesi, bağışıklık yanıtı, iltihaplanma ve özellikle kanser metastazı dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemlidir (Kirstein, 2009).

Hücre göçü ve istilası, hücrelerin yüzeyler boyunca ve dokular boyunca aktif yer değiştirmesini içerir ve hem normal hem de patofizyolojik koşullarda erken embriyonik gelişimden yetişkinliğe kadar hayatın farklı evrelerinde anahtar süreçlerdir. Kanser metastatik hastalığa doğru ilerlemesi sırasında, motilite ve istilanın altında yatan hücresel mekanizmalar, vücutta yayılmak için kanser hücreleri tarafından kaçırılma eğilimindedir. Hücre hareketliliğini yönlendiren önemli bir mekanizma, hücrelerin kimyasal bir gradyan boyunca yönlü hareketi olan kemotaksistir (DeWever, 2015).

2.6. Glioblastoma

Glioblastoma (GMB), kasvetli kötü bir prognoz ile en yaygın ve agresif primer beyin tümörünü temsil eder. Standart bakım tedavisine rağmen GMB radyasyona ve sitotoksik kemoterapiye en dirençli kanserler arasındadır ve bu nedenle, 15 aylık ortalama sağkalımla tedavi edilemez bir hastalık olmaya devam etmektedir. GMB, nöro-onkolojide benzersiz bir mücadeleyi temsil eder (Balyasnikova vd., 2011).

Malign gliomalar, cerrahiye veya radyasyona ve kemoterapiye yanıtlarını, nüks eğilimini ve prognozunu yansıtan histolojik farklılaşma aralığında astrositik veya oligodendrosit kökenli bir grup primer beyin tümöründen oluşur (Papandreou vd., 2013). Bu tümörler, apoptotik mekanizmalara karşı dirençleri ve normal beyin parankimi boyunca geniş bir şekilde yayılma yetenekleri ile karakterize edilir (Balyasnikova vd., 2011).

"Omik" alanlarda (genomik, proteomik vb.) kaydedilen ilerlemeler, GBM'yi son derece heterojen bir hastalık olarak ortaya çıkardı ve o zamandan beri mevcut tedavileri

iyileştirmek amacıyla birçok hedefe yönelik farmakolojik ajan geliştirildi. Ne yazık ki, bu ilaçların büyük çoğunluğu, hayvanlarda veya hatta klinik deneylerde test edildiğinde uzun süreli remisyona ulaşamadı, bu da tedavi seçeneklerini hâlâ sınırlı hale getirmektedir.

GBM hücre kültürü koşullarının oluşturulması ve evrimi

Fibroblast, epitel ve kan hücreleri serumla temas halindeyken, birçok serum proteini kan-beyin bariyerini geçemediğinden, beyin hücreleri farklı bir protein bileşimine sahip olan beyin omurilik sıvısı (BOS) ile etkileşim halindedir. BOS proteinlerinin çoğu kandan gelse de, bunların yaklaşık %20'si beyin kaynaklıdır (Ledur vd., 2017).

Glioma hücreleri geleneksel olarak Fetal Bovine Serum (FBS) ile zenginleştirilmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ortamında kültürlere edilmektedir. Solid bir tümörde bir kanser hücresinin yaşam alanı, tümör popülasyonunun kendi başına heterojenliğinin yanı sıra bağışıklık hücrelerini, kan damarlarını ve dinamik pH ve oksijen seviyelerini içeren karmaşık bir niştir. Bu ekosistem hala *in vitro* olarak çoğaltılamaz, ancak hücrelerin tutunduğu substrat seçimi, besinler, büyüme faktörleri ve oksijen seviyeleri gibi bazı değişkenler optimize edilebilir (Ledur vd., 2017).

Birçok primer tümör tipi arasında GBM multiforme, tedavi edilebilir olduğu düşünülen oldukça agresif ve ölümcül bir kanserdir. Mevcut tedavi, total rezeksiyon ve ardından radikal kemo- ve radyoterapi ile sınırlıdır. Kullanılan kemoterapötikler, DNA çapraz bağlanması oluşumuna bağlı olarak sitotoksiteyi indükleyen nitrozürelere gibi alkile edici ajanları ve DNA'da tek ve çift sarmallı kırılmalar oluşturarak apoptozu destekleyen temozolomid'i (TMZ) içerir (Sharifzad vd., 2019).

Araştırmadaki büyük ilerlemelere rağmen, GBM'nin tedavisi oldukça zordur. GBM'li hastalarda cerrahi rezeksiyon ve ardından radikal kemoradyoterapi standart bir tedavi protokolüdür. Şu anda, daha etkili tedavi için GBM'leri hedefleyen birçok çalışma devam etmektedir (Sharifzad vd., 2019).

Solid tümörlerin büyümesi, yeni kan damarlarının ortaya çıkmasıyla sınırlıdır. GBM'ler, insanlarda en vaskülarize tümörler arasındadır. Bu tümör tipinde, maligniteyi sıklıkla endotel proliferasyonu takip eder ve anjiyogenez, agresiflik, malignite derecesi ile ilişkilidir ve hastanın hayatta kalması ile ters orantılıdır (Alves vd., 2011).

GBM istilas1: molek1ler mekanizmalar

T1m1r invazyonunun ilk ad1mlarından biri migrasyondur. T1m1r h1creleri, h1cressel kasılma ve posterior salıverme 1zerine y1nlendirilmiş hareketi takiben 1n kenarlarını uzatarak hareket eder. GBM'ler, ana t1m1r k1tlesinden komşu normal dokuya doğru karakteristik g1ç eden h1creleri sergiler. Malign h1creler, bazal membranlar, h1cre dışı matriks ve h1cre bağlantıları gibi fiziksel bariyerlere sızma ve bunları bozma yeteneğine sahiptir (Alves vd., 2011).

2.7 Proteozom İnhibitorleri

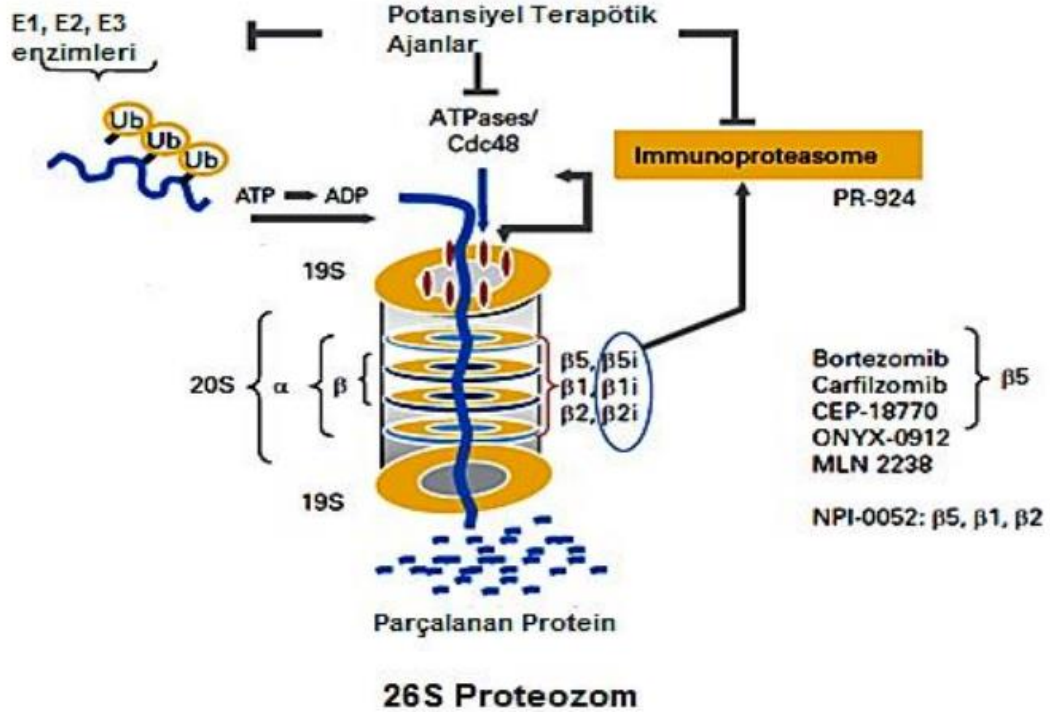
GBM, oldukça infiltratif, proliferatif ve dirençli bir t1m1r olarak bilinmektedir (Laurent vd.,2004). T1m1r1n cerrahi olarak çıkarılması birinci basamak tedavidir. Ne yazık ki, bu t1m1r h1creleri oldukça hareketlidir ve genellikle çevre dokulara sızar. Bu nedenle, kalan t1m1r h1crelerinin sayısını daha da azaltmak için cerrahi tedaviyi kemoterapi ve radyasyon tedavisi takip etmektedir (Zhang, 2013).

GBM, D1nya Sağlık 1rg1t1 (WHO) tarafından astrositomların en y1ksek malignite derecesi olarak sınıflandırılır.Farmakolojik yaklaşım, infiltratif h1creler de dahil olmak 1zere t1m1r h1crelerini hedef alan bir y1ntem olduğu için en etkili y1ntemlerden biri olmaya devam etmektedir. Mevcut antikanser tedavileri, replikatif DNA veya mitotik d1nem gibi ortak hedeflere odaklanmaktadır, ancak diğer h1cre içi hedeflerin keşfi, tamamlayıcı veya sinerjistik etkiye sahip ilaçların geliştirilmesine yardımcı olabilir. Yeni terap1tik yaklaşımlar arasında, proteazom inhibisyonu, h1cre d1ng1s1n1 kontrol etmede ve apoptozu ind1klemeye çok umut vericidir. Ubikuitin/proteazom yolunun h1cre d1ng1s1 ilerlemesi ve h1cre sağkalımında 1nemli bir rol oynayan yeni terap1tik hedeflerden biridir. T1m1rlerde, 1zellikle GBM gibi, protein yıkımı genellikle proteazom yoluyla d1zensizlik g1sterir (Laurent vd.,2004).

Proteozom İnhibitorler (PI) biyolojik aktivitelerini, sitokinlerin inhibisyonu, birkaç adezyon molek1l1n1n baskılanması ve anjiyogenez gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla g1sterir.

Ubikuitin ve proteazomal paralamalar, 1karyotlar için h1cre d1ng1s1 ilerlemesinin, DNA onarımının, apoptozun ve stres tepkisinin s1rd1r1lmesi için 1nemlidir. İlk adımda, tek bir ubikuitin aktive edici enzim 1 (E1), oklu ubikuitin-konjuge enzimler (E2) ve ubikuitin-protein ligazlar (E3), fazlalık veya yanlış katlanmış hedef

proteinlerin çoklu ubikitinasyonuna aracılık eder. Daha sonra, ubikuitin protein molekülleri, 20 S çekirdekli bir proteolitik parçacık ve 19 S düzenleyici parçacıklardan oluşan 26 S proteazom tarafından parçalanır. 20S çekirdeği, proteolitik aktif bölgelere sahip merkezi bir katalitik bölge ile çevrili, farklı polipeptitlerden oluşan dört halkada düzenlenmiş α ve β halkalarından oluşur. Ubikuitin-proteazom yolu, neoplastik büyüme ve metastazda önemli bir rol oynar (Ishida, 2018).



Şekil 2.3. 26S Proteozom ve Proteozom İnhibitörlerinin Bağlanma Bölgelerinin Gösterilmesi
(Engür ve Dikmen, 2015)

2.7.1. Gliomada proteazom inhibitörünün neden olduğu apoptoz mekanizmaları

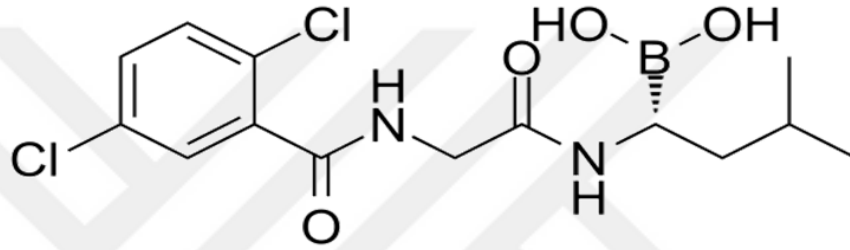
Genel olarak, bir antitümör stratejisi olarak Pİ'lerin tasarımı ve kullanımı, birkaç farklı kanser hücresinde test edilmiştir. Pİ tarafından indüklenen hücre ölümü, hücre döngüsünü durdurma ile ilgili proteinler p53, p21 ve p27'yi artırmak, anti-apoptotik proteinleri azaltmak, ve hücrenin pro- ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerini etkilemek gibi çoklu mekanizmalara sahip olabilir (Papandreou, 2013).

Proteazom inhibitörlerinin tek başına veya malign gliomaların prelinik çalışmalarında diğer farmakolojik ajanlarla kombinasyon halinde kullanılması, hücre ölüm yolları içindeki proteazom tarafından düzenlenen hücre içi hedefleri inceleme fırsatı sunmuştur (Papandreou, 2013).

Proteazom inhibisyonu, aktif olarak çoğalan hücre hatlarındaki hücre ölümünün indüklenmesine neden olur. Proteazom inhibitörleri tarafından indüklenen apoptoz, HL-60 hücrelerinde, Ewing sarkoma hücrelerinde ve glioma hücrelerinde kaspaz 3 benzeri aktivitenin indüklenmesi ile ilişkilidir (Wagenknecht vd.,2008).

2.7.2. İxazomib

İxazomib çeşitli insan tümörlerinin tedavisi için geliştirilmiş ikinci nesil bir proteazom inhibitörüdür (Şekil 2.3).



Şekil 2.4. İxazomib'in kimyasal yapısı (<http-1>).

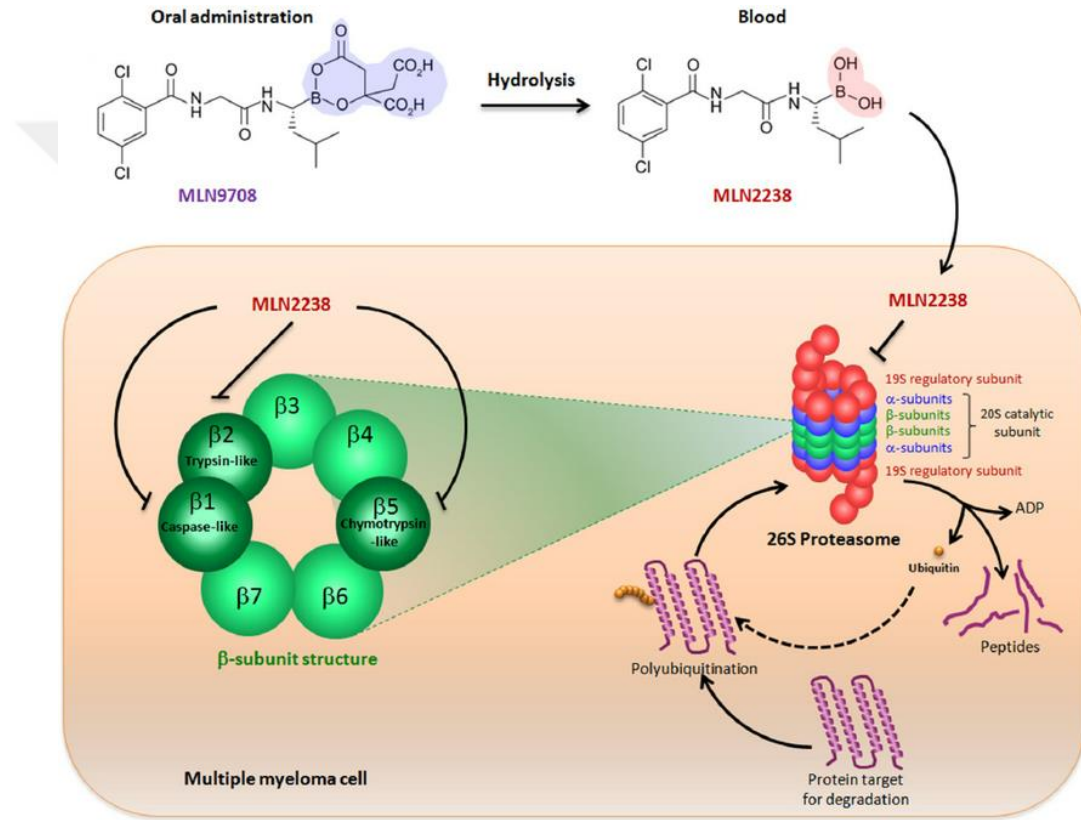
İxazomib, bortezomib'den farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olan bor içeren proteazom inhibitörlerinin geniş çaplı bir taramasıyla geliştirilmiştir, etkinliği artırılmış ve yan etkileri azaltılmış proteazom inhibitörüdür. İxazomib, borik asidin sitrat esteridir ve sulu çözeltilere (örneğin, gastrointestinal sistem ve plazma) maruz kaldığında biyolojik etkiyi taşıyan serbest borik asit metaboliti olan MLN2238'e hidrolize olur (Chauhan vd., 2011).

MLN9708, bor içeren bir küçük peptid inhibitör molekülüdür ve oral yolla kolayca kullanılabilir. Bortezomib'e benzer şekilde, proteazomu ($\beta 5$) inhibe ederek kimotripsin benzeri aktiviteye sahiptir. Bununla birlikte, MLN9708'in 20S proteozomal bozunma yarı ömrü, bortezomib'den daha kısa olduğundan (6 kat daha hızlı), MLN9708'in dokular arasındaki dağılımının bortezomib'e göre daha üstün olduğu kabul edilmektedir. MLN9708 biyolojik olarak etkisizdir, kapsül formunda oral olarak uygulanan MLN9708 ancak hızla hidrolize olarak plazmada biyolojik olarak aktif formu olan MLN2238'e dönüşür. MLN2238, birçok kanser hücre hattına karşı güçlü antikanser aktivite gösterir ve etkili bir şekilde kanser hücrelerinin büyümesini inhibe eder (Engür, 2013).

Mekanizması, 26S proteazomun 20S katalitik alt birimini inhibe ederek protein

degradasyonunu inhibe etmeyi içerir. MLN2238, düşük konsantrasyonlarda, hidrofobik kalıntılardan sonra proteinleri parçalayan $\beta 5$ kimotripsin benzeri alt birimi inhibe eder. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise, MLN2238, asidik kalıntılardan sonra proteinleri parçalayan $\beta 1$ kaspaz benzeri alt birimi ve bazik kalıntılardan sonra proteinleri parçalayan $\beta 2$ tripsin benzeri alt birimi inhibe eder (Şekil 2.4). (Azab vd., 2016).

MLN2238, 20S proteozomun $\beta 5$ alt ünitesine bağlanarak kanser hücrelerinde inhibisyon ve güçlü aktivite göstermektedir. Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda $\beta 1$ ve $\beta 2$ alt ünitesine de bağlandığı ve inhibe ettiği bulunmuştur (Huang ve Chen, 2013).



Şekil 2.5. İxazomib etki mekanizması (Azab vd., 2016).

2.8. Antifungal Ajanlar

Mantar enfeksiyonları insan sağlığı ve yaşamı için sürekli ve ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Birçok mantar enfeksiyonuna, endojen (Kandida enfeksiyonları) veya çevreden edinilebilen (Kriptokokus, Aspergillus enfeksiyonları) fırsatçı patojenlere neden olmaktadır. Diğer mantar enfeksiyonu türü, yani yeni doğanlar, kemoterapi alan kanser hastaları, organ nakli hastaları ve yanık hastaları gibi savunmasızlığı artan bireylerde mantar organizmaları tarafından üretilen invaziv mantar enfeksiyonları ve dermatomikozlardır (Kathiravan vd., 2012).

İnvazif mantar enfeksiyonu, kanserli hastalar arasında enfeksiyona bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir (Segal vd., 2007). İnvaziv mantar enfeksiyonlarının tedavisi, mantarların teşhisi ve duyarlılık testlerindeki sorunlar nedeniyle karmaşıktır (Georgopapadakou ve Walsh, 1996).

Antifungal ajanlar, bir konakçıdan mantar patojenlerini, konakçıya minimum toksisite ile seçici olarak ortadan kaldıran ilaç olarak tanımlanmaktadır (Georgopapadakou ve Walsh, 1996).

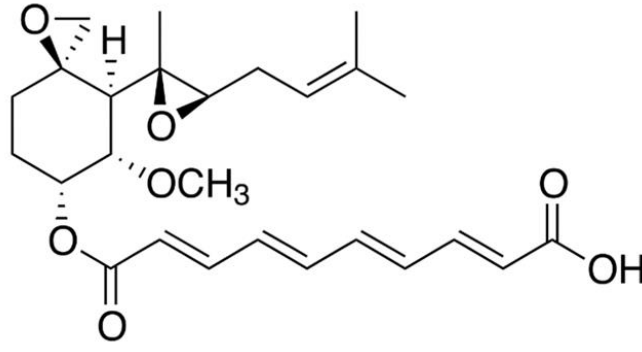
Klinik uygulamada dört temel sistemik antifungal bileşik sınıfı bulunmaktadır: polien antibiyotikler, azol türevleri, alilaminler ile tiyokarbamatlar ve floropirimidinler (Georgopapadakou ve Walsh, 1996).

İmidazol antifungal bileşikler, patojenik etkilerini sterol biyosentez inhibisyonu yoluyla sergilerlemektedir. Bu ilaçlar ayrıca son zamanlarda, GBM dahil olmak üzere çeşitli katı tümörler için potansiyel antikanser ajanlar olarak aday gösterilmiştir (Nagashima vd., 2020).

Antifungal tedavinin seçilmesi ve uygulanmasında her bir antifungal ajanın ilişkilendirilmiş özelliklerinin dikkatlice değerlendirilmesi gerekmektedir. Her bir ilacın farmakokinetik farklılıkları, özellikle mantar enfeksiyonu riski taşıyan hastaların karmaşık tedavi rejimleri göz önüne alındığında, etkili bir uygulamayı zorlaştırabilmektedir (Ashley vd., 2006).

2.8.1. Fumagillin

Fumagillin, ilk olarak *Aspergillus fumigatus*'tan izole edilen güçlü bir mantar metaboliti olup, güçlü bir antibiyotiktir (şekil 2.5). (Van den Heever vd., 2014). Fumagillin ve türevleri, kanser ilerlemesini azaltabildikleri için terapötik olarak faydalıdır (Frottin vd., 2016).



Şekil 2.6. Fumagillin'in kimyasal yapısı (Guruceaga, vd., 2020).

Çalışmalar, Fumagillin'in glioma hücrelerinde apoptozu veya programlanmış hücre ölümünü indükleyebileceğini göstermiştir. Bu, hücre büyümesi ve hayatta kalmasıyla ilgili sinyal yollarının bozulmasıyla gerçekleşmektedir. Fumagillin'in ayrıca glioma hücrelerinin göçünü ve istilasını engellediği de gösterilmiştir (Ingber, 1990).

Anti-kanser etkilerine ek olarak Fumagillin, anti-anjiyojenik etkileri için de incelenmiştir. Anjiyogenez, yeni kan damarları oluşturma sürecidir ve tümörlerin büyümesi ve yayılması için önemlidir. Fumagillin'in, kan damarlarının astarını oluşturan hücreler olan endotel hücrelerinin aktivitesine müdahale ederek anjiyogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (Ingber, 1990).

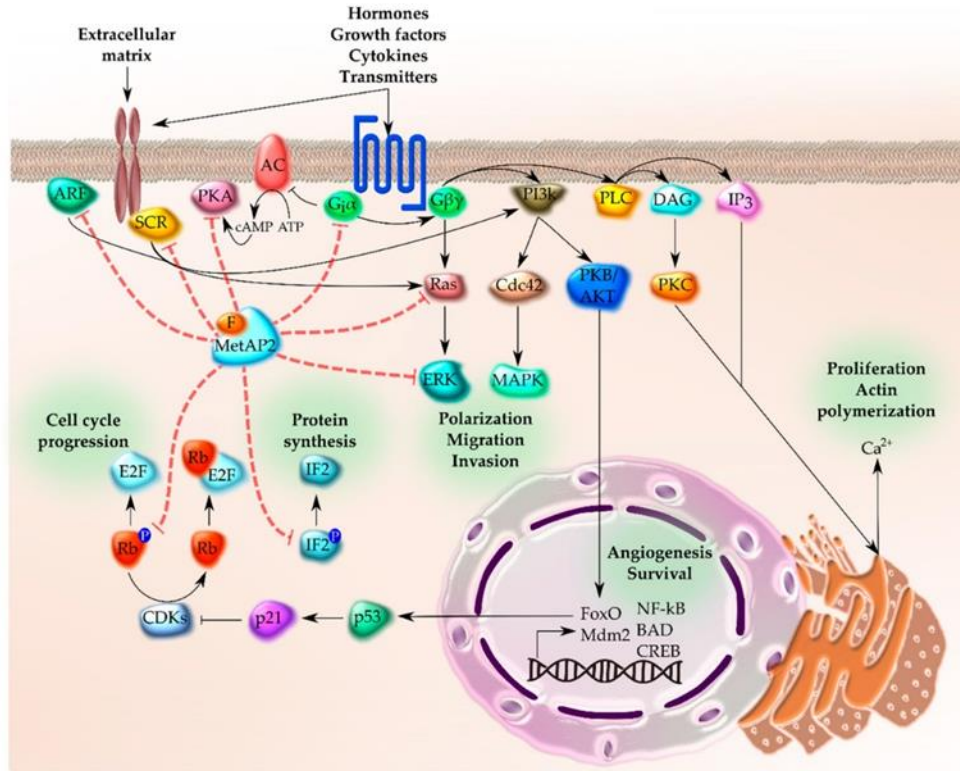
Fumagillin'in, temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) varlığında endotel hücre proliferasyonunu tamamen inhibe ettiği ve farelerde tümör baskılayıcı kaynaklı neovaskülarizasyonu azalttığı bildirilmiştir (Ingber, 1990).

Kusaka vd. (1991), Fumagillin ve AGM-1470 türevinin anti-anjiyojenik bileşikler olduğunu dört farklı deney ile kanıtladı. AGM-1470'in lokal olarak uygulanması, tavuk embriyo koryoallantoik membran ve sıçan kornea deneylerinde anjiyogenezi engellendiğini gösterdi. Ayrıca, sıçan damar organ kültürü deneyinde Fumagillin ve AGM-1470, kan damarlarının oluşumunu ve endotel hücrelerinin büyümesini %90 oranında azaltmıştır; (Kusaka vd., 1991).

Genel olarak Fumagillin, glioma ve diğer kanserlerin tedavisi için potansiyel bir terapötik ajan olarak ümit vaat etmektedir. Apoptozu indükleme ve anjiyogenezi inhibe etme kabiliyetinin yanı sıra diğer ilaçlarla kombinasyon halinde kullanım potansiyeli, onu daha fazla çalışılması gereken bir aday haline getirmektedir (Guruceaga vd., 2020).

Fumagillin'in metiyonin aminopeptidaz (MetAP) aktivitesini inhibe etmesi, sadece

MetAP'leri etkilemekle kalmayıp aynı zamanda özellikle guanin nükleotid bağlayan proteinler ve bunların hücresel fonksiyonlarda yer alan gelişim, hayatta kalma, çoğalma, invazyon, göç, ve tümör oluşumu gibi çeşitli süreçleri etkileyen sinyal yollarını bozmaktadır. Fumagillin, MetAP2'ye kovalent bağlanarak farklı seviyelerde G protein, Proto-Onkogen Tirozin-Protein Kinaz Src (SRC) ve ADP-Ribozilasyon Faktörü (ARF) sinyal yollarını inhibe ederken, Retinoblastoma protein (Rb) ve IF2'nin fosforilasyona karşı korunmasını sağlamaktadır (Şekil 2.7). (Guruceaga vd., 2020).



Şekil 2.7. Sinyal kaskadların normal çalışmasını (siyah oklar) ve Fumagillin'in MetAP2 üzerindeki etkisini (kırmızı süreksiz oklar) göstermektedir (Guruceaga vd., 2020).

3. GEREÇLER ve YÖNTEMLER

Bu çalışma Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Tablo. 3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

10, 100, 1000 ve 5000 µL'lik pipetör	Eppendorf, Kanada
10, 200, 1000 µL'lik mikropipet ucu	Greiner bio-one, ABD
12 kanallı otomatik pipet	Axygen, İngiltere
15 ve 50 mL'lik santrifüj tüpleri	Isolab, Almanya
Penisilin/Streptomisin	Gibco, ABD
Thermo Flask, Filtreli Kapak (75 cm ²)	Thermo Scientific, ABD
Thermo Flask, Filtreli Kapak (25 cm ²)	Thermo Scientific, ABD
2 mL'lik Eppendorf tüp	Greiner bio-one, ABD
5-10 ve 25 mL'lik cam pipet	Isotherm, Türkiye
12 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakası	TPP, İsviçre
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich, Almanya
FBS	Sigma-Aldrich, Almanya
Cedex Smart Slide	Roche, Almanya
L-glutamin	Sigma-Aldrich, Almanya
Parafilm	Pechiney, Fransa
Eagle Minimum Essential Medium	Sigma-Aldrich, Almanya
Şarjlı pipetör	Starlab, Almanya
Tripsin- Etilen Diamin Tetra Asetik asit (EDTA) 10X	Pan Biotech, Almanya
Tripan mavisi	Roche, Almanya

Tablo. 3.1 (Devam) *Kullanılan Kimyasal*

Kryotüp (2mL)	Greiner Bio-One, ABD
Hücre kazıyıcı	Greiner Bio-One, ABD
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Invitrogen, Almanya
İxazomib (MLN2238)	Activebiochem, ABD
96 kuyucuklu hücre kültür plakası	TPP, İsviçre
E-plate 16	Roche, Almanya
Annexin V and PI Apoptosis Kit	Biotium, ABD
24 kuyucuklu ko-kültür plakası,	Corning, ABD
HERAcell 150 Steril CO2 inkübatörü	Thermo Scientific, ABD
Laminer flow kabini	Heal Force, Çin
Masaüstü soğutmalı santrifüj	Eppendorf, Almanya
Hücre sayımı için Cedex XS	Innovatis, ABD
Derin dondurucu buzdolabı	Altus, Türkiye
Hassas terazi	Ohaus, Avustralya
Inverted mikroskop	Leica, Almanya
Mikro santrifüj	Hettich, Almanya
NanoDrop 2000 Spektrofotometre	Thermo Scientific, ABD
Otoklav	Alp, Türkiye
Otomatik pipetler	Eppendorf, Almanya
Su banyosu	Nüve, Türkiye
Vorteks	Daihan, Güney Kore

3.2. Kullanılan Malzemelerin Steril Edilmesi

Cam ve metal malzemeler, çalışmalarda kullanılmak üzere alüminyum folyolara sarılarak sterilizatörde 180°C'de 2 saat boyunca steril edilmiştir. Sıvı solüsyonlar ise otoklavda 121 °C, 1.5 atm/Hg basınçta 20 dakika süresince steril edilmiştir. Kullanılan tüm sıvı kimyasallar, selüloz nitrat filtre kullanılarak steril edilmiştir.

3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.3.1. Stoktan hücre çıkarma ve hücrelerin kültüre alınması

Çalışmamızda SH-SY5Y (neuroblastoma hücre hattı, ATCC kodu CRL-2266TM, U87-MG (glioblastoma; astrocytoma hücre hattı, ATCC kodu HTB-14TM, HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücre hattı, ATCC kodu; CRL-1730TM) ve C6 (sıçan glioma hücre hattı, ATCC kodu CCL-107) hücre hatları, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvar stoklarından canlandırılarak kullanılmıştır. Dondurulmuş hücreler, su banyosunda 37°C sıcaklıkta çözülmesi için suyun tüp içine girmeyecek şekilde hızlı bir şekilde bekletilmiştir.

Hücreler tamamen çözüldükten sonra %10 fetal sığır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren besiyerine aktarılmış ve 5 dakika boyunca 1250 rpm hızında santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra steril kabinde üstteki besiyeri uzaklaştırılmıştır.

Hücreler; steril hücre kültürü odasında mevcut olan, laminar kabin (Heraeus Heraguard HPH9) içinde kültüre edilmiştir. U87MG ve SH-SY5Y hücreleri, Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) besiyeri içinde %10 fetal sığır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren ortamda, C6 hücre hattı ise DMEM (%1 L-glutamin ve %1 sodyum pirüvat içeren) besiyeri içinde %10 fetal sığır serumu(FBS) ve %1 penisilin-streptomisin içeren ortamda, HUVEC hücreleri ise %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin içeren Ham's F-12 Nutrient Mix besiyeri içinde %5 CO₂ ve %95 bağıl nemde 37°C sıcaklıkta kültür ortamında çoğaltılmıştır. Kültür flaskı, hücre yoğunluğu %70-80 olduğunda alt kültürlerle ayrılarak hücrelerin büyümesi sağlanmış ve deneylerde kullanılmıştır.

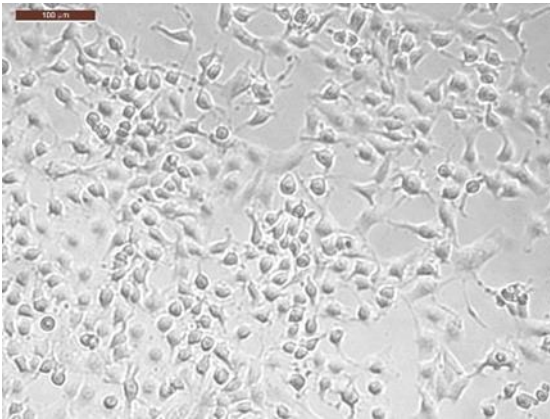
3.3.2. Hücrelerin pasajlanması

Hücreler, yeterli yoğunluğa ulaştıklarında, devamlılığını sağlamak amacıyla pasajlanmıştır. Inkübatörde inkübe edilen hücrelerinin bulunduğu flask, kabin içindeki besiyeri boşaltılmıştır. Flaskın içindeki besiyeri uzaklaştırmak için flask tabanı PBS ile yıkanmıştır. Flasktaki PBS boşaltılmış ve hücrelerin tabandan kalkması için 37°C sıcaklıktaki Tripsin-EDTA eklenerek 3 dakika boyunca etüvde bekletilmiştir. Hücrelerin flask tabanından kalkıp kalkmadığı invert mikroskop kullanılarak kontrol edilmiştir.

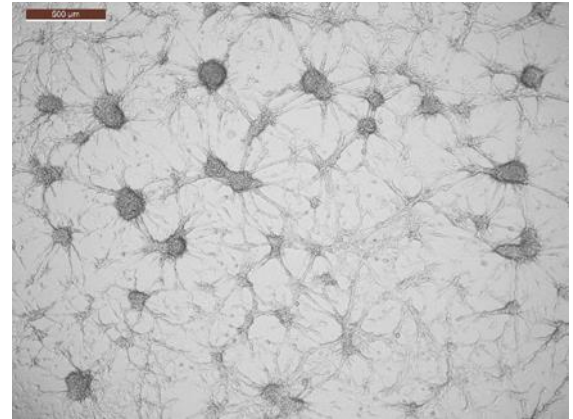
Hücreler flask tabanından kalktığında, hücre-tripsin karışımı 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktararak 1250 rpm hızında 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası dikkatlice süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti, besiyeri ile iyice karıştırıldıktan sonra yeni flakslara ekilmiş ve invert ışık mikroskopunda yoğunluğu kontrol edilmiştir. Ekimi yapılan hücreler tekrar 37°C'de % 5 CO₂ içeren steril inkübatöre yerleştirilmiştir.

3.3.3. Hücre sayımları

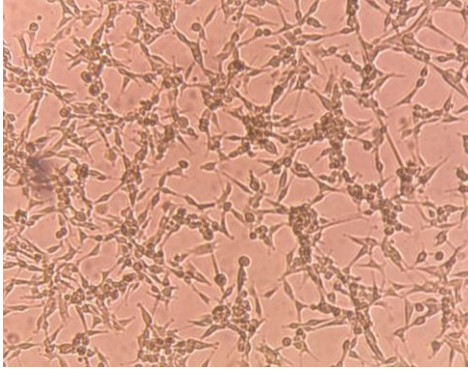
Deneylerimizde kullanılan hücreler, yetiştirildikleri flakslarda yeterli yoğunluğa ulaştıklarında ve deneysel işleme alınacakları zaman hücreler mikroskopta kontrol edildikten sonra steril kabinin içine yerleştirilmiştir. Flaskın üstündeki medyum pipet yardımıyla çekilerek uzaklaştırılmıştır. Ardından, 5 ml PBS eklenmiş ve ağzı kapatılarak flaskanın nazikçe sağa sola hareket ettirilmesiyle hücreler bu şekilde yıkanmıştır. Daha sonra PBS atılmış ve 75 cm²'lik flaska 1 ml tripsin-EDTA konmuş, hücrelerin yapıştıkları flask zemininden kalkmaları için 3 dakika boyunca inkübatörde bekletilmiştir. Tripsinin etkisini nötralize etmek amacıyla, hücrelerin üzerine 5 ml besiyeri ilave edilerek pipetaj yapılmıştır. Besiyeri-hücre karışımı falkon tüpüne alınıp 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında, süpernatant uzaklaştırılarak 1 ml besiyeri hücre pelletine eklenmiş ve ardından tekrar pipetle karıştırılmıştır. Hücre süspansiyonundan alınan 10 µL, bir lamel üzerinde 10 µl Tripan mavisi ile karıştırılmış ve Cedex Smart Slide'a aktararak Cedex XS cihazı kullanılarak 1ml'deki hücre sayısı ve hücrelerin canlılıkları belirlenmiştir.



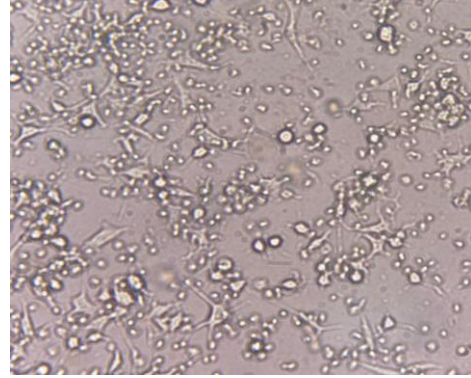
Görsel 3.1. SHSY-5Y hücre hattının mikroskopik görüntüsü (100µm)



Görsel 3.2. U87-MG hücre hattının mikroskopik görüntüsü (100µm)



Görsel 3.3. HUVEC hücre hattının mikroskopik görüntüsü (100µm)



Görsel 3.4. C6 hücre hattının mikroskopik görüntüsü (100µm)

3.4. Kullanılan Maddelerin Hazırlanması

3.4.1. İxazomib

DMSO içinde çözülerek, İxazomib toz formuyla 100 mM konsantrasyonda ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok, alikvatlanarak -80°C’de saklanmıştır. Deneyler için gerekli olan konsantrasyonlar, ana stok solüsyonundan kültür ortamında çeşitli seyreltme işlemleriyle taze olarak hazırlanmıştır.

3.4.2. Fumagillin

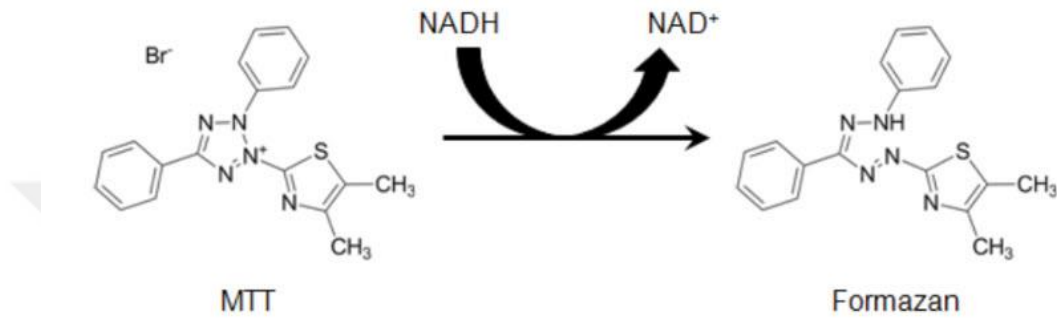
Toz halindeki Fumagillin DMSO içinde çözülerek 20 mM konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok, alikvatlanarak -80°C’de saklanmıştır. Deneyler için gereken konsantrasyonlar, kültür ortamında ana stok solüsyonundan çeşitli seyreltme işlemleri kullanılarak taze olarak hazırlanmıştır.

3.5. MTT Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi

İxazomib ve Fumagillinin hücre hatları üzerindeki konsantrasyona bağlı sitotoksik etkileri, sitotoksisitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemiyle belirlenmiştir (Tolosa vd., 2014).

MTT testi, sarı renkli tetrazolyum tuzunun (MTT) mor renkli, suda çözünmeyen formazana dönüştürülmesine dayanan, toksisite için kantitatif bir kolorimetrik testir. (Magdalena Twarużek vd., 2018) Bu yöntem canlı hücrelerdeki mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Suda çözünür

bir tetrazolyum tuzu olan MTT, mitokondri içindeki süksinat dehidrogenaz tarafından tetrazolyum halkasının bölünmesiyle çözünmeyen bir mor formazana dönüştürülmektedir. Bu, spektrofotometrik olarak belirlenen değerlerin canlı hücre sayısı ile ilişkilendirildiği ve hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edildiği anlamına gelmektedir. (Bacanlı vd., 2017).



Şekil 3.1. Tetrazolyum tuzunun (MTT), suda çözünmeyen formazana dönüştürülmesi (Riss vd.,2016).

C6, HUVEC, U87-MG, SH-SY5Y hücreleri uygun besiyeri ortamında %5 CO₂'li 37°C'lik inkübatörde kültüre alınmıştır. Her bir kuyucukta 5x10³ hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakaya ekilmiş ve hücrelerin plakaya yapışmalarını sağlamak için 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda invert mikroskop altında hücre büyümesinin kontrolü yapılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki medyumlar uzaklaştırılmış ve İxazomib 2.5, 5, 10, 20 µM, Fumagillinin 50, 100 µM konsantrasyonları sırasıyla hücrelere uygulanmıştır. Kontrol olarak da besiyeri içinde %0.1'lük DMSO kullanılmıştır. Hücreler tekrar 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonlar sonunda steril PBS içerisinde hazırlanan stok MTT solüsyonundan (5 mg/mL), MTT çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Plakalardaki besiyeri atılmış ve ardından her bir kuyucuğa taze besiyeri içinde hazırlanan MTT çalışma solüsyonundan 100 µL eklenmiştir. Hücreler, bu işlemin ardından inkübatörde 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda MTT içeren besiyerleri atılarak, her kuyucuğa çözücü olarak 100 µL DMSO pipetlenmiştir. Plakalar, Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader'da 540 dalga boyunda absorbans değerleri, her bir konsantrasyon için 6 tekrar (6 kuyucuk) olacak şekilde okunmuştur. Kontrol kuyularının absorbans

değerleri ortalaması %100 kabul edilmiş ve maddelerin uygulandığı konsantrasyonların % canlılık değerleri hesaplanmıştır.

3.5.1. Kombine konsantrasyonların sinerjistik/sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi

Fumagillin (50, 100 µM) ve İxazomib (2.5, 5, 10, 20 µM) arasındaki sinerjistik / antagonistik etkileşimler MTT analizi ile araştırılmıştır. İxazomib ve Fumagillin kombine uygulamalarında 2.5+50, 5+50, 10+50, 20+50 ve, 2.5+100, 5+100, 10+100, 20+100 µM konsantrasyonlar ile C6, HUVEC, U87-MG, SH-SY5Y hücre hatlarına uygulanmış ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. MTT sonuçlarına göre elde edilen % hücre canlılık değerleri kullanılarak aşağıda açıklanan formüle göre ilaç etkileşim katsayısı (CDI) değerleri hesaplanmış, sinerjistik ve antagonistik etkiler değerlendirilmiştir.

İlaç etkileşiminin katsayısı (CDI) aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Daphu vd., 2015).

$$CDI = [AB / (A \times B)] \times 100$$

AB = kombine uygulanan grubun % hücre canlılığı

A ve B = tek madde için % hücre canlılığı

CDI < 1 sinerjizmi, CDI < 0.7 güçlü sinerjizmi, CDI = 1 additifliği ve CDI > 1 antagonizmi gösterir (Lopez-Acevedo vd., 2014).

3.5.2. İstatistiksel analiz

Deneyler farklı zamanlarda üç tekrarlı bir şekilde gerçekleştirilmiş, her bir deney de kendi içinde yedi tekrarlı olarak çalışılmıştır. MTT sonuçlarına dayanarak hesaplanan % hücre canlılık değerleri, ortalama ± standart sapma değerleriyle çizilen grafiklere yansıtılmıştır. GraphPad Prism 8'de tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak istatistiksel olarak anlamlılıklar belirlenmiştir. Anlamlılık değerleri; p > 0.05 fark yok, *p < 0.05 fark var, **p < 0.01 anlamlı fark var, ***p < 0.001 önemli derecede fark var, ****p < 0.0001 çok önemli derecede fark var olarak değerlendirilmiştir.

3.6. Akış Sitometri Yöntemi ile Apoptotik Etkilerin Belirlemesi

Apoptoz, hücrelerin başlangıçta Annexin- V ve propidium iodide solüsyonu ile boyanması ve ardından akış sitometri analizi ile tespit edilmiştir. Sağlıklı hücrelerin, iç zarda (sitoplazmaya bakan taraf) fosfatidil serini eksprese ettikleri için doğal gereği hidrofobik oldukları ve hücreler apoptoz geçirdiğinde, iç zarın dış zar haline gelmek için

dönerek fosfatidil serin açığa çıkardığı ilkesine dayanır. Açığa çıkan fosfatidil serin, Annexin- V tarafından saptanır ve propidyum iyodür, nekrotik hücreleri boyanmıştır (Lakshmanan ve Batra, 2013).

Annexin V, hücrelerin dış yüzeyinde bulunan fosfatidilserin'e bağlanan bir protein olduğundan, apoptotik hücreler bir floresan madde ile etiketlenerek görünür hale getirilebilmekte. Öte yandan, propidyum iyodür (PI), DNA'ya veya çift sarmallı RNA'ya bağlandığı için, zar yapısı bozulmuş geç apoptotik ve nekrotik hücreleri tespit etmek için kullanılmıştır (Dikmen, 2017; Overbeeke vd., 1998).

Annexin V-FITC (yeşil floresan) ve propidyum iyodür (kırmızı floresan) ile aynı anda boyanmış hücreler, canlı hücrelerin ([Annexin V - /PI -]), erken apoptotik hücrelerin ([Annexin V+ /PI -]), geç apoptotik hücreler ([Annexin V+ / PI +]) ve nekrotik hücreler ([Annexin V- /PI +]) birbirinden ayırt edilmesine izin verilmiştir (Overbeeke vd., 1998).

Çalışmamızda Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Katolog no: 556547, BD) kullanılmıştır ve protokolüne göre çalışılmıştır.

U87MG ve SHSY-5Y hücreleri besiyeri ortamında, 37°C'de %5 CO₂ inkübatöründe kültüre edilmiştir. Hücrelerin yeterince çoğaldıklarında hücre sayımı yapılmıştır ve 6 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde besiyeri ortamında ekilmiştir. Yapışmaları için 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

MTT testinin sonuçlarına göre, DMSO'da hazırlanan İxazomib ve Fumagillin stok çözeltilerinden hücre kültürü ortamında gerekli dilüsyonları yaparak uygun İxazomib (5, 10 µM) ve Fumagillin (50 ve 100 µM) konsantrasyonlarını hazırlanmıştır.

Kuyucuklara kültür ortamında taze hazırlanmış İxazomib ve Fumagillin konsantrasyonları uygulanmış. Kontrol grubundaki hücrelere %0,1 DMSO içeren medyum uygulanmış. Plakalar daha sonra 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda her bir 6'lık kuyucuktaki hücreler kaldırılarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve supernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre peleti 2 ml soğuk PBS ile 2 kez yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra kalan pellet 100 µL PBS ile resuspanse edilerek flow tüpüne aktarılmış, üzerine 5 µL Annexin V ve 5 µL PI ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika inkübasyona bırakılan tüplerin inkübasyon sonunda 250 µL "Annexin V bağlama tamponu" eklenerek 30 dakika içinde akım sitometri cihazında BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer okuması yapılmış ve analizi için BD Accuri™ C6 Plus Software kullanılmıştır.

3.7. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Cihazında Proliferasyon ve Migrasyon Çalışmaları

xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı (RTCA) DP cihazı, Boyden benzeri bir odanın mikro gözenekli polietilen tereftalat (PET) zarının alt tarafına entegre edilmiş mikroelettronik sensörler içeren CIM (hücre sel istila/ göç)-Plaka 16'yı kullanmıştır. Hücreler, kemoatraktana yanıt olarak üst bölmeden zardan alt bölmeye geçerken, zarın alt tarafındaki elektronik sensörlerle temas etmiş ve onlara yapışmış, bu da empedansta bir artışa neden olmuştur. Empedans artışı, zarın alt tarafında artan sayıda taşınan hücre ile ilişkilidir ve empedans değışikliklerini yansıtan hücre indeksi değeri, RTCA DP cihazı tarafından otomatik ve sürekli olarak kaydedilmiştir (Bird ve Kirstein, 2009).

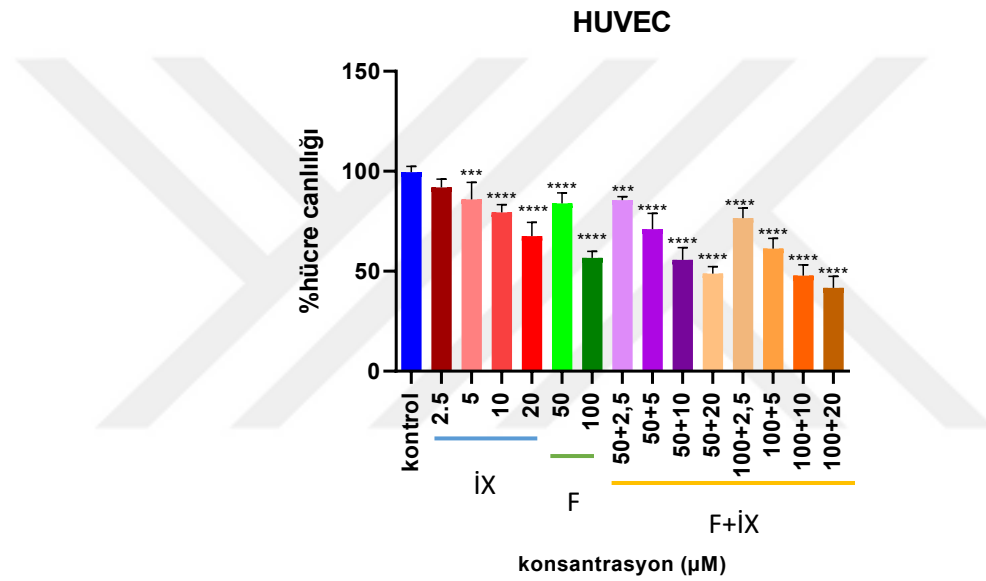
xCELLigence RTCA–DP cihazının CIM-plakalarına 1×10^5 hücre/200 μ l olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin CIM-plakalarına yapışması beklenilmiştir. 72 saat sonra ixozamib 5 μ M, Fumagillin 50 μ M ve bunların kombinasyonu uygunalmış ve 184 saate kadar gerçek zamanlı olarak kimyasalların hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri takip edilmiştir. Hücre migrasyonu üzerindeki etkileri takip edilmek için ise 1×10^5 hücre/200 μ l olacak şekilde CIM-plakalarına ekilmiştir ve yapışmasını beklenilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. İxazomib, Fumagillin Ve Kombinasyonlarının HUVEC U87-MG, C6 Ve SHSY5Y Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Etkilerin Değerlendirilmesi

4.1.1. İxazomib, Fumagillin ve kombinasyonlarının HUVEC hücrelerinde 48 saat sitotoksik etkilerin değerlendirilmesi

HUVEC hücrelerinde İxazomib 2.5, 5, 10, 20 μ M, Fumagillinin 50, 100 μ M konsantrasyonlarının tekli uygulamaları ve İxazomib ve Fumagillin kombin uygulamalarının % hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 4.1’da verilmiştir.



Şekil 4.1.İxazomib ve Fumagillinin tekli ve kombin uygulamalarının % HUVEC hücre canlılığı üzerine etkileri (n=7) (ortalama $\pm$ standart sapma), ****p < 0.0001. (Kontrol: %0.1 dmsö içeren medyum) İX: İxazomib; F: Fumagillin.

İxazomib 2.5, 5, 10, 20 μ M, konsantrasyonlarında HUVEC hücrelerinde 48. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları sırasıyla % 91.95, 85.90, 79.48, 67.56 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre % hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak İxazomib için ***p < 0.0001 olarak anlamlı bulunmuştur.

HUVEC hücrelerinde Fumagillinin 100, 50 μ M, konsantrasyonlarında 48. saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları sırasıyla % 83.89, 56.71;istatistiksel olarak Fumagillin için ****p < 0.0001 olarak anlamlı bulunmuştur.

İxazomib ve Fumagillinin 20, 10, 5, 2.5 μ M, ve 100, 50 μ M konsantrasyonlarının

kombin uygulamalarının HUVEC hücrelerinde 48. saatte yapılan MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılık oranları % 85.54, 71.02, 55.75, 48.79, 76.57, 61.30, 47.79, 41.69 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, ****p < 0.0001 istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir.

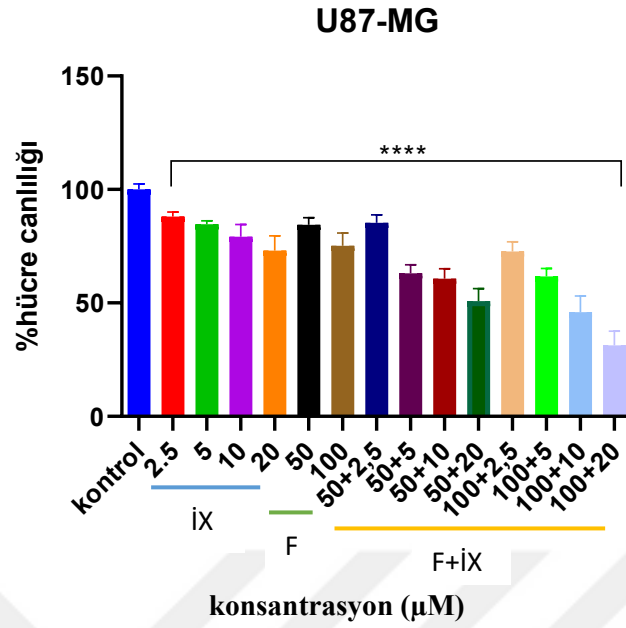
Bu bulgulara göre, İxazomib ve Fumagillin'in hem tek başına hem de kombinasyon halinde HUVEC hücrelerinin canlılığı üzerinde anlamlı olumsuz etkilere neden olduğu sonucuna ulaşılabilmektedir. Hücre canlılığındaki azalma, bu maddelerin test edilen konsantrasyonlarda hücrelere sitotoksik etkileri olabileceğini düşündürmüştür.

Ligerin 18, deniz kaynaklı bir *Penicillium* suşundan izole edilen doğal bir klorlu meroseskiterpenoidtir ve içinde bir epoksi grubu bulundurur. Bu molekül, SaOS-2 ve MG-63 adlı iki insan osteosarkoma hücre hattında ve tümör olmayan insan hücre hattı olan HFF-2'de değerlendirilmiştir. Gomes ve arkadaşları, çalışmalarında, SaOS-2 (IC₅₀ ¼ 137 nM) ve MG-63 (IC₅₀ ¼ 1459 nM) hücrelerine karşı dikkate değer bir sitotoksikite göstermiş, ancak HFF-2 hücreleri üzerinde dört kat daha zayıf bir toksisite sergilemiştir (IC₅₀ > 2300 nM) (Gomes vd., 2020).

Sonuçlar, bortezomibin EMAP II ve gem-sitabin ile tek başına veya kombinasyon halinde hücre proliferasyonunu etkili bir şekilde bastırdığını göstermektedir. Özellikle, HUVEC'lerde bortezomib, proliferasyon üzerinde doza bağlı bir inhibisyon sergilemiştir. Bortezomibin 10 nM, 50 nM ve 1 µM konsantrasyonlarında, proliferasyon inhibisyonu sırasıyla %29, %64 ve %84 olarak gözlenmiştir (Awasthi vd., 2010).

4.1.2. İxazomib, Fumagillin ve kombinasyonlarının U87-MG hücrelerinde 48 saat sitotoksik etkilerin değerlendirilmesi

Şekil 4.2'de U87-MG hücrelerinde İxazomib 2.5, 5, 10, 20 µM, ve Fumagillinin 50 100 µM konsantrasyonlarının tekli ve kombin uygulamalarının % hücre canlılığı üzerine etkileri gösterilmiştir.



Şekil 4.2. İxazomib ve Fumagillinin tekli ve kombin uygulamalarının %U87-MG hücre canlılığı üzerine etkileri (n=7) (ortalama $\pm$ standart sapma), ****p < 0.0001. (Kontrol: %0.1 dmsö içeren medyum) , İX: İxazomib; F: Fumagillin.

İxazomib'in U87-MG hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda (2.5, 5, 10, 20 μ M) 24. saatte yapılan MTT testi sonuçlarına göre, hücre canlılık oranları sırasıyla % 88.09, 84.72, 79.13, 73.02 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, kontrol grubuna kıyasla hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak İxazomib için ****p < 0.0001 düzeyinde anlamlı bulunmuştur.

U87-MG hücrelerinde Fumagillinin 100, 50 μ M konsantrasyonlarında 24. saatte yapılan MTT testi sonuçlarına göre hücre canlılık oranları sırasıyla % 84.42 ve % 75.20 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, Fumagillin için istatistiksel olarak ****p < 0.0001 düzeyinde anlamlı bir fark elde edilmiştir.

İxazomib ve Fumagillinin farklı kombin konsantrasyonlarının (sırasıyla 2.5, 5, 10, 20 μ M ve 50, 100 μ M) U87-MG hücrelerinde 24. saatte yapılan MTT testi sonuçlarına göre, hücre canlılık oranları şu şekildedir: % 85.29, % 63.08, % 60.68, % 50.86, % 72.65, % 61.66, % 45.93, % 31.26. Bu sonuçlara göre, ****p < 0.0001 istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir.

Hem İxazomib hem de Fumagillin, hücre canlılığı üzerinde doza bağımlı bir etkiye sahip olduğunu ve konsantrasyonları arttıkça, hücre canlılığı azaldığını görülmüştür. Ek olarak, farklı konsantrasyonlarda İxazomib ve Fumagillin kombinasyonu da U87-MG

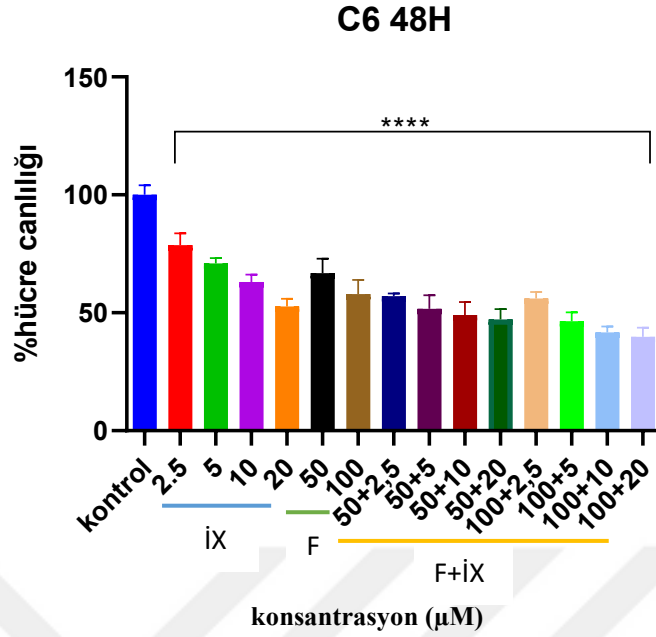
hücre canlılığı üzerinde önemli etkiler göstermiştir. Sonuçlar, bu ilaçların test edilen hücreler üzerinde potansiyel sitotoksik etkilere sahip olduğunu göstermektedir. U87-MG hücrelerinde hem İzazomib hem de Fumagillin için en etkili konsantrasyon, test edilen en yüksek konsantrasyonlarda, İzazomib 20 μ M ve Fumagillin 100 μ M olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonlarda, MTT test sonuçları en düşük hücre canlılığı yüzdelerini (%31.26) göstermiştir.

Pédeboscq vd yaptıkları çalışmada, sitotoksosite, her iki hücre hattında da konsantrasyona bağlı bir eğilim göstermiştir. Bortezomib, DBTRG.05-MG ve U87-MG hücre hatları için sırasıyla 8.152 ± 3.235 nM ve 4.142 ± 0.223 nM IC₅₀ değerlerine sahip yüksek toksisite oluşturulmuştur. Maksimum sitotoksosite U87-MG hücre hattında 10 nM konsantrasyonunda elde edilmiştir, aynı konsantrasyon DBTRG.05-MG hücre hattında yaklaşık %60 sitotoksositeye neden olduğunu ispatlanmıştır (Pédeboscq vd., 2008).

Abu-Izneid ve meslektaşları tarafından yürütülen araştırma, bitki savunma mekanizmalarında sesküiterpenlerin ve türevlerinin önemini vurgulamaktadır. Bu bileşenler, antifungal, antibakteriyel ve antiviral özellikleri ile tanınır. Çalışma özellikle glioma hücrelerine odaklanmış olup β -elemene konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak 24 saatlik bir süre içinde IC₅₀ değeri $48.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ olan sitotoksosite gözlemlenmiştir. β -elemene'nin G0/G1 fazında hücre döngüsü durmasına neden olduğu ve apoptotik çekirdek morfolojik özelliklerinde değişikliklere yol açtığı belirlenmiştir. Bu bilgiler, kanser araştırmaları bağlamında sesküiterpenlerin potansiyel terapötik etkilerini vurgularken, hücre davranışı ve hayatta kalma yolları üzerindeki etkilerini ortaya koymaktadır (Abu-Izneid vd, 2020).

4.1.3. İzazomib, Fumagillin ve kombinasyonlarının C6 hücrelerinde 48 saat sitotoksik etkilerin değerlendirilmesi

Şekil 4.4'te İzazomib 2.5, 5, 10, 20 μ M, ve Fumagillinin 50, 100 μ M konsantrasyonlarının tekli ve kombin uygulamalarının C6 hücre hattının % hücre canlılığı üzerine etkileri gösterilmiştir.



Şekil 4.3. İxazomib ve Fumagillinin tekli ve kombin uygulamalarının %C6 hücre canlılığı üzerine etkileri ($n=7$) (ortalama $\pm$ standart sapma), **** $p < 0.0001$, (Kontrol: %0.1 dmsö içeren medyum), İX: İxazomib; F: Fumagillin.

İxazomib'in 2.5, 5, 10, 20 μM konsantrasyonlarında C6 hücrelerinde 48. saatte yapılan MTT testi sonuçlarına göre, hücre canlılık oranları sırasıyla %78.66, 70.99, 63.07, 52.72 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, kontrol grubuna kıyasla hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak İxazomib için **** $p < 0.0001$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur.

Fumagillinin 100 μM ve 50 μM konsantrasyonlarında C6 hücrelerinde 48. saatte yapılan MTT testi sonuçlarına göre hücre canlılık oranları sırasıyla %57.93, 57.06 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark **** $p < 0.0001$ elde edildiğini gösterilmiştir.

İxazomib ve Fumagillinin farklı kombinasyon konsantrasyonlarının (sırasıyla 2.5, 5, 10, 20 μM ve 50, 100 μM) C6 hücrelerinde 24. saatte yapılan MTT testi sonuçlarına göre, hücre canlılık oranları: %57.06, 51.72, 49.09, 47.18, 56.12, 50.81, 46.39, 41.68, 39.75 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre % hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak kombin uygulaması için **** $p < 0.0001$ olarak anlamlı bulunmuştur

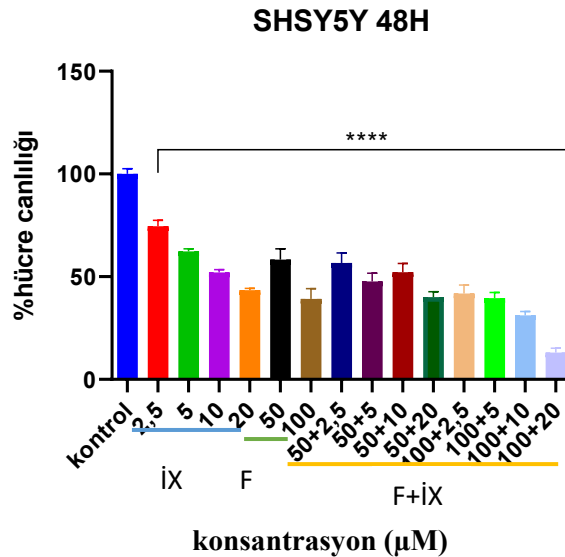
İxazomib ve Fumagillinin tekli uygulamalarında doza bağımlı sitotoksik etkilerinde bir artış görülmüştür, İxazomib 20 μM ve Fumagillin 100 μM en etkili konsantrasyonları olarak bulunmuştur. Benzer şekilde kombin uygulamalarında İxazomib 20 μM ve

Fumagillin 100 μ M konsantrasyonlarının hücre canlılığını en yüksek seviyede inhibe ettiğini gösterilmiştir.

Miriş Dikmen tarafından yürütülen araştırmadan alınan bu alıntı, C6 hücrelerindeki Fumagillin konsantrasyonlarının sitotoksik etkilerini vurgular. Değerlendirme, 48 saatlik bir inkübasyon süresinden sonra MTT testi kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar, kontrol grubuna kıyasla, Fumagillinin 50, 75 ve 100 μ M konsantrasyonlarında neredeyse iki katına yakın bir azalma ve daha fazla mitokondrial aktivitenin gözlemlendiğini gösterdi. Ayrıca, morfolojik incelemelerle, sitotoksik etkisine bağlı olarak hücre proliferasyonunun Fumagillin konsantrasyonunun artmasıyla orantılı olarak azaldığı gözlemlendi. Bu durum, sitotoksik etki ile hücre proliferasyonunun inhibisyonu arasındaki açık bir ilişkiyi göstermektedir (Dikmen, 2015).

4.1.4. İxazomib, Fumagillin ve kombinasyonlarının SHSY-5Y hücrelerinde 48 saat sitotoksik etkilerin değerlendirilmesi

Şekil 4.6' te SHSY5Y hücrelerinde İxazomib 20, 10, 5, 2.5 μ M, ve Fumagillinin 100, 50 μ M konsantrasyonlarının tekli ve kombin uygulamalarının % hücre canlılığı üzerine etkileri gösterilmiştir.



Şekil 4.4. İxazomib ve Fumagillinin tekli ve kombin uygulamalarının %SHSY-5Y hücre canlılığı üzerine etkileri ($n=7$) (ortalama $\pm$ standart sapma), **** $p < 0.0001$, (Kontrol: %0.1 dmsö içeren medyum), İX: İxazomib; F: Fumagillin.

İxazomib'in 2.5, 5, 10, 20 μ M konsantrasyonlarında SHSY-5Y hücrelerinde 48. saatte yapılan MTT testi sonuçlarına göre, hücre canlılık oranları sırasıyla %74.60, 62.25,

52.09, 43.44 olarak belirlenmiştir. Hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak İxazomib için **** $p < 0.0001$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur.

Fumagillinin 100 μ M ve 50 μ M konsantrasyonlarında SHSY-5Y hücrelerinde 48. saatte yapılan MTT testi sonuçlarına göre hücre canlılık oranları sırasıyla %58.32, 39.23 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak **** $p < 0.0001$ anlamlı bir fark elde edildiğini gösterilmiştir.

İxazomib ve Fumagillinin farklı kombinasyon konsantrasyonlarının (sırasıyla 2.5, 5, 10, 20 μ M ve 50, 100 μ M) SHSY-5Y hücrelerinde 48. saatte yapılan MTT testi sonuçlarına göre, hücre canlılık oranları: %56.68, 47.70, 52.15, 40.07, 41.86, 39.62, 31.23, 13.03 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre % hücre canlılık oranlarındaki azalma istatistiksel olarak kombin uygulaması için **** $p < 0.0001$ olarak anlamlı bulunmuştur

İxazomib'in tek başına uygulaması en etkili konsantrasyonun 20 μ M olduğu göstermiştir. Fumagillin'in en yüksek konsantrasyonu olan 100 μ M tekli uygulamalarına hücre canlılığını en fazla etkilediğini ortaya çıkmıştır. Ancak, İxazomib ve Fumagillin'in 20 μ M ve 100 μ M'lik konsantrasyonları bir araya getirildiğinde, kombinasyon uygulamasının hücre canlılığını önemli bir şekilde azalttığı belirlenmiştir.

Çalışmalarında, Brignole vd. (2006), kültüre edilmiş nöroblastoma hücrelerinin canlılığına bortezomibin etkisini trypan mavisi boyama yöntemiyle araştırdık. LAN-1, SK-NBE2c, SH-SY5Y, IMR-32 ve GI-LI-N olmak üzere beş farklı nöroblastoma hücre hattını 72 saat boyunca çeşitli bortezomib konsantrasyonlarına maruz bıraktık ve canlılıklarını değerlendirdik. Sonuçlar, doza bağlı bir sitotoksik etki gösterdi ve özellikle SH-SY5Y hücrelerinde 20 nM bortezomib dozunda neredeyse %100 trypan mavisi pozitif (ölü) hücreler tespit edilmiştir. Geri kalan dört nöroblastoma hücre hattı için benzer sonuçlar elde edildi. Bu bulgu, bortezomibin farklı nöroblastoma hücre hatlarında önemli bir sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermekte olup, nöroblastoma tedavisinde terapotik bir ajan olarak potansiyelini işaret etmektedir (Brignole vd, 2006).

4.2. İxazomibin Fumagillin ve Kombinasyonlarının HUVEC, U87-MG, C6 ve SHSY5Y Hücreleri Üzerinde Sinerjistik/Antagonistik Etkilerinin Değerlendirilmesi

HUVEC, U87-MG, C6 ve SHSY5Y hücre hatlarına 20, 10, 5, 2.5 μ M, ve 100, 50 μ M konsantrasyonlardaki, İxazomib ve Fumagillin kombin uygulamalarının 24. ve 48. saat MTT absorbans sonuçlarına dayanarak hesaplanan % hücre canlılık değerleri

kullanılarak CDI değerleri elde edilmiş ve sinerjistik ile antagonistik etkiler değerlendirilmiştir (Tablo 4.1-4.4).

CDI < 1 sinerjistik, CDI < 0.7 güçlü sinerjistik, CDI = 1 additif ve CDI > 1 antagonistik etkiyi ifade etmektedir (Lopez-Acevedo vd., 2014).

Tablo. 4.1. HUVEC hücrelerine İxazomib, Fumagillin tekli ve kombin uygulamalarının 48 saat için hücre canlılık (%) oranları (ortalama ± standart sapma) ve CDI değerleri. (Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı.)

Konsantrasyon (μM)	İxazomib (% Hücre Canlılığı)	Fumagillin (% Hücre Canlılığı)	İxazomib + Fumagillin (% Hücre Canlılığı)	CDI
2.5	91.95 ± 3.79			
5	85.90 ± 7.61			
10	79.48 ± 3.53			
20	67.56 ± 6.32			
50		83.89 ± 4.77		
100		56.71 ± 1.83		
2.5+50			85.54 ± 1.66	1.10
5+50			71.02 ± 7.22	0.98
10+50			55.75 ± 5.51	0.84
20+50			48.79 ± 3.24	0.73
2.5+100			76.57 ± 4.06	1.46
5+100			61.30 ± 4.64	1.25
10+100			47.79 ± 4.83	1.06
20+100			41.69 ± 5.17	1.08

Tablo 4.1.'daki sonuçlarına göre İxazomib ve Fumagillin'in farklı konsantrasyonları arasında hesaplamalar sonucunda sinerjistik veya antagonistik etkiler ortaya çıkmıştır.İxazomib'in düşük konsantrasyonları (2,5 μM ve 5 μM) ile Fumagillin'in yüksek konsantrasyonları (50 μM ve 100 μM) arasında sinerjistik etkiler gözlenmiştir. Bu durum, İxazomib ve Fumagillin'in birlikte kullanıldığında, kanser hücrelerine karşı daha etkili bir terapötik etki sağladığına işaret edilmiştir.

Ancak, dikkat çekici bir bulgu olarak, İxazomib konsantrasyonunun sabit tutulduğu ve Fumagillin konsantrasyonunun iki katına çıkarıldığı durumda, tüm vakalarda antagonizm gözlenmiştir.

Bu sonuçlar, İxazomib ve Fumagillin kombinasyonunun etkileşiminin konsantrasyonlara bağlı olarak önemli ölçüde değişebileceğini göstermektedir. Bu nedenle, bu ilaçların birlikte kullanımının terapötik etkisi için uygun konsantrasyonların dikkatli bir şekilde ayarlanması gereklidir. Bu çalışmanın bulguları, kanser tedavisinde ilaç kombinasyonlarının etkisini anlamak ve optimize etmek için önemli bir temel oluşturabilir.

Tablo. 4.2. U87-MG hücrelerine İxazomib, Fumagillin tekli ve kombin uygulamalarının 48 saat için hücre canlılık (%) oranları (ortalama $\pm$ standart sapma) ve CDI değerleri. (Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı.)

Konsantrasyon (μ M)	İxazomib (% Hücre Canlılığı)	Fumagillin (% Hücre Canlılığı)	İxazomib + Fumagillin (% Hücre Canlılığı)	CDI
2.5	88.09 $\pm$ 1.78			
5	84.72 $\pm$ 1.24			
10	79.13 $\pm$ 4.47			
20	73.02 $\pm$ 5.51			
50		84.41 $\pm$ 2.52		
100		75.20 $\pm$ 5.05		
2.5+50			85.28 $\pm$ 2.42	1.14
5+50			63.07 $\pm$ 1.51	0.88
10+50			60.68 $\pm$ 3.96	0.90
20+50			50.85 $\pm$ 3.54	0.82
2.5+100			72.64 $\pm$ 3.68	1.09
5+100			61.65 $\pm$ 3.14	0.96
10+100			45.92 $\pm$ 6.11	0.77
20+100			31.25 $\pm$ 5.63	0.56

Tablo 4.2'deki sonuçlarına göre İxazomib ve Fumagillin'in farklı konsantrasyonlarının kombinasyonunun etkileri incelenmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda, bazı konsantrasyonlarda sinerjistik veya additif etkilerin gözlemlendiği belirlenmiştir.

İxazomib (20 μ M) + Fumagillin (100 μ M) ve İxazomib (10 μ M) + Fumagillin (100 μ M) konsantrasyonlarında güçlü sinerjistik etkiler tespit edilmiştir. Bu durum, her iki ilacın bir arada kullanılmasıyla beklenenden daha güçlü bir etkinin elde edilebileceğini göstermektedir.

Öte yandan, İxazomib (2.5 μ M) + Fumagillin (50 μ M) ve İxazomib (2.5 μ M) + Fumagillin (100 μ M) konsantrasyonlarındaki additif etkiler, ilaçların birleşik kullanımının yalnızca ilaçların tek başına kullanımından eşit bir etki sağlayabileceğini göstermiştir.

Ayrıca, İxazomib (5 μ M) + Fumagillin (50 μ M) ve İxazomib (20 μ M) + Fumagillin (50 μ M) konsantrasyonları ise güçlü sinerjistik etkiler göstermiştir.

Elde edilen bulgular, doğru konsantrasyonların belirlenmesiyle bu tür kombinasyon tedavilerinin başarılı bir şekilde kullanılabileceğini ve hastalık tedavisindeki etkinliği artırabileceğini göstermektedir.

Tablo. 4.3. C6 hücrelerine İxazomib, Fumagillin tekli ve kombin uygulamalarının 48 saat için hücre canlılık (%) oranları (ortalama $\pm$ standart sapma) ve CDI değerleri. (Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı.)

Konsantrasyon (μ M)	İxazomib (% Hücre Canlılığı)	Fumagillin (% Hücre Canlılığı)	İxazomib + Fumagillin (% Hücre Canlılığı)	CDI
2,5	78.95 $\pm$ 1.38			
5	76.75 $\pm$ 1.12			
10	72.33 $\pm$ 5.88			
20	59.85 $\pm$ 2.63			
50		81.50 $\pm$ 2.92		
100		68.02 $\pm$ 1.78		
2.5+50			78.58 $\pm$ 2.12	1.22
5+50			71.86 $\pm$ 4.27	1.14
10+50			61.38 $\pm$ 2.62	1.04
20+50			55.12 $\pm$ 5.67	1.13
2.5+100			70.97 $\pm$ 2.84	1.32
5+100			63.86 $\pm$ 5.33	1.22
10+100			51.97 $\pm$ 5.25	1.05
20+100			46.67 $\pm$ 5.19	1.14

İxazomib ve Fumagillin'in farklı konsantrasyonlarının C6 hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, ilaçların bir arada kullanıldığı belirli konsantrasyonlarda sinerjistik veya antagonistik etkilerin gözlemlendiği tespit edilmiştir.

Genel olarak, elde edilen sonuçlar, İxazomib + Fumagillin kombinasyonunun C6 hücreleri üzerinde 48 saatlik inkübasyon süresinin ardından antagonist bir etki sergilediğini gösterilmiştir.

Öte yandan, İxazomib (2,5 μ M) + Fumagillin (50 μ M) ve İxazomib (5 μ M) + Fumagillin (50 μ M) konsantrasyonlarında additif etkiler tespit edilmiştir. Her bir maddenin ayrı ayrı ürettiği etkilerin toplamının, maddelerin birlikte kullanılmasıyla elde edilen etkiye eşit olduğunu düşünülmüştür.

Tablo. 4.4. SHSY5Y hücrelerine İxazomib, Fumagillin tekli ve kombin uygulamalarının 48 saat için hücre canlılık (%) oranları (ortalama $\pm$ standart sapma) ve CDI değerleri. (Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı.)

Konsantrasyon (μ M)	İxazomib (% Hücre Canlılığı)	Fumagillin (% Hücre Canlılığı)	İxazomib + Fumagillin (% Hücre Canlılığı)	CDI
2.5	74.59 $\pm$ 2.31			
5	62.25 $\pm$ 1.02			
10	52.09 $\pm$ 1.06			
20	43.43 $\pm$ 0.73			
50		58.31 $\pm$ 4.80		
100		39.22 $\pm$ 4.02		
2.5+50			55.01 $\pm$ 4.13	1.26
5+50			47.70 $\pm$ 1.31	1.31
10+50			52.15 $\pm$ 3.98	1.71
20+50			40.06 $\pm$ 2.46	1.58
2.5+100			41.86 $\pm$ 3.73	1.43
5+100			39.62 $\pm$ 2.14	1.62
10+100			31.22 $\pm$ 1.68	1.52
20+100			13.02 $\pm$ 1.98	0.76

Tablo 4.4. sonuçlarına göre İxazomib ve Fumagillin kombinasyonunun test edilen çoğu konsantrasyonda SHSY5Y hücreleri üzerinde ağırlıklı olarak antagonistik etkilerini ortaya koyduğunu göstermiştir.

Ancak en yüksek konsantrasyonda (20 μ M İxazomib + 100 μ M Fumagillin) güçlü bir sinerjistik etki gözlemlenmiştir. 0.76'lık CDI değeri, birleşik etkinin, bireysel etkilere dayalı olarak beklenenden daha büyük olduğunu göstermiştir; bu, olumlu bir etkileşim ve SHSY5Y hücrelerinin baskılanmasında potansiyel olarak artırılmış etkinlik anlamına geldiğini öne sürülmüştür.

SHSY5Y hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda kombinasyona değişen tepkisine katkıda bulunan altta yatan faktörlerin araştırılması önemlidir. Ek olarak, antagonizmayı en aza indirirken sinerjistik etkileri destekleyen ideal konsantrasyon aralığını belirlemek için dozlama rejimini optimize etmek önemli olduğunu düşünülmüştür.

48 saat sonuçları karşılaştırıldığında, kombinasyonun en yüksek dozlarında antagonistik etkisinin zaman içinde güçlü sinerjistik etkisine dönüştürüldüğünü gözlenmiştir.

Wang ve arkadaşlarının (2022) araştırmasındaki sonuçlar, İxazomib, ESCC hücre dizilerinde CCK-8 tahlili ile ölçüldüğü üzere mükemmel çoğalma önleyici aktivite sergilediğini gösterdi. 1 mM İxazomib ile tedavi, KYSE150, KYSE510 ve KYSE520 için sırasıyla 24 saatte %40,3, %27,4 ve %13,5 ve 48 saatte %72,5, %50,1 ve %37,4 oranında hücre canlılığını inhibe etti (tümü için $P < 0,05$), ancak hücre canlılığının inhibisyonu TE1 hücre dizilerinde diğer hücre dizilerine göre biraz daha

zayıftı. Ve KYSE150, KYSE510, KYSE520 ve TE1 hücre hattı için sırasıyla 0,85, 2,63, 10,61 ve 42,27 mM'de IC50 değeri ile. Apoptotik tahlillerde, 0,25–1 mM'de İxazomib ile tedavi edilen Kyse150 ve Kyse510 hücreleri, Annexin V-pozitif hücre popülasyonlarını doza bağlı bir şekilde artırdı (Wang, vd 2022).

Li vd. (2016) NB hücrelerinde, İxazomib'in yalnızca apoptozu indükleyerek değil, aynı zamanda dox altı insan NB hücre dizilerinin (IMR- 32, NGP, NB-19, SH-SY5Y, SK-N-AS ve kemorezistan LA-N-6 hücre dizisi) artan dozlarda İxazomib ile tedavi edildi. İnhibitöre 72 saat maruz kaldıktan sonra, hücrelerin canlılıkları ölçüldü, IMR-32, 2.68'lik bir IC50, NGP IC50 7.84, NB-19 IC50 9.69, SHSY5Y IC50 0.17, SKnAS IC50 2.00 ve LAN6 IC50 40.13 μ M ile sonuçlandı (Li vd., 2016).

4.3. Apoptik etkinin, akış sitometride AnnexinV-PI yöntemi ile değerlendirilmesi.

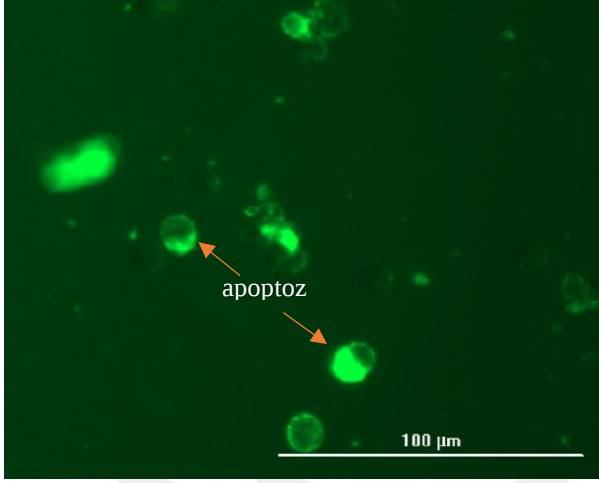
Annexin V ve PI boyama kombinasyonu, PS ve PI boyamasının varlığına veya yokluğuna bağlı olarak dört farklı hücre popülasyonunun tanımlanmasına olanak tanır:

- Annexin V-/PI-: canlı hücreler
- Annexin V+/PI-: erken apoptotik hücreler
- Annexin V+/PI+: geç apoptotik veya nekrotik hücreler
- Annexin V-/PI+: nekrotik hücreler

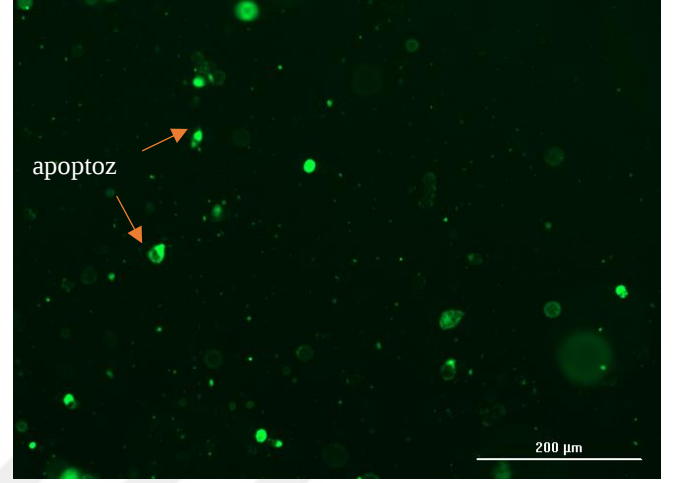
SHSY-S5 hücreleri üzerindeki İxazomib ve Fumagillin'in 5, 10 ve 50, 100 μ M konsantrasyonlarının 48. saatlerdeki , akış sitometri analiz sonuçları Tablo 4.5. ve 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.6. ve 4.8'de U87-MG hücreleri üzerindeki İxazomib 5, 10 μ M ve Fumagillin'in 50, 100 μ M konsantrasyonlarının 48. saatlerdeki, akış sitometri analiz sonuçları verilmiştir. Tablo 4.7. ve 4.8.'de görüldüğü üzere, nekroz (Q1), erken apoptoz (Q4), geç apoptoz (Q2) ve canlı hücreler (Q3) olmak üzere dört hücre grubu analiz edilmiştir.

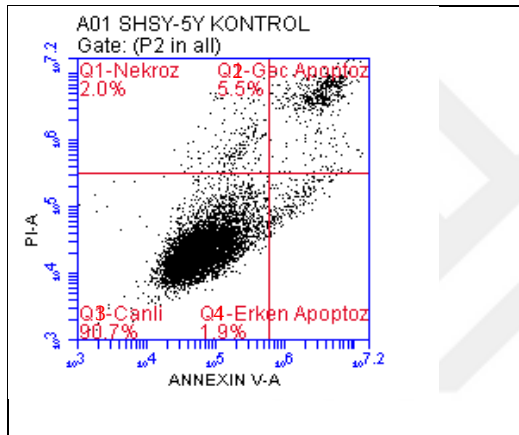
Kontrol grubu (%0.1 DMSO), yüksek yüzdelerde canlı hücrelere (Q3) ve düşük yüzdelerde nekrotik hücrelere (Q1) ve apoptotik hücrelere (Q4 ve Q2) sahiptir.



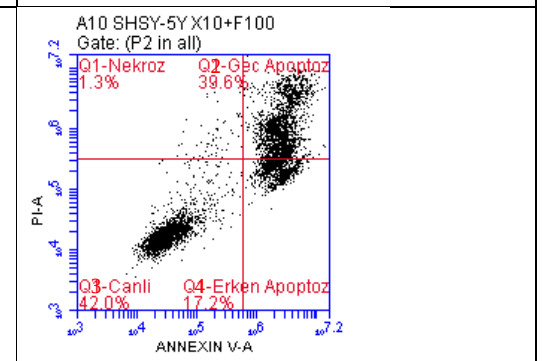
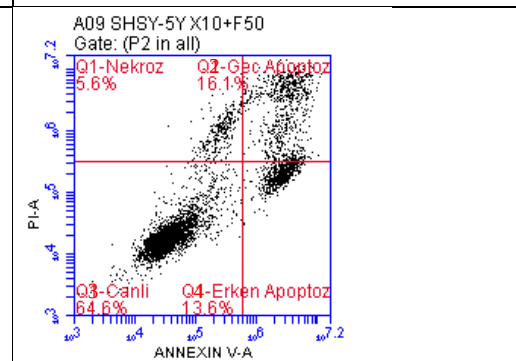
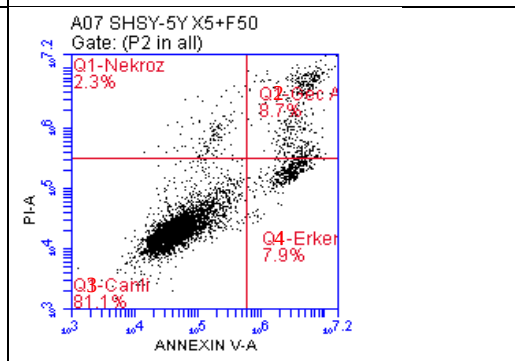
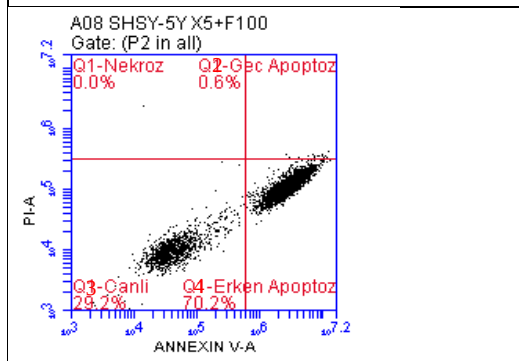
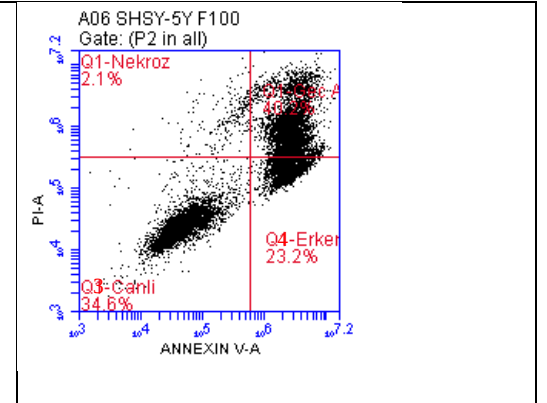
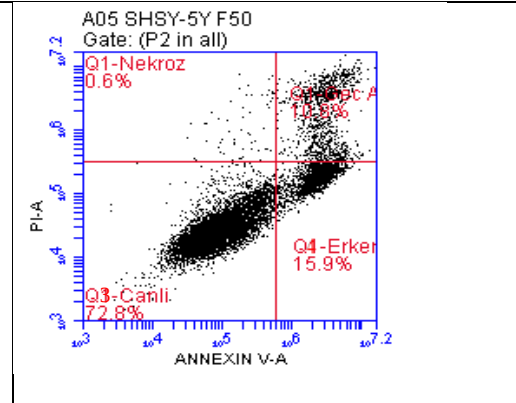
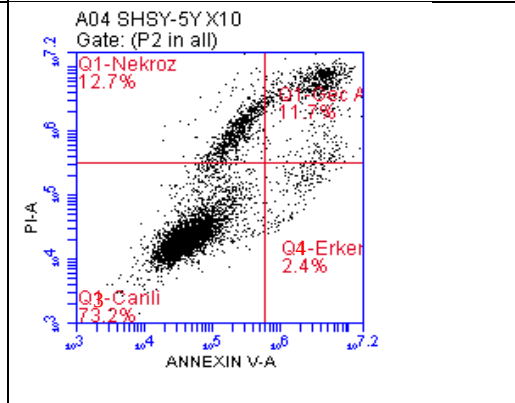
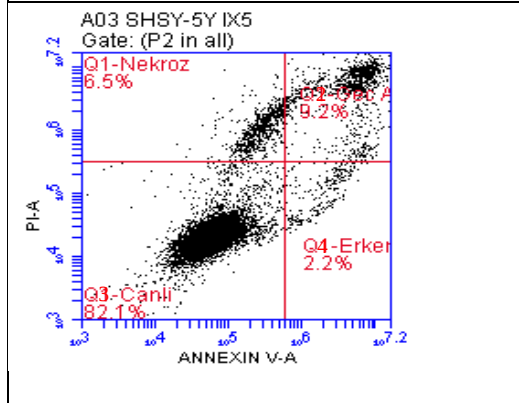
Görsel 4.1. Apoptotik SHSY-5Y hücrelerinin 48.saat mikroskopik görüntüsü (100µ).

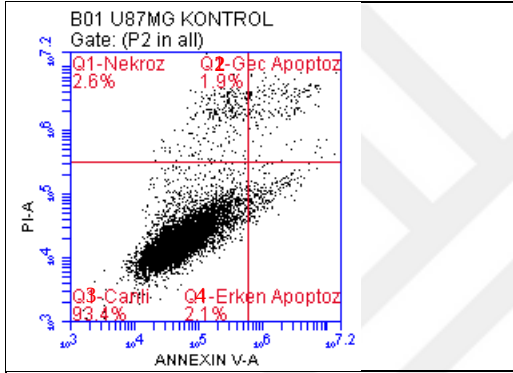


Görsel 4.2. Apoptotik U87-MG hücrelerinin mikroskopik görüntüsü. 48. saat (200µ) 4X

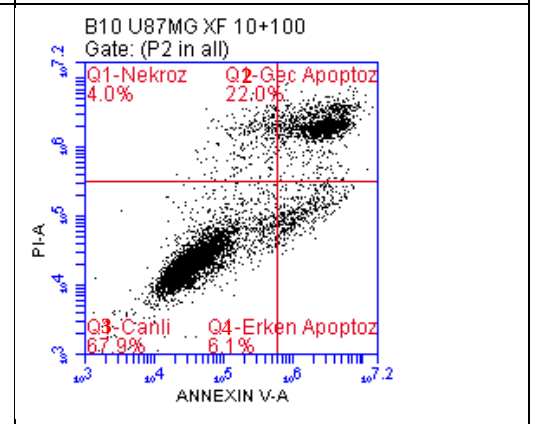
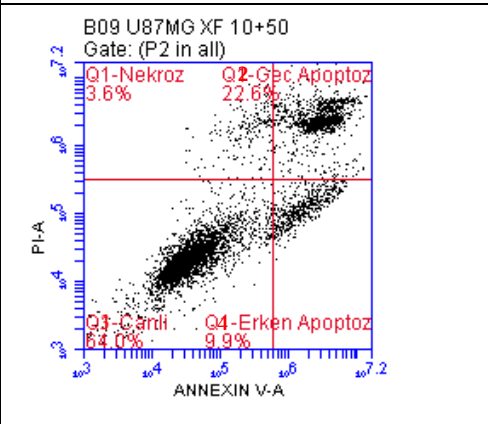
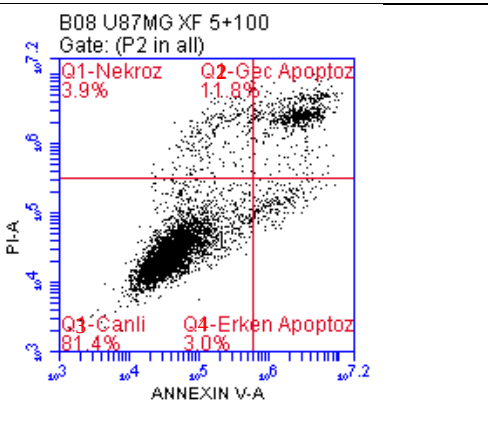
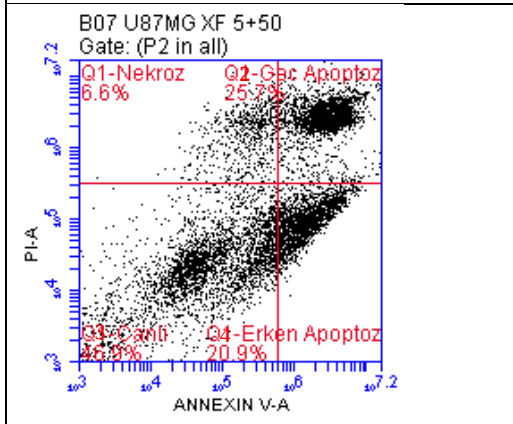
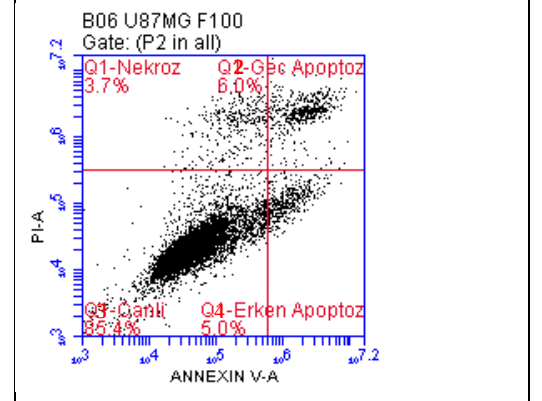
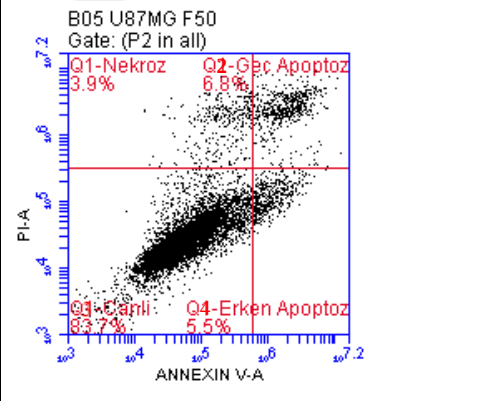
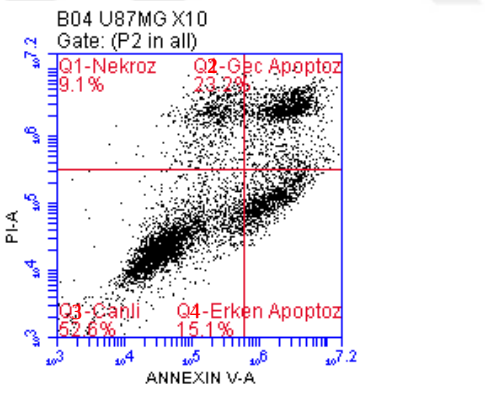
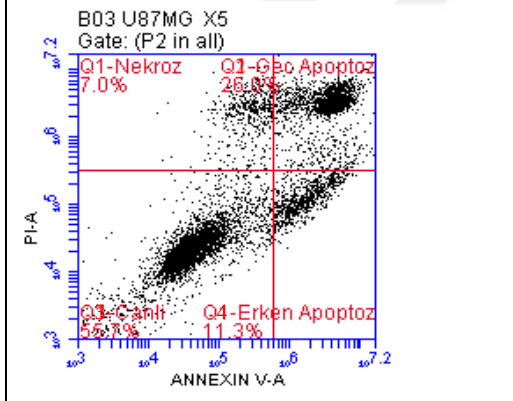


Şekil 4.5. İxazomib (5, 10 μ M) ve Fumagillin (50, 100 μ M) konsantrasyonlarının ve kombinasyonlarının (5+;50, 5+100, 10+50, 10+100 μ M) SHSY-S5 Hücrelerinde 48 Saatteki Apoptotik Etkileri





Şekil 4.6. İxazomib (5, 10 μ M) ve Fumagillin (50, 100 μ M) konsantrasyonlarının ve kombinasyonlarının (5+50, 5+100, 10+50, 10+100 μ M) U87-MG Hücrelerinde 48 Saatteki Apoptotik Etkileri



Tablo. 4.7. SHSY-5Y hücre hattı üzerinde İxazomib ve Fumagillin'in akış sitometride 48 saatlik Annexin V-PI apoptoz sonuçları

SHSY-5Y hücrelerine uygulanan konsantrasyonlar (µM)		48. Saat			
		Canlı hücre % (Q3)	Nekrotik hücre % (Q1)	Erken Apoptotik hücre % (Q4)	Geç Apoptotik hücre % (Q2)
Kontrol (0,1% DMSO)		90.7	2.0	1.9	5.5
İxazomib	5	82.1	6.5	2.2	9.2
	10	73.2	12.7	2.4	11.7
Fumagillin	50	72.8	0.6	15.9	10.8
	100	34.6	2.1	23.2	40.2
İxazomib ve Fumagillin kombinasyon	5 + 50	81.1	2.3	7.9	8.7
	5 + 100	29.2	0.0	70.2	0.6
	10 + 50	64.6	5.6	13.6	16.1
	10 + 100	42.0	1.3	17.2	39.6

Tablo 4.7.'deki sonuçlara göre, İxazomib'in SHSY-5Y hücresi üzerinde 48. saatteki erken apoptotik hücre değerleri, 5 ve 10 µM konsantrasyonlarda sırasıyla; %2.2, 2.4 ve geç apoptotik değerlerin ise %9.2 ve 11.7 olarak belirlenmiştir.

Fumagillin'in SHSY-5Y hücresi üzerinde 48. saatteki erken apoptotik hücre değerleride 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda sırasıyla; %15.9, 23.2 ve geç apoptotik değerleri de %10.8 ve 40.2 olduğu analiz edilmiştir.

İxazomib ve Fumagillin kombinasyonlarının SHSY-5Y hücresi üzerinde 48. saatteki erken apoptik hücre değerleri 5+50, 5+100, 10+50, 10+100 µM konsantrasyonlarda sırasıyla; %7.9, 70.2, 13.6, 17.2 ; geç apoptotik değerleri de %8.7, 0.6, 16.1, 39.6 olarak belirlenmiştir. İxazomibin ve Fumagillinin konsantrasyon artışına bağlı olarak SHSY-5Y hücrelerinde apoptotik hücre oranları artış göstermiştir. Fumagillin konsantrasyonlarının apoptotik etkisi İxazomib in apoptotik etkilerinden daha yüksek değerde bulunmuştur. İki maddenin kombin uygulamalarında ise İxazomib 5+ Fumagillin 50 µM 'da erken apoptotik hücre oranı %70.2 olup, en yüksek değerde belirlenmiştir. Özellikle kombin uygulamalarda İxazomib düşük konsantrasyon ile Fumagillin yüksek konsantrasyonda erken apoptotik hücreler artarken, İxazomib ve Fumagillin yüksek konsantrasyonlarının kombin uygulamalarında geç apoptotik hücrelerin arttığı görülmüştür.

İxazomib ve Fumagillin'in SHSY-5Y hücrelerinde farklı hücre ölümü türlerini indükleyebileceğini ve bunların kombinasyonlarının sinerjistik bir etkiye yol açabileceğini gösterilmiştir.

Tablo. 4.8. U87-MG hücre hattı üzerinde İxazomib ve Fumagillin'in akış sitometride 48 saatlik Annexin V-PI apoptoz sonuçları

U87-MG hücrelerine uygulanan Konsantrasyonlar (µM)		Canlı hücre % (Q3)	Nekrotik hücre % (Q1)	48. Saat Erken Apoptotik hücre % (Q4)	Geç Apoptotik hücre % (Q2)
Kontrol (0,1% DMSO)		93.4	2.6	2.1	1.9
İxazomib	5	55.7	7.0	11.3	26.0
	10	52.6	9.1	15.1	23.2
Fumagillin	50	83.7	3.9	5.5	6.8
	100	85.4	3.7	5.0	6.0
İxazomib ve Fumagillin kombinasyon	5 + 50	46.9	6.6	20.9	25.7
	5 + 100	81.4	3.9	3.0	11.8
	10 + 50	64.0	3.6	9.9	22.6
	10 + 100	67.9	4.0	6.1	22.0

Tablo 4.8'deki sonuçlara göre, İxazomib'in U87-MG hücresi üzerinde 48. saatteki erken apoptotik etkisi 5 ve 10 µM konsantrasyonlarda sırasıyla; %11.3, 15.1 ve geç apoptotik değerlerin ise %26.0, 23.2 olduğu analiz edilmiştir. Fumagillin'in U87-MG hücresi üzerinde 48. saatteki erken apoptotik etkisi 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda sırasıyla; %5.5, 5.0 ve geç apoptotik değerlerin ise %6.8, 6.0 olarak belirlenmiştir.

İxazomib ve Fumagillin kombinasyonunun U87-MG hücresi üzerinde 48. saatteki erken apoptotik etkisi 5+50, 5+100, 10+50, 10+100 µM konsantrasyonlarda değerleri sırasıyla; %20.9, 3.0, 9.9, 6.1 ve geç apoptotik değerlerin ise %25.7, 11.8, 22.6, 22.0 olduğu analiz edilmiştir.

U87 hücrelerinde İxazomibin Fumagilline göre hem erken apoptotik hemde geç apoptotik etkisi daha fazla bulunmuş. apoptotik etkide en etkili sonuç kombin uygulamada 5+50 konsantrasyonda olup, erken apoptoz oranı %20.9 ve geç apoptoz hücre oranı %25.7 bulunmuştur. İxazomib konsantrasyonu arttıkça, canlı hücrelerin yüzdesi azalırken apoptotik hücrelerin yüzdesi (hem erken hem de geç) artırıldığını görülmüştür. Bu eğilim, İxazomib'in bilinen etki mekanizmasıyla uyumlu olduğunu ıspatlanmıştır. Fumagillin kontrole kıyasla geç apoptotik hücrelerin yüzdesinde artış gösterirken, canlı hücrelerin yüzdesi azaldığını göstermiştir. Bu, Fumagillin'in esas olarak geç apoptoz yoluyla hücre ölümünü indüklediğini düşünülmüştür. Genel olarak, veriler hem İxazomib hem de Fumagillin'in U87-MG hücrelerinde apoptozu indükleyebileceğini ve bunların kombinasyonunun bu etkiyi konsantrasyona bağlı değiştirebileceğini gösterilmiştir.

C6 ve U87MG hücreleri bortezomibe maruz bırakıldı ve bu durum, bortezomib tedavisinin hem Annexin V hem de propidyum iyodür (PI) için pozitif olan hücre

sayısında önemli bir artışa neden olduğunu gösterdi. Bortezomib tedavisi sonrası artan PI-pozitif hücre sayısı, diğer ilaçlara kıyasla daha hızlı bir apoptotik orana işaret ediyor olabilir. Bu fenomen, ilacın hücre döngüsüyle bağımsız bir mekanizmaya sahip olması nedeniyle ortaya çıkmış olabilir (Vilas-Boas vd., 2016).

Yue ve Sun 'a (2018) göre, apoptotik deneylerde, İxazomib'in 5-10 μ M konsantrasyonlarda kullanılması, HCT116, DLD1 ve HT29 hücrelerinde Annexin V-pozitif hücre popülasyonlarının indüklenmesiyle sonuçlanmıştır. Çalışma, kolorektal kanserde (CRC) İxazomib kaynaklı apoptozun arkasındaki mekanizmaları araştırmayı amaçladı. HCT116 hücrelerinde, İxazomib ile tedavi kaspazların 3/7 güçlü aktivasyonuna yol açtı. Ek olarak, apoptotik yanıt, bir pan-kaspaz inhibitörü olan z-VAD-fmk tarafından engellenmiştir; bu, İxazomib'in kaspaz bağımlı bir apoptotik yanıtı tetiklediğini gösterir (Yue ve Sun, 2018).

Muz vd. (2016) araştırmasında, İxazomib 20S proteazomun kimotripsin benzeri proteolitik (β 5) bölgesini inhibe ettiğini, MM hücre apoptozunu artırarak tümör ilerlemesini azalttığını ve MM hücrelerinin kemik iliği mikroçevresi ile etkileşimini bozarak anjiyogenezin azalmasına neden olduğunu belirtmişlerdir (Muz vd., 2016).

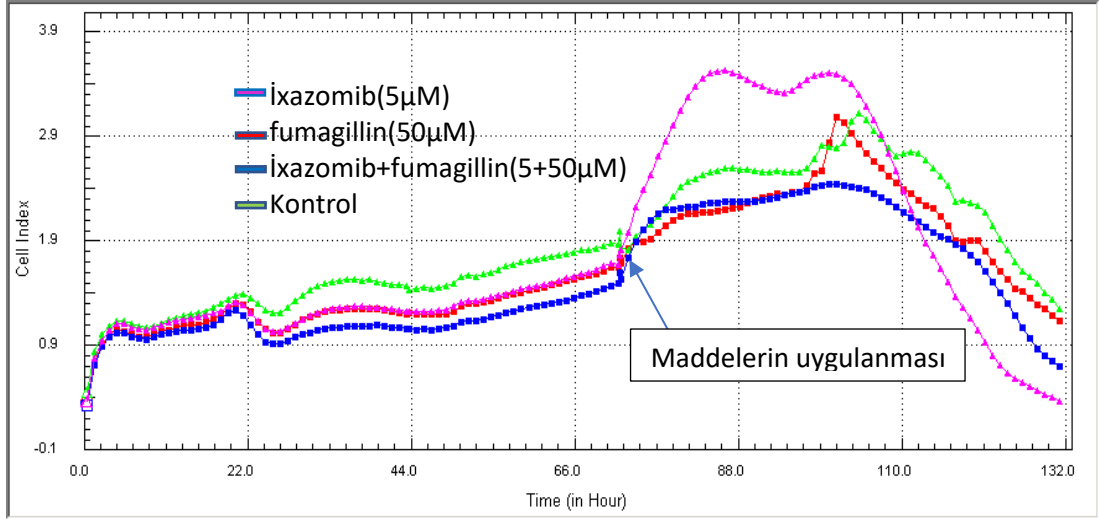
4.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Deney Sonuçları

Gerçek zamanlı hücre analizi ile İxazomib (5 μ M), ve Fumagillin (50 μ M) tek başlarına ve kombin etkileri incelenmiştir. Bu yöntemde deney başladıktan sonraki her 15 dakikada bir alınan hücre indeksi verileri elde edilmiştir.

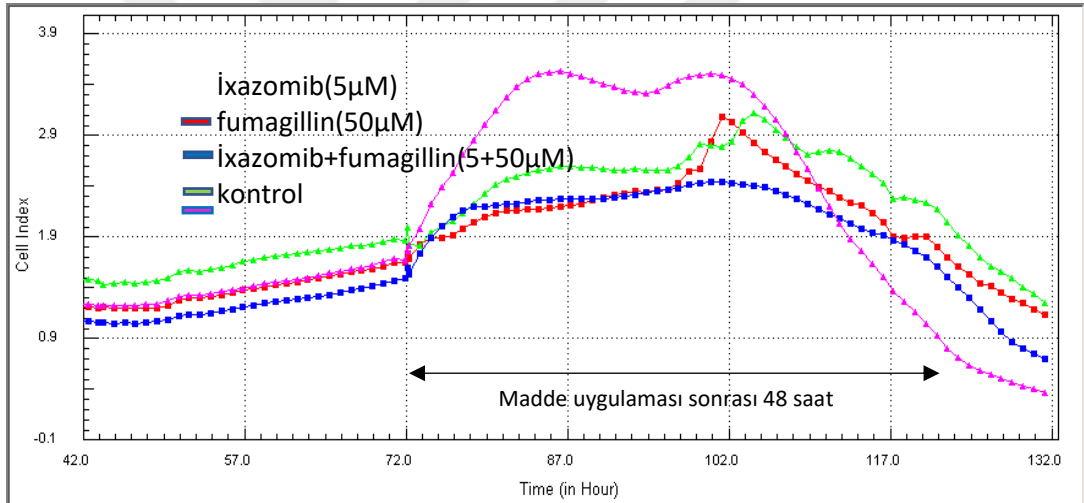
4.4.1. U87-MG hücre hattı üzerinde İxazomib, Fumagillin ve kombin uygulamasının proliferasyon etkilerinin değerlendirilmesi

Etken maddeler hücre indeksinin 1'e yaklaştığı ve kararlı yükselme gösterdiği 72. saatte uygulanmıştır. Daha sonrasında ise farklı süreler boyunca hücre indeksi her 15 dakikada bir kaydedilerek xCELLigence cihazı yazılımı ile bilgisayara aktarıldı.

İxazomib(5 μ M) ve Fumagillinin(50 μ M) tekli ve kombin uygulaması (5+50 μ M) U87-MG hücre hattında hücre proliferasyon etkileri değerlendirilmiştir. Şekil 4.5(a ve b)'te anlaşıldığı gibi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında İxazomib, Fumagillin ve bunların kombin uygulaması, doz ve zaman bağımlı olarak hücreleri proliferasyonu inhibe ettiği görülmüştür.



Şekil 4.7 a. U87-MG hücrelerinde İxazomib ve Fumagillinin tekli ve kombin uygulaması, hücre proliferasyon etkilerinin değerlendirilmesi



Şekil 4.7 b. U87-MG hücrelerinde İxazomib ve Fumagillinin tekli ve kombin uygulaması, hücre proliferasyon etkilerinin değerlendirilmesi (48 saatin gösterimi)

Suarez vd. (2016) araştırmasında, İxazomib ve IFN-a ile kombinasyon tedavisi, BRAF V600E mutant (A375) melanom hücre hattında her iki ajanın tek başına uygulanmasına göre hücre proliferasyonunda daha büyük bir azalma ile sonuçlandı. Bununla birlikte, hücre proliferasyonu üzerinde yalnızca minimum etkiye sahip olan IFN-a ilavesiyle iki tedavi arasında hiçbir sinerji görülmedi. BRAF vahşi tip (WM1366 ve MeWo) insan melanom hücre dizileri, IFN-a tedavisi olsun ya da olmasın, İxazomib'ten hücre proliferasyonunda önemli bir azalma olmadan İxazomib tedavisine daha dirençliydi

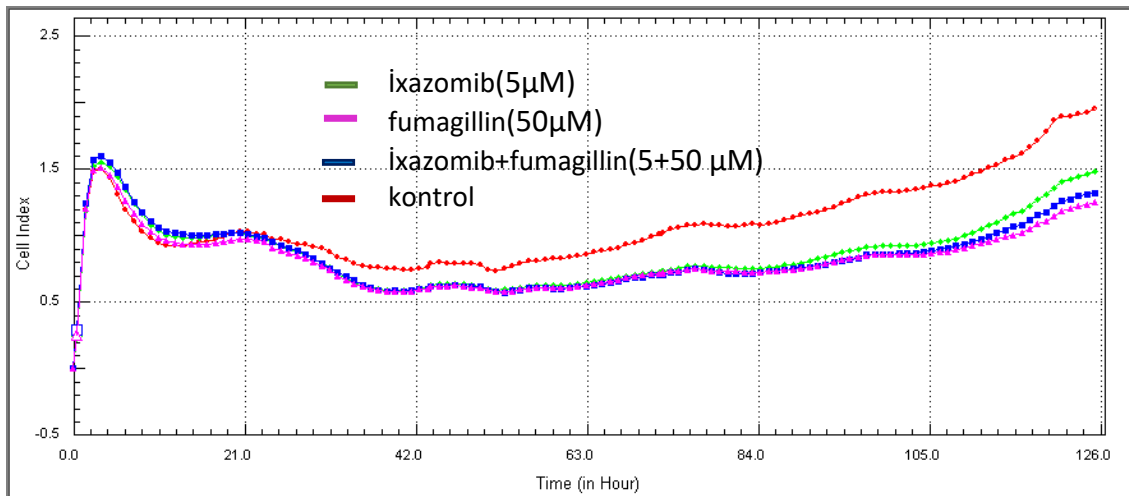
(Suarez vd, 2016).

Sheen vd. (2005) tarafından yapılan başka bir araştırmada, sonuçlar, Fumagillin'in farelerde in vivo olarak hem karaciğer tümörü büyümesini hem de metastazı etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir. Muhtemel bir mekanizma, endotelial hücre proliferasyonunda önemli bir rol oynayan MetAP-2'nin Fumagillin kaynaklı inhibisyonudur. MetAP-2'nin inhibisyonu ayrıca Bcl-2 ve telomeraz aktivitesinin inhibisyonu ile sonuçlanıldığını ispat ettiler (Sheen vd., 2005).

Esser vd. (2016) tarafından yürütülen çalışma, Fumagillin Sn2 ön ilacı (Fum-PD) ile doğal Fumagillin'in HUVEC kültürü üzerindeki etkilerini karşılaştırdı. DMSO'da hem Fumagillin hem de Fum-PD'nin eşmolar titrasyonları, HUVEC proliferasyonunda benzer doza bağlı azalmalar gösterdi. Ek olarak, $\alpha v \beta 3$ -Fum-PD-NP'nin (nanopartiküller) kullanımı, MR moleküler görüntüleme ve mikroskopik histopatoloji ile kanıtlandığı gibi, tümör anjiyogenezinin azalmasına neden oldu. Ayrıca, tümör hücresi proliferasyonunda bir azalmaya da yol açtığını ortaya çıkarıldı (Esser vd., 2016).

4.4.2. U87-MG hücre hattı üzerinde İxazomib, Fumagillin ve kombin uygulamasının migrasyon etkilerinin değerlendirilmesi.

Etken maddeler hücre indeksinin 1'e yaklaştığı ve kararlı yükselme gösterdiği 6. saatte uygulanmıştır. Daha sonrasında ise farklı süreler boyunca hücre indeksi her 15 dakikada bir kaydedilerek xCELLigence cihazı yazılımı ile bilgisayara aktarıldı. İxazomib (5 μ M) ve Fumagillinin (50 μ M) tekli ve kombin uygulaması (5+50 μ M) U87-MG hücre hattında hücre migrasyon etkileri değerlendirilmiştir.



Şekil 4.8 İxazomib ve fumagillinin tekli ve kombin uygulamasının, U87MG hücre migrasyonuna etkisi.

Migrasyon çalışmalarının sonuçlarına göre İxazomib, Fumagillin ve kombin uygulamaları U87-MG hücreleri üzerinde, kontrol gruplarına göre, migrasyonu belirli bir seviyede inhibe ettiğini gösterilmiştir.

Araştırma sonuçları, TNP-470'nin endotel hücre (EC) göçünü ve Rho aktivasyonunu etkili bir şekilde inhibe ettiğini ortaya koymaktadır. TNP-470'in VP/VEGF tarafından indüklenen hücre göçü üzerindeki etkisi incelendiğinde, hem TNP-470'nin hem de calpastatinin, kontrol hücrelere kıyasla, VP/VEGF'ye verilen migrasyon yanıtını sırasıyla %68 ($p = 0.00045$) ve %87 ($p = 0.000096$) oranında azalttığı gözlemlenmiştir. Buna karşın, eşdeğer TNP-470 konsantrasyonunda yalnızca HPMa kopolimeri ile tedavi edilen hücreler, kontrol grubundaki hücrelere kıyasla göçte anlamlı bir fark göstermemiştir. Dahası, TNP-470, VP/VEGF yokluğunda HIMVEG-d hücrelerinin temel göçünü %70 oranında inhibe ettiği ($p = 0.0023$) gösterilmiştir. Bu sonuçlar, TNP-470'nin EC göçü üzerindeki inhibe edici etkilerini, VP/VEGF uyarısının varlığında ve yokluğunda göstermekte olup, bu bulgular, TNP-470'nin anti-angiyojenik bir ajan olarak potansiyelini vurgular (Satchi-Fainaro vd., 2005). Aspergillus fumigatus'tan türetilen doğal bir bileşen olan Fumagillin, güçlü anti-angiyojenik özelliklere sahip olarak bilinirken, TNP-470 ise Fumagillin'in sentetik bir analogu olarak benzer şekilde etki gösterir (Castronovo ve Belotti, 1996).

Hücre göçü, GBM ölümcüllüğünün önemli bir özelliği olduğundan, Areeb, Z., vd, (2016) yaptıkları çalışmada carfilzomibin GBM hücre göçü üzerindeki etkisini xCELLigence gerçek zamanlı göç sistemini kullanarak inceledik. Çalışma, carfilzomibin 10 nM konsantrasyonunda, 72 saat sonra dört farklı GBM hücre hattında (U87MG, U87-EGFRvIII, LN229) hücre göçünü etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermiştir ($p < 0,05$). Bu bulgular, carfilzomibin GBM hücre göçünü engelleme konusunda önemli bir aday olduğunu vurgular, GBM'nin agresifliği ile mücadeledeki önemini ortaya koyar (Areeb vd., 2016).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser tedavi stratejileri, genellikle etkinliği artırmak ve direnç mekanizmalarının üstesinden gelmek için çoklu ilaçların kullanımını içermekte. Bununla birlikte, ilaç kombinasyonları arasındaki etkileşimleri anlamak, terapötik sonuçları optimize etmek için çok önemlidir. Araştırmamız İxazomib ve Fumagillin'in hem ayrı ayrı hem de kombinasyon halinde çeşitli hücre hatlarında hücre sağkalımı ve ölümü üzerindeki etkilerini değerlendirmeye odaklanmıştır.

Garcia vd. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, İxazomib tedavisinin insan akut miyeloid lösemi (AML) hücre hatları ve primer AML örneklerinde sitotoksik etkilerini araştırılmıştır. NPM1/NPMc+ ekspresyonu, indüklenebilir bir shRNA yapısı kullanılarak azaltıldığında, İxazomib kaynaklı apoptozun engellendiği gözlemlendi. Tersine, NPMc+'nın aşırı ekspresyonu apoptozu arttırdı. İxazomib sitotoksitesi, bir tür reaktif oksijen türü olan süperoksit oluşumu ile ilişkilendirilmiştir ve bu etki, antioksidan N-asetilsistein ilavesiyle azaltılmıştır (Garcia vd.,2016).

Suarez vd. (2016) tarafından yapılan araştırmaya göre, İxazomib tedavisi hem BRAF vahşi tip hem de BRAF V600E mutant melanom hücre hatlarında apoptotik hücre ölümüne neden olmuştur. BRAF vahşi tip (WM1366) hücre hattı ile karşılaştırıldığında BRAF V600E mutant (A375) melanom hücre hattında İxazomib kaynaklı apoptotik hücre ölümünün etkinliğinde hafif bir artış gözlemlendi. İxazomib ve IFN-a ile kombinasyon tedavisi, hem BRAF V600E mutantında (A375) hem de BRAF vahşi tip (WM1366) melanom tümör hücre dizilerinde apoptotik hücre ölümünde önemli ve sinerjistik bir artışla sonuçlandı (Suarez vd, 2016):

DeneySEL sonuçlar, hem İxazomib hem de Fumagillin'in hücre sağkalımı ve ölümü üzerinde belirgin etkileri olduğunu göstermiştir. İxazomib, apoptotik ve nekrotik hücrelere sayılarındaki artış göstermiştir. Fumagillin uygulaması da canlı hücrelerin azalmasına ve nekrotik ve geç apoptotik hücrelerin artmasına neden olmuştur. İxazomib ve Fumagillin kombinasyonu, kullanılan konsantrasyonlara bağlı olarak canlı hücrelerin azalmasına, erken apoptotik hücrelerin artmasına ve geç apoptotik ve nekrotik hücrelerde önemli artışlara neden olmuştur. Bu bulgular, her iki ilacın da farklı hücre ölümü tiplerini indükleyebileceğini ve kombinasyonlarının sinerjistik bir etki sergilediğini göstermiştir.

HUVEC hücrelerinden elde edilen veriler, hem İxazomib hem de Fumagillin'in tek

başına veya kombinasyon halinde kullanıldığında hücre canlılığı üzerinde önemli olumsuz etkiler sergilediğini göstermiştir. Hücre yaşayabilirliğindeki azalma, test edilen konsantrasyonlarda bu ilaçların sitotoksik veya inhibitör etkilerini göstermektedir. Benzer şekilde, U87-MG kanser hücreleri üzerinde belirgin negatif etkiler gözlemlendi ve daha yüksek konsantrasyonlar, hücre canlılığı üzerinde daha belirgin bir negatif etkiye yol açmıştır.

Buna karşılık, C6 kanser hücrelerinden elde edilen sonuçlar, hem İxazomib hem de Fumagillin'in konsantrasyona bağlı etkiler sergilemesine karşın, kombinasyon tedavilerinin sürekli olarak gelişmiş etkiler sergilemediğini göstermiştir. Bunun yerine, iki ilacın kombinasyonu, bireysel tedavilere kıyasla sürekli olarak daha zayıf etkiler gösterdi ve bu da yetersiz etkileşimi düşündürmüştür.

Ayrıca çalışma, elde edilen CDI değerleri ile gösterildiği gibi İxazomib ve Fumagillin kombinasyonunun SHSY5Y hücreleri üzerindeki antagonistik etkilerini ortaya koymuştur. Bu, yetersiz etkileşimi ve hücre büyümesini veya canlılığını inhibe etmede potansiyel olarak azaltılmış etkinliği göstermiştir. Sonuç olarak, sinerjistik etkileri artırmak için İxazomib ve Fumagillin'i diğer ilaçlarla veya tedavi yöntemleriyle içeren alternatif kombinasyonların araştırılmasını garanti eden tedavi yaklaşımının daha fazla araştırılmasına ve optimizasyonuna açık bir ihtiyaç vardır.

İlginç bir şekilde, İxazomib ve Fumagillin'nin kombine uygulaması, U87-MG hücrelerinin proliferasyonu üzerinde gecikmiş inhibitör etkiler göstermiştir. Ayrıca U87-MG hücrelerinde migrasyon üzerinde inhibitör etki Fumagillin ve kombinasyon uygulamalarında kontrol gruplarına göre gözlemlenmiştir.

Gayathri vd. (2020) araştırmalarında 0-60 μ M konsantrasyon aralığında Fumagillin'in doza bağımlı bir şekilde sitotoksitede önemli artışa yol açtığını ve IC50'nin A549 ve L132 için sırasıyla 40 μ M ve 50 μ M olduğunu belirtmişlerdir. Buna karşılık, A549 ve L132 hücreleri 24 saat boyunca GT, FUM ve GT+FUM ile kombinasyon halinde tedavi edildiğinde, Annexin V–PI– hücrelerinin yüzdesi azaldı ve erken apoptotik hücre popülasyonu (Annexin V+ PI–) önemli ölçüde arttı (Gayathri vd.,2020).

Sonuç olarak, bu çalışmanın bulguları, İxazomib ve Fumagillin'in hücre sağkalımı ve ölümü üzerindeki farklı etkileri hakkında değerli bilgiler sağlamıştır. Bu ilaçların

kombinasyonu, potansiyel terapötik faydaları gösteren sinerjistik bir etki sergiler. Bununla birlikte, tedavi yaklaşımını optimize etmek, alternatif kombinasyonları keşfetmek ve optimal dozlama rejimlerini araştırmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu çabalar, İxazomib ve Fumagillin kombinasyon tedavisinin etkinliğini artırmayı ve hastalar için iyileştirilmiş sonuçlara yol açmayı amaçlamaktadır. Sonuç olarak, bu çalışma kanser terapötikleri alanında artan bilgi birikimine katkıda bulunur ve bu umut verici araştırma alanında gelecekteki araştırmalar için temel oluşturmuştur.



KAYNAKÇA

- Abu-Izneid, T., Rauf, A., Shariati, M. A., Khalil, A. A., Imran, M., Rebezov, M., Uddin, M. S., Mahomoodally, M. F., Rengasamy, K. R. R. (2020). Sesquiterpenes and their derivatives-natural anticancer compounds: An update. *Pharmacological Research*
- Adams, J., Palombella, V. J., Sausville, E. A., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D. D., Elliott, P. J. (1999). Proteasome Inhibitors: A Novel Class of Potent and Effective Antitumor Agents. *Cancer research*, 59 (11): 2615–2622.
- Adan, A., Kiraz, Y., Baran Y., (2006). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 1213-1222(9).
- Akın, M. (2007). Multiple Myeloma Vakalarının Retrospektif İncelenmesi. Antalya: T.C Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi İö Hastalıkları Anabilim Dalı.
- Alison, M. R., Lim, S. M., & Nicholson, L. J. (2011). Cancer stem cells: problems for therapy?. *The Journal of pathology*, 223(2), 148-162.
- Alves T.R., Lima F.R., Kahn S.A., Lobo D., Dubois L.G., Soletti R., Borges H., Neto V.M.,(2011). Glioblastoma cells: A heterogeneous and fatal tumor interacting with the parenchyma. *Life Sciences- Elsevier*, 532-539.
- Areeb, Z., Stylli, S. S., Ware, T. M., Harris, N. C., Shukla, L., Shayan, R., Luwor, R. B. (2016). Inhibition of glioblastoma cell proliferation, migration and invasion by the proteasome antagonist carfilzomib. *Medical oncology*, 33, 1-8.
- Ashley, E. S. D., Lewis, R., Lewis, J. S., Martin, C., & Andes, D. (2006). Pharmacology of systemic antifungal agents. *Clinical infectious diseases*, 43(Supplement_1), S28-S39.
- Awasthi, N., Schwarz, M. A., Schwarz, R. E., (2010)Combination effects of bortezomib with gemcitabine and EMAP II in experimental pancreatic cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 10:1, 99-107
- Azab, A. K., Muz, B., Ghazarian, R., Ou, M., (2016). Spotlight on İxazomib: Potential in the treatment of multiple myeloma. *Drug Design, Development and Therapy*.
- Bacanlı, M., Anlar, H. G. Başaran, A., Başaran, N., (2017). Assessment of Cytotoxicity Profiles of Different Phytochemicals: Comparison of Neutral Red and MTT Assays in Different Cells in Different Time Periods. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(2): 95–107.
- Balyasnikova, I.V., Ferguson, S.D., Han, Y., Li, F., Lesniak, M.S. (2011) Therapeutic

- effect of neural stem cells expressing TRAIL and bortezomib in mice with glioma xenografts. *Cancer Lett.*, 310(2):148-59.
- Baskar, R., Lee, K.A., Yeo, R., Yeoh, K.W.(2012). Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci.*;9(3):193-9.
- Bird, C., Kirstein, S. (2009). Real-time, label-free monitoring of cellular invasion and migration with the xCELLigence system.
- Brignole, C., Marimpietri, D., Pastorino, F., Nico, B., Di Paolo, D., Cioni, M., Piccardi, F., Cilli, M., Pezzolo, A., Corrias, M. V., Pistoia, V., Ribatti, D., Pagnan, G., Ponzoni, M. (2006) Effect of Bortezomib on Human Neuroblastoma Cell Growth, Apoptosis, and Angiogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 1142–1157.
- Chasan, T. (2021). İnsan Glioblastoma U87 Hücre Hattında Piceatannol Ve Egfr İnhibitörü Erlotinib Kombinasyonunun Hücre Proliferasyonu, Hücre Döngüsü Ve Apoptoz Üzerine Etkisi .
- Chauhan, D., Tian, Z., Zhou, B., Kuhn, D., Orlowski, R., Raje, N., Richardson, P., Anderson, K.C. (2011). In vitro and in vivo selective antitumor activity of a novel orally bioavailable proteasome inhibitor MLN9708 against multiple myeloma cells. *Clin Cancer Res.*, 17(16):5311–5321.
- Daphu, I., Horn, S., Stieber, D., Varughese, J. K., Spriet, E., Dale, H. A., ... & Thorsen, F. (2014). In vitro treatment of melanoma brain metastasis by simultaneously targeting the MAPK and PI3K signaling pathways. *International journal of molecular sciences*, 15(5), 8773-8794.
- DeWever, R. L. (2015). Label-Free Impedance-Based Monitoring of Cell Migration and Invasion. Y. Fang içinde, *Label-Free Biosensor Methods in Drug Discovery*. (s. 339–351). New York, NY: Humana Press.
- Dikmen, M. (2015) In vitro evaluation of the cytotoxic, anti-proliferative, apoptotic and anti-migration properties of Fumagillin on C6 Glioma Cells. *Extended Abstracts*, 125-138
- Dikmen, M. (2017). Aprepitantin İnsan Glioblastoma U87MG Hücreleri üzerinde Antiproliferatif ve Apoptotik Etkileri. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21: 156-164.
- Dilber, M. (2020). Bortezomib İle Ellajik Asit, Ferulik Asit, Kafeik Asit Kombinasyonlarının Caco-2, A549 Ve 3t3 Hücrelerinde, Sinerjistik Sitotoksik

Etkilerinin Araştırılması .

- Engür, S. (2013). Lösemi Ve Kolon Kanseri Hücrelerinde Yeni Bir Proteozom İnhibitörü Olan Mln9708 ‘İn Antineoplastik Etkilerinin Araştırılması. Eskisehir: Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anadolu Üniversitesi.
- Engür, S., Dikmen, M. (2015) Kanser Tedavisinde Proteozom İnhibitörlerinin Önemi Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 31(4):182-187
- Esser, A. K., Schmieder, A. H., Ross, M. H., Xiang, J., Su, X., Cui, G., Zhang, H., Yang, X., Allen, J. S., Williams, T., Wickline, S. A., Pan, D., Lanza, G. M., Weilbaecher, K. N. (2016). Dual-therapy with $\alpha v \beta 3$ -targeted Sn2 lipase-labile fumagillin-prodrug nanoparticles and zoledronic acid in the Vx2 rabbit tumor model. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 201-211.
- Fan, W., Hou, Y., Meng, F., Wang, X., Luo, Y., Ge, P., (2011). Proteasome inhibitor MG-132 induces C6 glioma cell apoptosis via oxidative stress.
- Foster, I. (2008). Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*, 144-149.
- Frottin, F., Bienvenut, W. V., Bignon, J., Jacquet, E., Jacome, A. S. V., Van Dorselaer, A., Giglione, C. (2016). MetAP1 and MetAP2 drive cell selectivity for a potent anti-cancer agent in synergy, by controlling glutathione redox state. *Oncotarget*, 7(39), 63306.
- Garcia, J. S., Huang, M., Medeiros, B. C., Mitchell, B. S. (2016) Selective Toxicity of Investigational Ixazomib for Human Leukemia Cells Expressing Mutant Cytoplasmic NPM1: Role of Reactive Oxygen Species. *Clinical Cancer Research*, 22 (8): 1978–1988.
- Gayathri, L., Akbarsha, M., Ruckmani, K.(2020). In vitro study on aspects of molecular mechanisms underlying invasive aspergillosis caused by gliotoxin and fumagillin, alone and in combination. *Sci Rep* 10, 14473.
- Gloria, N. S. (2014). Lycopene and β -carotene induce cell-cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cell lines. *Anticancer Research*, 34, 1377–1386.
- Gomes, A. R., Varela, C. L., Tavares da Silva, E. J., Roleira, F. M. F., (2020) Epoxide containing molecules: A good or a bad drug design approach. *European Journal of Medicinal Chemistry*.
- Georgopapadakou, N. H., Walsh, T. J. (1996). Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(2), 279-291.

- Gül, D. H. (2013). Hodgkin Lenfomalı Hastalarda Birinci Basamak Tedavi Sonuçları Ve Pet/Bt'nin Tedavi Sonuçlarına Etkisi. Ankara: T.C Gazi Üniversitesi Tıp Fakóltesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı.
- Guruceaga, X., Perez-Cuesta, U., Abad-Diaz de Cerio, A., Gonzalez, O., Alonso, R., Hernando, F., A., R. (2020). Fumagillin, a Mycotoxin of *Aspergillus fumigatus*: Biosynthesis, Biological Activities, Detection, and Applications. *Toxins*, 12(1), 7.
- Henry C.M., Hollville E., Martin S.J. (2013). Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods*. , 61(2):90-7.
- Huang, L., Chen, C.H. (2013). Proteasome regulators: activators and inhibitors. *Curr Med Chem*. 2009;16(8):931-9.
- Ingber, D. F. (1990). Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature*, 348, 555–557.
- Ishida, K. O. (2018). Proteasome inhibitors for multiple myeloma .
- Kathiravan, M.K., Salake, A.B., Chothe, A.S., Dudhe, P.B., Watode, R.P., Mukta, M.S., Gadhwe, S. (2012). The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganical and Medicinal Chemistry*, 5678-5698.
- Kebapcı, A. (2018). Huvec Hücre Hatlarında Etanerseptin Hücre oğalması Üzerindeki Etkileri.
- Kusaka, M., Sudo, K., Fujita, T., Marui, S., Itoh, F., Ingber, D., & Folkman, J. (1991). Potent anti-angiogenic action of AGM-1470: Comparison to the fumagillin parent. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1070-1076.
- Lakshmanan, I., Batra, S. K. (2013). Protocol for apoptosis assay by flow cytometry using annexin V staining method. *Bio-protocol*, 3(6), e374-e374.
- Laurent, N., de Boüard, S., Guillamo, J. S., Christov, C., Zini, R., Jouault, H., Peschanski, M. (2004). Effects of the proteasome inhibitor ritonavir on glioma growth in vitro and in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(2), 129-136.
- Lawen, A. (2003). Apoptosis—an introduction. *BioEssays*, 888-896.
- Ledur, P.F., Onzi, G.R., Zong, H., Lenz, G. (2017). Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries? *Oncotarget*, 8(40):69185-69197.
- Li, H., Chen, Z., Hu, T., Wang, L., Yu, Y., Zhao, Y., Yang, J. (2016). Novel proteasome inhibitor ixazomib sensitizes neuroblastoma cells to doxorubicin treatment.

- Scientific reports, 6(1), 34397.
- Lopez-Acevedo, M., Grace, L., Teoh, D., Whitaker, R., Adams, D. J., Jia, J., ... & Secord, A. A. (2014). Dasatinib (BMS-35482) potentiates the activity of gemcitabine and docetaxel in uterine leiomyosarcoma cell lines. *Gynecologic oncology research and practice*, 1(1), 1-10.
- Mandal, A. (2019). *Cancer Pathophysiology*. News Medical Life Sciences.
- Moll, U., Dobbelstein, M.,(2014). Targeting tumour-supportive cellular machineries in anticancer drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 179-196.
- Minniti, G., Muni, R., Lanzetta, G., Marchetti P., Maurizi Enric, R.(2009). Chemotherapy for Glioblastoma: Current Treatment and Future Perspectives for Cytotoxic and Targeted Agents. *Anticancer Research*, 29 (12) 5171-5184
- Muz, B., Ghazarian, R. N., Ou, M., Luderer, M. J., Kusdono, H. D., & Azab, A. K.(2016) Spotlight on ixazomib: potential in the treatment of multiple myeloma. *Drug design, development and therapy*,217-226.
- Nagashima, H., Koike, N., Yoshida, K., Saya, H., & Sampetrean, O. (2020). Antifungal agent luliconazole inhibits the growth of mouse glioma-initiating cells in brain explants. *The Keio journal of medicine*, 69(4), 97-104.
- Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H. (1998). Early Features of Apoptosis Detected by Four Different Flow Cytometry Assays. *Apoptosis* 3, 115-121
- Özen, M. (2021). Obezite tedavisinde kullanılan bazı ilaçların kolorektal kanser gelişiminde etkili hedef genler üzerindeki etkisinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi Biyoloji Anabilim dalı.
- Öztürk, S. E. (2020). Thp-1 Kökenli Makrofaj Ve A549 Akciğer Kanseri Ko-Kültür Modelinde Epitelyal-Mezenkimal Değişim Yolağına İmmünterapötik Yaklaşımlar .
- Papandreou, P. J. (2013). Mechanisms of proteasome inhibitor-induced cytotoxicity in malignant glioma.
- Pédeboscq, S., L'Azou, B., Passagne, I., De Giorgi, F., Ichas, F. , Pometan, JP., Cambar, J., (2008) Cytotoxic and apoptotic effects of bortezomib and gefitinib compared to alkylating agents on human glioblastoma cells Journal of Experimental Therapeutics and Oncology, 99-111
- Rajamanickam, B., Kuo, A.L., Yeo, R., Kheng-Wei Y.,(2012). Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *International Journal of*

- Medical Sciences, 9(3): 193-199.
- Reed, J. C. (2005). Mechanisms of Apoptosis. American journal of pathology, 1416-1426.
- Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Duellman, S., Benink, H.A., Worzella, T.J.,(2016). Cell viability assays. Assay Guidance Manual, 1-23.
- Satchi-Fainaro, R., Mamluk, R., Wang, L., Short, S. M., Nagy, J. A., Feng, D., Dvorak, A. M., Dvorak, H. F., Puder, M., Mukhopadhyay, D., and Folkman, J.(2005).Inhibition of vessel permeability by TNP-470 and its polymer conjugate, caplostatin. Cancer cell, 251-261.
- Segal, B. H., Almyroudis, N. G., Battiwalla, M., Herbrecht, R., Perfect, J. R., Walsh, T. J., & Wingard, J. R. (2007). Prevention and early treatment of invasive fungal infection in patients with cancer and neutropenia and in stem cell transplant recipients in the era of newer broad-spectrum antifungal agents and diagnostic adjuncts. Clinical Infectious Diseases, 44(3), 402-409.
- Suarez, L. P., Kemper, G. M., Duggan, M. C., Stiff, A., Noel, T. C., Markowitz, J., ... & Carson III, W. E. (2016). The combination of MLN2238 (ixazomib) with interferon-alpha results in enhanced cell death in melanoma. Oncotarget, 7(49), 81172.
- Simrat, K., Prem pati,M., Deepika, B., Thakur N., (2002). Targeting tumour-supportive cellular machineries in anticancer drug development. Nature Reviews Drug Discovery, 399-402.
- Sharifzad, F., Ghavai, S., Verdi, J., Mardpour, S., Mollapour-Sisakht, M., Azizi, Z., Taghikhani, A., Łos, M.J., Fakharian, E., Ebrahimi, M., Hamidieh, A.A. (2019). Glioblastoma cancer stem cell biology: Potential theranostic targets. Drug Resistance Updates, 35-45.
- Sheen, I.S., Jeng, K.S., Jeng, W.J., Jeng, C.J., Wang, Y.C., Gu, S.L., Tseng, S.Y., Chu, C.M., Lin, C.H., Chang, K.M.(2005). Fumagillin treatment of hepatocellular carcinoma in rats: an in vivo study of antiangiogenesis. World J Gastroenterol, 14;11(6):771-7
- Shelton, T. N. (2010). Cancer as a metabolic disease. Nutrition & Metabolism, 7.
- Tolosa, L., Donato M. T., Gómez-Lechón. M. J.,(2014). General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay. Protocols in In Vitro Hepatocyte

- Research. *Methods in Molecular Biology*, vol 1250., 333-348.
- Twarużek, M., Zastempowska, E., Soszczyńska, E., Altn, I. (2018). The use of in vitro assays for the assessment of cytotoxicity on the example of MTT test. *Folia Biologica et Oecologica*, 14: 23–32.
- Castronovo, V., Belotti, D. (1996). TNP-470 (AGM-1470): Mechanisms of action and early clinical development. *European Journal of Cancer*, 2520-2527.
- Van den Heever, J. P., Thompson, T. S., Curtis, J. M., Ibrahim, A., & Pernal, S. F. (2014). Fumagillin: An overview of recent scientific advances and their significance for apiculture. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(13), 2728-2737.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R. & Berneman, Z.N. (2005). Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 84, 627–639.
- Vilas-Boas, F. D. A. S., Da Silva, A. M., de Sousa, L. P., Lima, K. M., Vago, J. P., Bittencourt, L. F. F., Barcelos, L. S. (2016). Impairment of stress granule assembly via inhibition of the eIF2 α phosphorylation sensitizes glioma cells to chemotherapeutic agents. *Journal of neuro-oncology*, 127, 253-260.
- Wagenknecht, B., Hermisson, M., Groscurth, P., Liston, P., Krammer, P.H., Weller, M.(2000). Proteasome inhibitor-induced apoptosis of glioma cells involves the processing of multiple caspases and cytochrome c release. *J Neurochem*, 75(6):2288-97.
- Walsh., D. M. (1996). *Medical Microbiology*. 4th edition. Texas: The University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Wang, T., Zhang, P., Chen, L., Qi, H., Chen, H., Zhu, Y., Li, Q. (2022). Ixazomib induces apoptosis and suppresses proliferation in esophageal squamous cell carcinoma through activation of the c-Myc/NOXA pathway. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 380(1), 15-25.
- Yue, D., Sun, X. (2018) Ixazomib promotes CHOP-dependent DR5 induction and apoptosis in colorectal cancer cells. *Cancer biology & therapy*, 284-294
- Zhang, X., Li, W., Wang, C., Leng, X., Lian, S., Feng, J., Wang, H. (2014). Inhibition of autophagy enhances apoptosis induced by proteasome inhibitor bortezomib in human glioblastoma U87 and U251 cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 385, 265-275.

http-1: <https://www.cancer.gov/> National cancer institute
(Erişim tarihi: 14.01.2023)



ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı :Fjolla AHMETİ
Yabancı Dil : İngilizce, Arnavutça, Türkçe, Makedonca, Sırpça, Almanca
ORCID ID :

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- Lisans: 2016-2021, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi.
- Lise: 2011-2015, Pançe Karagjozov.
- İlk ve Orta Öğretim: 2002-2015, Rajko Zhinzifov.
- 2021-2022 Farmasötik danışmanı, ANTBariatric, MedStar Hastanesi, Antalya, Türkiye.
- 2022-, MES danışmanı Rockwell Automation, Karlsruhe, Almanya

Yayınları ve Bilimsel Faaliyetleri:

- Salvia officinalis'ten fenollerin özütlenmesi ve esansiyel yağın hidrodamıtılması için mikrodalgaların uygulanması Bilimsel Poster - 6. Dünya Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Kongresi – Kıbrıs, Eylül 2019
- Katekolaminlerin LC/MS-MS ile analizi – Mezuniyet Projesi, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Haziran 2021

Mesleki Birlik/Dernek/Kuruluş Üyelikleri:

- 2023, ISPE, Avrupa Birliği.