

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**MELATONİN VE 13-CİS-RETİNOİK ASİTİN YKG-1
GLİOBLASTOMA MULTİFORME HÜCRE HATTINDA
TELOMERAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI: İN VİTRO ÇALIŞMA**

ESRA GÖKALP

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. MURAT TOSUN

**Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından 17.SAĞ. BİL. 28 proje numarası ile desteklenmiştir.**

Tez No:2019/018

2019-AFYONKARAHİSAR

KABUL VE ONAY

Afyonkarahisar Sağlık Bilimlerin Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri üyeleri tarafından

Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : ... / ... /

Prof.Dr. Murat TOSUN

Jüri Başkanı

Doç. Dr. Tolga ERTEKİN

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Hasan Hüseyin DEMİREL

Üye

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Esra GÖKALP'in "Melatonin Ve 13-Cis-Retinoik Asitin Ykg-1 Glioblastoma Multiforme Hücre Hattında Telomeraz Aktivitesi Üzerine Olan Etkilerinin Karşılaştırılması: İn Vitro Çalışma" başlıklı tezi .../.../..... günü saat 'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Özal ÖZCAN

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyuncaengin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tez çalışmamın yürütülmesinde, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle yol gösteren kıymetli Danışman Hocam Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Murat TOSUN'a; yüksek lisans eğitimime ve laboratuvar uygulamalarıma kattığı bilgi ve tecrübeleriyle her konuda yardımını esirgemeyen kıymetli Hocam Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Sayın Dr. Esra ASLAN'a; tez çalışmam sürecinde hücre kültürü çalışmalarına katkıda bulunan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Sefa ÇELİK'e; çalışmamın istatistiksel değerlendirilmesinde yardımlarından dolayı İstatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. İsmet DOĞAN'a; her konuda her zaman destek olan aileme en içten duygularıyla teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER.....	vii
RESİMLER.....	viii
TABLolar	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Sinir Sistemi Anatomisi.....	2
1.2. Sinir Sistemi Histolojisi.....	3
1.2.1 Merkezi Sinir Sistemi (MSS).....	7
1.2.2 Periferik Sinir Sistemi.....	14
1.2.3. Sinir Sistemi Hücreleri	17
1.3.Sinir Sistemi Embriyolojisi	20
1.4. Kanser.....	23
1.4.1. Beyin Tümörleri.....	24
1.5. Melatonin.....	25
1.6. 13- cis Retinoik Asit.....	26
1.7. Telomeraz	26
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	28
2.1. Etik Kurul	28
2.2. Kimyasallar	28
2.3. Deney Grupları	29
2.4. Hücre Kültürü.....	30
2.4.1. MTT Hücre Viabilite Ölçüm Testi	30
2.4.2. İmmünohistokimyasal Boyama	30
2.4.3. TdT-dUTP nick-end-labelling (Tunel) Boyama	31
2.4.4. Telomeraz Analizi.....	33
2.4.5. Preparatların Değerlendirilmesi ve Görüntü Analizi	33

2.4.6. İstatistiksel Analiz.....	33
3. BULGULAR.....	34
3.1. MTT test sonuçları	34
3.1.1.Telomeraz Gen Ekspresyonu sonuçları	36
3.1.2.İmmunositokimyasal Boyama Analiz Sonuçları:	38
3.1.3. TdT-dUTP nick-end-labelling (Tunel) Boyama Analiz Sonuçları	46
4. TARTIŞMA	53
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	60
ÖZET.....	61
SUMMARY	62
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	69

SİMGELER VE KISALTMALAR

AEC	3-amino-9-etilkarbozol
BECN-1	Beclin 1
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CAS3	Caspase 3
GBM	Glioblastoma multiforme
HRP	Horseradish peroksidaz
MLT	Melatonin
MSS	Merkezi sinir sistemi
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
SPSS	Statistical package for the social sciences
PBS	Phosphate Buffered Saline
PSS	Periferik sinir sistemi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Sinir sisteminin organizasyonu.....	4
Şekil 1.2. Nöron yapısı	5
Şekil 1.3. Nöron tipleri	7
Şekil 1.4. Serabral korteks tabakaları	9
Şekil 1.5. Spinal kord.....	12
Şekil 1.6. Sinir sistemi hücrelerinin sınıflandırılması.....	18
Şekil 1.7. Nöral tüp oluşumu.	21
Şekil 3.1. YKG-1 hücre kültüründe farklı dozlarda uygulanan melatonin ve 13-cis retinoik asitin gruplardaki viabilite oranlarının grafik gösterimi	35
Şekil 3.2. Gruplarda farklı dozlarda melatonin ile kombine edilen 13-cis retinoik asitin telomeraz ekspresyonu üzerine olan etkileri	37
Şekil 3.3. Gruplarda farklı dozlarda 13-cis retinoik asit ile kombine edilen melatonin'in telomeraz ekspresyonu üzerine olan etkileri.....	38
Şekil 3.4. Kullanılan parametrelerde elde edilen immunopozitif ve immunonegatif hücre oranlarının karşılaştırılması.....	40

RESİMLER

Resim 1.1. Sinir hücre gövdesi	6
Resim 1.2. Cerebellum Cerebellum korteksi	10
Resim 1.3. Cerebellum korteks hücreleri	11
Resim 1.4. Motor nöronlar	13
Resim 1.5. Periferik Sinir Sistemi	15
Resim 3.1A. Caspase-3 ekspresyonunun immunositokimyasal olarak gösterimi (Caspase 3, 1/50, x40). A: Kontrol grubu, B: G1, C: G2, D: G3, E: G4, F: G5	41
Resim 3.2A. Caspase-3 ekspresyonunun immunositokimyasal olarak gösterimi (Caspase 3, 1/50, x40). A: G6, B: G7, C: G8, D: G9, E: G10, F: G11	42
Resim 3.3A. Caspase-3 ekspresyonunun immunositokimyasal olarak gösterimi (Caspase 3, 1/50, x40). A: G12, B: G13, C: G14, D: G15	43
Resim 3.1B. Beclin-1 ekspresyonunun immunositokimyasal olarak gösterimi (Beclin 1, 1/50, x40). A: Kontrol grubu, B: G1, C: G2, D: G3, E: G4, F: G5	44
Resim 3.2B. Beclin-1 ekspresyonunun immunositokimyasal olarak gösterimi (Beclin 1, 1/50, x40). A: G6, B: G7, C: G8, D: G9, E: G10, F: G11	45
Resim 3.3B. Beclin-1 ekspresyonunun immunositokimyasal olarak gösterimi (Beclin 1, 1/50, x40). A: G12, B: G13, C: G14, D: G15	46
Resim 3.1C. TdT-dUTP nick-end-labelling (Tunel) boya gösterimi (x40). A: Kontrol grubu, B: G1, C: G2, D: G3, E: G4, F: G5	50
Resim 3.2C. TdT-dUTP nick-end-labelling (Tunel) boya gösterimi (x40). A: G6, B: G7, C: G8, D: G9, E: G10, F: G11	51
Resim 3.3C. TdT-dUTP nick-end-labelling (Tunel) boya gösterimi (x40). A: G12, B: G13, C: G14, D: G15	52

TABLÖLAR

Tablo 3.1. YKG-1 hücre kültüründe farklı dozlarda uygulanan melatonin ve 13-cis retinoik asitin gruplardaki viabilite oranları.....	34
Tablo 3.2. Gruplardaki telomeraz gen ekspresyonu değişimi	36
Tablo 3.3. Kruskal-Wallis testi sonuçları	38
Tablo 3.4. Chi-Square Tests	47
Tablo 3.5. Chi-Square Tests	47
Tablo 3.6. Chi-Square Tests	48
Tablo 3.7. Chi-Square Tests	48
Tablo 3.8. Chi-Square Tests	48
Tablo 3.9. TdT-dUTP nick-end-labelling (Tunel) boyama sonucu elde edilen gruplar arası farklılık oluşturan değerler	49

1. GİRİŞ

Bütün beyin tümörlerinin içinde Glioblastoma multiforme (GBM), en sık rastlanan primer malign huylu beyin tümörüdür. Tedavi edilmesi en zor olan GBM primer beyin tümörlerinin yaklaşık olarak %20-30'nu oluşturmaktadır. Bu tümör çocukluk çağında nadir görülüp en sık 45-75 yaş arası görülmektedir. Toplumda yaklaşık 100.000'de 5 kişide rastlanılıp, kadınlarda erkeklere oranla daha azdır (Kleihues ve ark., 2007). Glioblastoma, yüksek morbitide ve mortaliteye sahip olduğundan dolayı tedavisi zor kanserlerden biri olup küratif tedavisi yoktur (Fisher JL, 2007).

Melatonin sirkadian ritim içinde yeralan önemli bir hormondur. Bunun yanında son zamanlarda hem nöroprotektif hemde antioksidan etkilerinin olduğu ortaya çıkmıştır (King ve ark., 2003). Yapılan çalışmalarda melatoninin malign glioblastoma tedavisinde tümör yığını proliferasyonunu inhibe ettiği, glioblastoma başlatan hücreleri öldürerek terapötik potansiyelini güçlendirdiği aynı zamanda kemoterapi etkisini arttırdığı ortaya konmuştur (Martín ve ark., 2014).

A vitamini türevi olan 13-cis retinoik asit tıpta dermatolojik tedaviler olmak üzere değişik amaçlarda kullanılmaktadır. Yağda eriyen bir özelliği olması nedeniyle vücuttan atılımı güçtür. Bundan dolayı eksikliği yanında fazla alınımı da zararlıdır (Ponthan ve ark., 2001). Retinoik asitin kültürdeki glioma hücrelerine karşı büyüme önleyici aktiviteye sahip olduğu bir çok çalışmada ortaya konmuştur. Malign beyin tümörü olan hastalarda 13-cis-retinoik asit kullanılmış ve ortaya çıkan sonuçlarda ,13-cis-retinoik asidin malign glioma karşı aktif olduğu görülmüştür (Yung ve ark., 1996).

Telomer; ökaryotik kromozomların DNA ve protein içeren terminal (uç) kısımlarıdır. Telomeraz; DNA'da üretilen, telomeri koruyan, sentezleyen ve boyutunu yöneten ters transkriptaz bir enzimdir. Telomeraz aktivitesi embriyonik gelişimde çok fazladır. Daha sonra baskılanır ve inaktif hale gelir. Telomeraz germ line hücrelerinde, embriyonik kök hücrelerde, prokaryotlarda ve kanser hücrelerinde

aktif olarak bulunur. Tümörlerin %90'ında yüksek düzeyde telomeraz aktivitesi saptanmaktadır (Counter ve ark.,1992).

Biz de bu çalışmamızda beyin tümörlerinin içinde en sık rastlanan, primer malign beyin tümörü olan glioblastoma multiforme ile ilgili çok sayıda bilimsel makale olmasına karşın halen etkin bir tedavisinin olmadığını belirledik. Buradan yola çıkarak normal insan yaşantısında beyni koruyucu etkiye sahip melatonin ile nörotoksik olduğu bilinen 13-cis- retinoik asidin bu hastalık üzerine oluşturabileceği olası sitotoksik etkileri karşılaştırmayı amaçladık. Bu amaçla insandan üretilmiş YKG-1 glioblastoma hücre hattında bu iki ilacın sitotoksik etkilerini karşılaştırdık. Çalışmamız bu yönüyle literatürde yaptığımız araştırmalar içinde birbiriyle farklı özelliklere sahip 2 maddenin etkisini karşılaştırma açısından önemli bir farklılık arz etmektedir ve her iki parametrenin bu hücreler ile ilgili yapılmış bilimsel çalışması literatürde bulunmayıp ve bu çalışmalarda telomeraz aktivitesi ile ilgili hiçbir çalışmaya rastlanılmamıştır.

1.1. Sinir Sistemi Anatomisi

Sinir sistemi; kardiyovasküler sistem ile beraber embriyoda ilk olarak fonksiyona başlayan sistem olup, endokrin sistemle birlikte vücudun önemli bir düzenleyicisidir (Ozan, 2014).

Sinir sistemi anatomik olarak merkezi (santral) sinir sistemi (MSS) ve periferik sinir sistemi (PSS) olmak üzere iki bölümde incelenir. MSS tubus neuralis'ten, PSS ise crista neuralis'ten gelişmektedir (Taner, 2005).

Merkezi sinir sistemi(MSS); afferent sinirlerle vücut içinden ya da dışından gelen uyarıları alıp, ilgili doku ve organlara efferent sinirlerle gönderen bölümdür (Gökmen, 2003). Beyin (encephalon) ve omurilik (medulla spinalis) olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır.

Encephalon (beyin) MSS'nin en gelişmiş kısmı olup erişkin bir insanda yaklaşık 1400 gr'dır. Kranialden kaudale doğru şu şekilde sıralanır;

- Prosencephalon (forebrain)
- Telencephalon (beyin hemisferleri)
- Diencephalon (epithalamus, thalamus, hypothalamus, subthalamus)
- Mesencephalon (midbrain)
- Rhombencephalon (hindbrain)
 - Metencephalon (pons ve cerebellum)
 - Myelencephalon (medulla oblongata) (Taner, 2005).

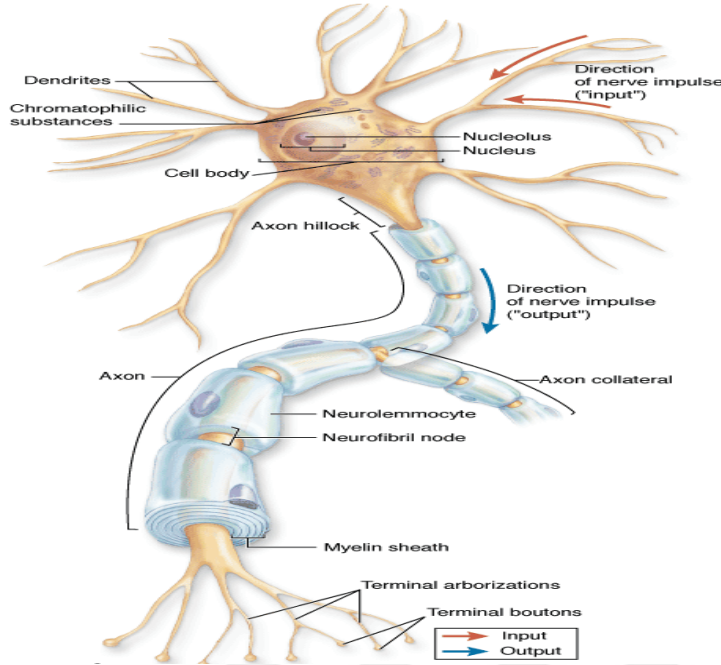
Medulla spinalis (MS); yetişkinlerde yaklaşık 30 gr ağırlığında olup, 45 cm uzunluğundadır. Medulla spinalis vertebraların cisimleri ile arkusları arasında yer alan canalis vertebralis adı verilen kanalın içinde yer alır. Erkeklerde 1. ve 2. lumbal vertebralar arasındaki intervertebralise, kadınlarda ise 2. lumbal vertebranın ortasına kadar uzanmaktadır (Ersoy ve Kalkan, 1996). 31 segmentten oluşmaktadır ve bu segmentlerden 31 çift spinal sinir çıkar.

Periferik sinir sistemi (PSS); 31 çift olan spinal sinirler ile 12 çiftten meydana gelen kranial sinirler ve bu sinirlerin ganglionlarından oluşmaktadır. İnsan sinir sisteminde 43 çift periferik sinir bulunmaktadır (Ozan, 2014). Periferik sinir sistemi somatik sinir sistemi ve otonom sinir sistemi olmak üzere ikiye ayrılır. Somatik sinir sistemi spinal ve kranial sinir liflerinden oluşup çizgili kas dokusunun kasılmasını sağlar. Otonom sinir sistemi ise sempatik ve parasempatik sinir liflerinden meydana gelip düz kas ve kalp kasının kasılması ile bezlerin sekresyonunu sağlar (Gökmen, 2003).

1.2. Sinir Sistemi Histolojisi

Memeli vücudunun en karmaşık sistemi sinir sistemidir (Eroschenko, 2016). Sinir sistemi; merkezi sinir sistemi ve periferik (çevresel) sinir sistemi olmak üzere iki kısımda incelenmektedir (Ross, 2014) (Şekil 1.1).

iletmektedirler. Hem MSS hem de PSS'nin fonksiyonel birimi olan nöronlar uyarılabilme yeteneğine sahip özelleşmiş hücrelerdir (Mescher, 2010). Nöronlar üç bölümden oluşur (Şekil 1.2) :



1)Hücre Gövdesi (soma)

2)Dendritler

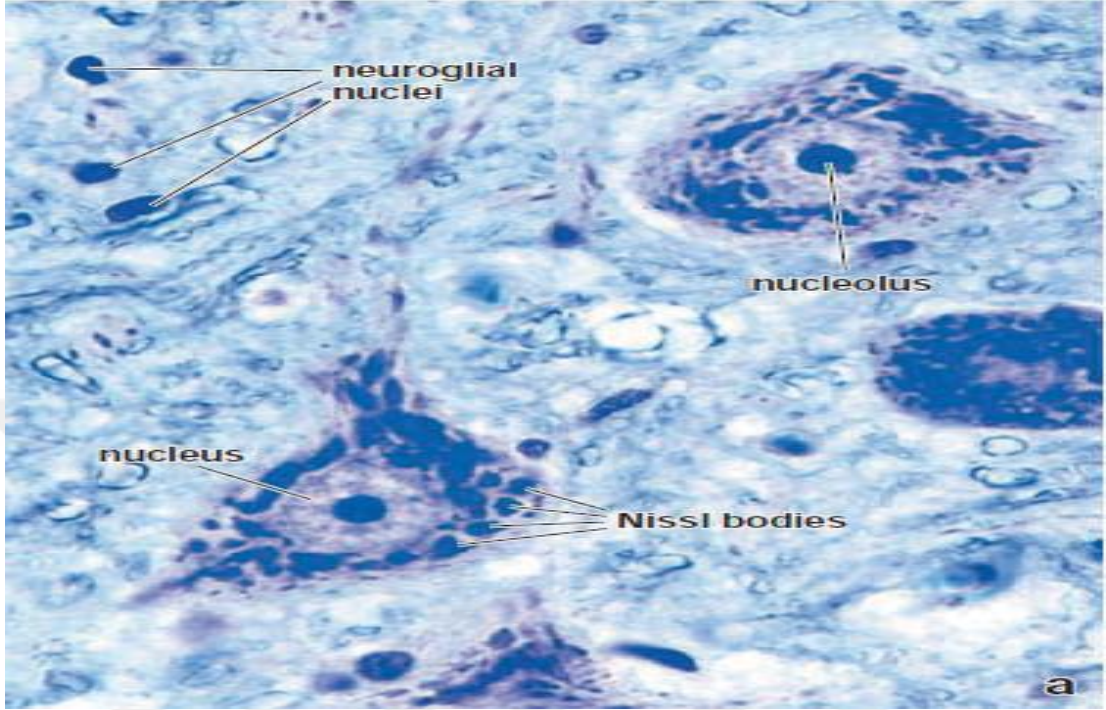
3)Akson(Kierszenbaum, 2006)

Şekil 1.2. Nöron yapısı (Mescher, 2010)

Nöronlar vücutta şekil ve büyüklük olarak en fazla çeşitliliğe sahip hücrelerdir (Ross, 2014). Nöronların çapları 5 ile 150 μm arasında değişiklik göstermektedir (Gartner, 2016). Örneğin; Beyincik korteksinde yer alan granüler hücreler 3-5 mikron çapında, Purkinje hücreleri 100-150 mikron çapındadır (Mescher, 2010).

Her nöron bir hücre gövdesi, tek bir akson ve çok sayıda dendrit içerir (Eroschenko, 2016). Nöron hücre gövdesi (perikaryon); sitoplazma, çekirdek ve çeşitli organelleri içerir (Resim 1.1). Nukleus oldukça büyük, yuvarlak ve açık kromatinlidir. Merkezi yerleşim gösterir. Nukleolus ise koyu renkte gözlenir. Perinüklear sitoplazmada yer alan organellerden golgi kompleksi nukleusun etrafını sarar, mitokondri ise sitoplazmada dağınık şekilde bulunur (Gartner, 2016).

Perinüklear sitoplazma, bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum (gER) ve serbest ribozomlar içermektedir ve bunlara “Nissl tanecikleri” adı verilir (Şekil 1.3).



Resim 1.1. Sinir hücre gövdesi (Ross ve Pawlina, 2014)

Nissl tanecikleri perikaryonun her tarafına uzanmasına rağmen aksonun içine uzanmazlar. Bu yere “Akson tepeciği ”adı verilir. Burası diğer yerlere göre daha açık renkte görülmektedir.

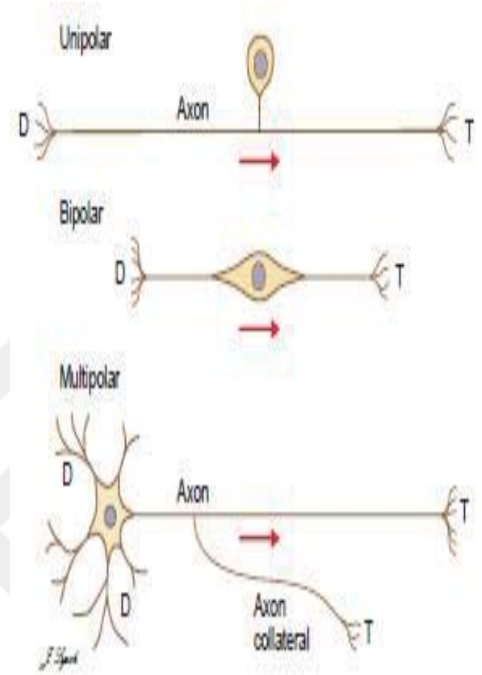
Dendrit; dış ortamdan ya da diğer nöronlardan uyarı alan reseptör uzantılarıdır. Sinirlerden gelen uyarıları hücre gövdesine iletirler. Miyelinsizdirler ve aksonlardan daha geniş çapa sahiptirler. Aksonlar; hücrelere ve diğer nöronlara uyarı ileten efektör uzantılardır. Her nöronun sadece bir aksonu bulunmaktadır (Ross, 2014).

Sinapslar; kas lifleri, bez gibi efektör hücreler ile ara nöron ve nöronlar arasında impuls iletimini sağlayan özelleşmiş bağlantılardır. İmpuls iletimi her

zaman tek yönlü olup perisinaptik hücreden postsinaptik hücreye doğrudur (Eroschenko, 2016).

Nöronlar, hücre gövdelerinden çıkan dendritlerin ve aksonların sayısına göre üç tipleri vardır (Şekil 1.4). Bunlar;

- Unipolar nöronlar; tek bir uzantıya sahiptir. Bu tip nöronlar nadir şekilde görülmektedir.
- Bipolar nöronlar; tek bir akson ve birden çok dendrite sahiptir. Bu tip nöronlar duyu organlarında bulunmaktadır.
- Multipolar nöronlar; tek bir akson ve birden çok dendrite sahiptir. Bu tip nöronlar çok sayıda bulunmaktadır (Gartner, 2016).



Şekil 1.3. Nöron tipleri (D.Cui, 2011)

1.2.1 Merkezi Sinir Sistemi (MSS)

Merkezi sinir sistemi, vertebral kanal içinde bulunan spinal kord ve kranial kavitede yer alan cerebrumdan oluşmaktadır (Ross, 2014). Gerçek anlamda bağ dokusu bulunmaz. Bundan dolayı yumuşak ve pelte kıvamında bir organdır (Junqueira ve Carneiro, 2009), ve çok hassas olduğu için, serebrum ve spinal kord kemikler, bağ dokusu tabakaları ve beyin-omurilik sıvısı (BOS) ile korunmaktadır (Eroschenko, 2016). Cerebrum ve spinal kordı örten membranlara meninks adı verilmektedir. Üç tabakadan oluşup bağ dokusundan meydana gelmektedir (Gartner, 2016).

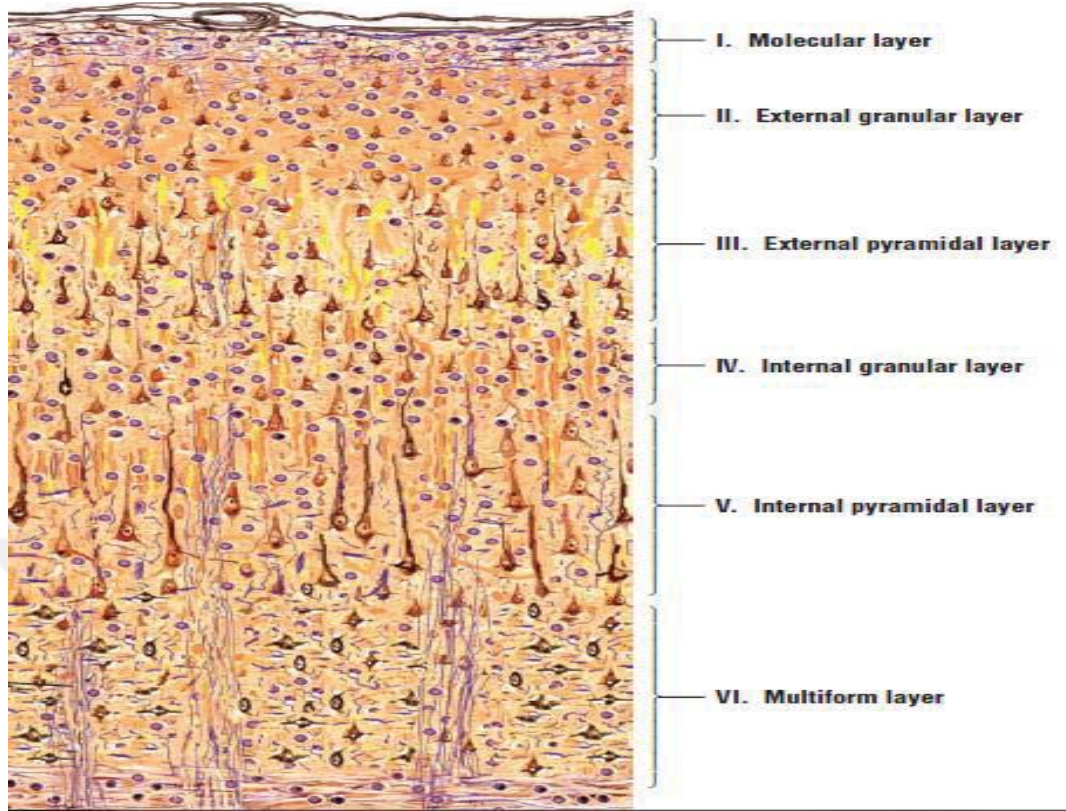
- Dura mater; en dıştaki tabakadır. Sert, güçlü, yoğun bağ dokusu liflerinden oluşmaktadır.
- Araknoid; dura mater tabakasının hemen altında yer almaktadır. İnce bağ dokusundan oluşmaktadır.
- Pia mater; meningeal tabakanın en içteki tabakasıdır. Çok ince bağ dokusundan oluşmaktadır. Bu tabakada beyin ve omuriliği yıkayıp koruyan çok sayıda kan damarları bulunmaktadır.

Pia mater ve araknoid arasında subaraknoid aralığı yer almaktadır. Bu aralıkta beyini ve omuriliği şoktan ve hasardan koruyan beyin-omurilik sıvısı bulunmaktadır. BOS, beyin ventriküllerinde koroid pleksus hücreleri tarafından üretilen açık renksiz bir sıvıdır (Eroschenko, 2016).

MSS'nin yapısında beyaz cevher (substantia alba), gri cevher (substantia grisea) bulunmaktadır. Beyinde gri cevher korteksi, beyaz cevher ise medullayı oluşturur. Gri katmanda sinir hücre gövdeleri, aksonlar, dendritler, gliyal hücreler ve sinapslar yer almaktadır. Beyaz katmanda ise nöropil adı verilen ağsı uzantılar, kan damarları ve aksonlarla ilişkili gliyal hücreleri bulunmaktadır (Ross, 2014). MSS'nin beyaz cevheri nöron içermemektedir (Eroschenko, 2016).

1.2.1.1 Beyin (Cerebrum)

Beyin; hemisferler (yarım küreler), spinal kordla birleşen beyin sapı ve beyincik olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Cerebrumun gri cevherden oluşan en dış tabakasına serebral korteks denir (Ross, 2014). Serebral korteks her birinde bir ya da daha fazla hücre tipinin hakim olduğu altı tabakadan oluşmaktadır (Şekil 1.4) (Eroschenko, 2016).

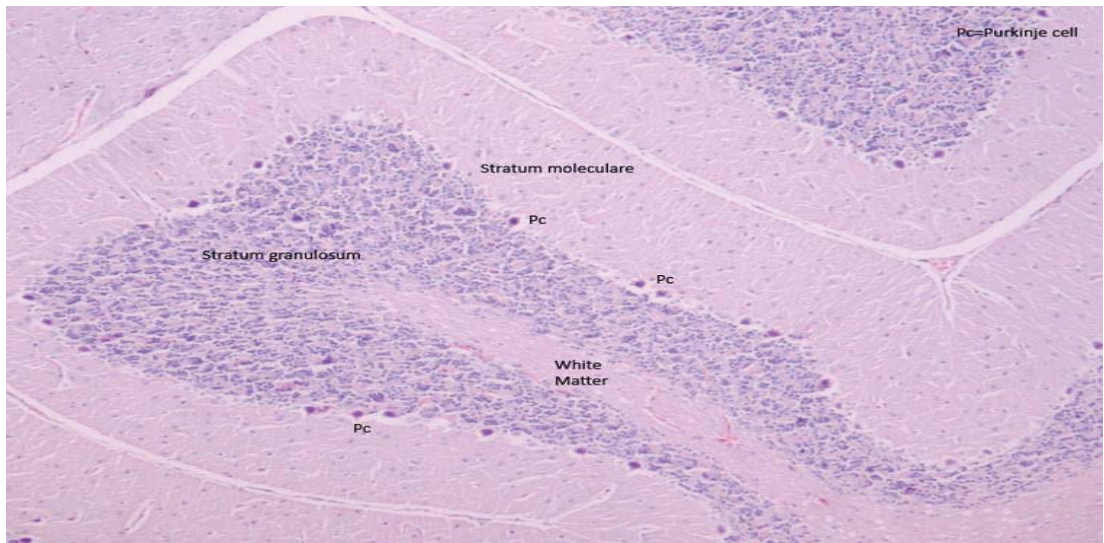


Şekil 1.4. Serabral korteks tabakaları (Victor P.Eroschenko, 2016)

- I. Moleküler Tabaka: Bu tabaka pia materin hemen altında yer almaktadır. Periferal kısımda nöroglial hücreleri ve az sayıda Cajal'ın horizontal hücreleri olarak adlandırılan nöronlar bulunmaktadır.
- II. Dış Granüler Tabaka: Yıldız (stellat) ve küçük piramidal hücrelerden oluşmaktadır. Bu hücrelerin aksonları oldukça kısadır ve piramidal hücrelerin apikal dendritleri korteksin periferine doğru uzanmaktayken aksonları ise tam zıt yönde uzanmaktadır.
- III. Dış Piramidal Tabaka: Küçük ve orta piramidal nöronlar bu tabakada yer almaktadır. Piramidal hücrelerin aksonları substansiya albaya geçmektedir.

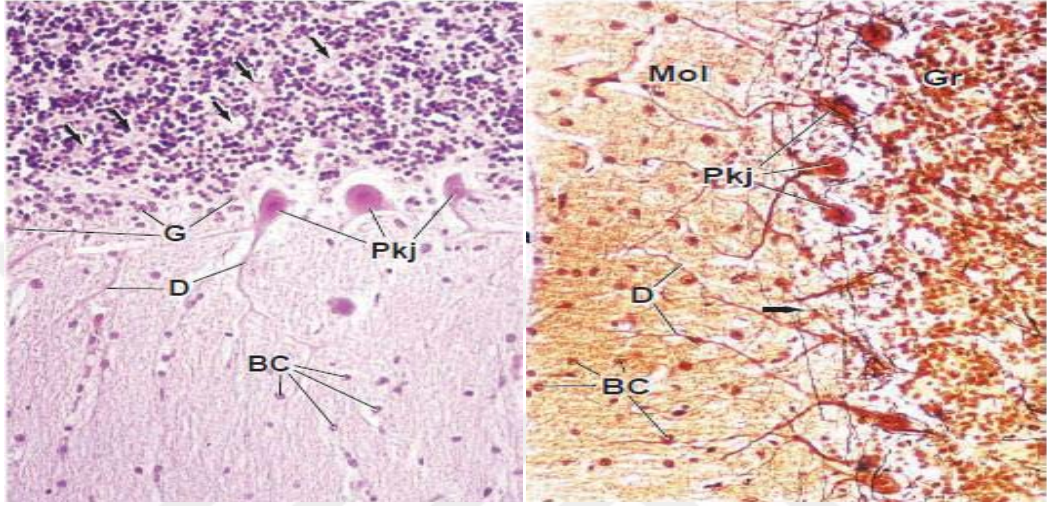
- IV. İç Granüler Tabaka: En ince tabakadır. Bu tabakada yıldız şeklinde, küçük ve çok kutuplu nöronlar yer almaktadır. Bundan dolayı bu tabaka granüllü gözükmektedir.
- V. İç Piramidal Tabaka: Orta ve büyük piramidal hücrelerden oluşmaktadır.
- VI. Multiform Tabaka: Granül hücreleri, iğsi hücreler, yıldız hücreleri ve martinotti hücreleri gibi çeşitli biçim ve boyuttaki hücrelerden oluşmaktadır. Martinotti nöronları en belirginleridir (Eroschenko, 2016).

Beyincik (Cerebellum); beyin gövdesi üzerine yerleşmiş ortadaki tek merkezi sinir organıdır. Vücut hareketlerinin koordinasyonundan ve kas tonusunun düzenlenmesinden sorumludur. İki yan lob ve vermis olarak adlandırılan bir orta lobtan oluşmaktadır. Cerebellum beyincik kıvrımları olarak adlandırılan çok sayıda derin kıvrıntılı katlantılara sahiptir. Bu kıvrıntılı katlantılar nedeniyle çok geniş bir yüzey alanına sahiptir. Bu kıvrımlar sagittal kesitlerde ağaç görünümü vermesi nedeniyle Arbor vitea (hayat ağacı) olarak adlandırılmaktadır. Cerebrumda olduğu gibi cerebellumun yüzeyi de substansia grisea ile örtülüdür ve korteks serebelli denir. Korteks serebelli üç tabakadan oluşmaktadır (Resim 1.2); Stratum molekulare, Stratum gangliozum, Stratum granulozum.



Resim 1.2. Cerebellum Cerebellum korteksi (Tosun M, sanal histoloji lab)

Stratum Molekölare; nörondan fakir bir katmandır. Genellikle sinir uzantılarından oluşmuştur. Bu tabakayı yıldızsı hücreler ve sepet hücreleri oluşturmaktadır. Bu hücreler her yönde uzanan dendritlere ve purkinje hücrelerinde sonlanan çok sayıda uzantılara sahiptir (Resim1.3) (Mescher, 2010).



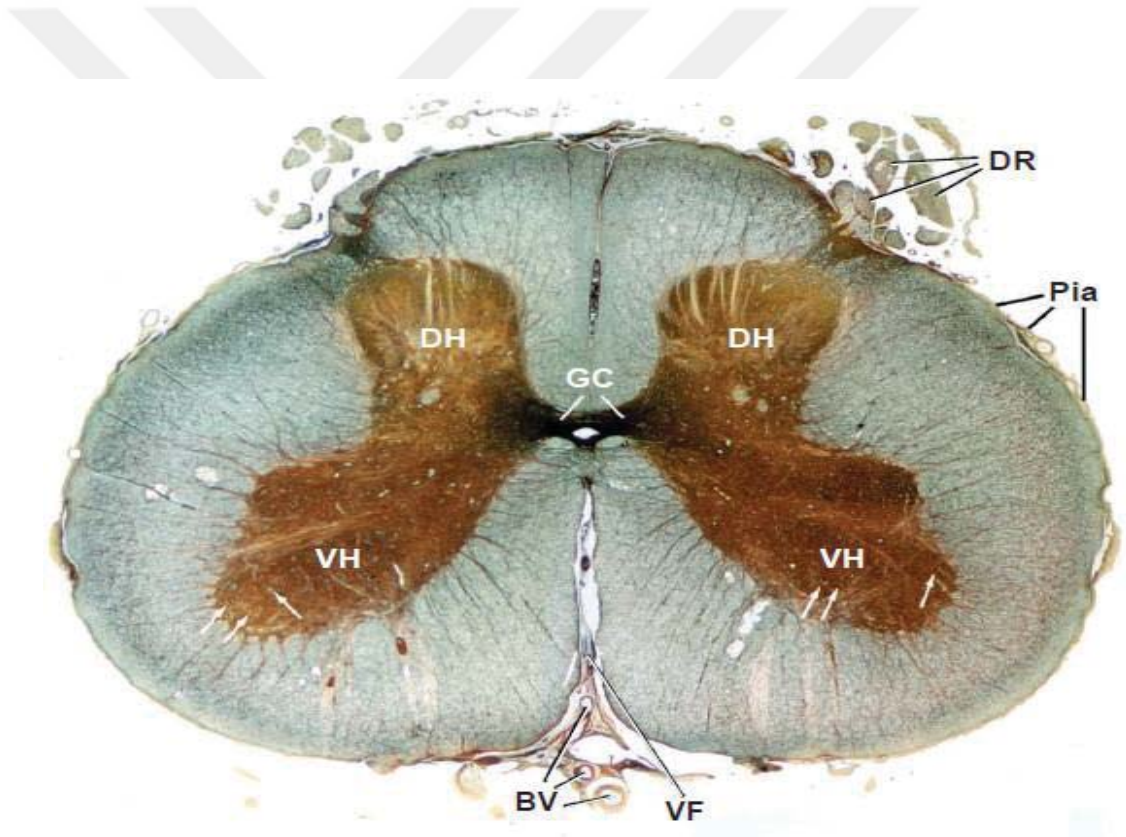
Resim 1.3. Cerebellum korteks hücreleri (Pkj: Purkinje hücreleri, G: Golgi tip II nöron, BC: Basket hücreleri, D: Dendrit) (Ross ve Pawlina, 2014)

Stratum Gangliosum; moleküler tabakanın altında bulunan, tek sıra şeklinde dizilmiş, armut biçimli, cerebellumun en iri hücreleri olan Purkinje hücrelerinin bulunduğu tabakadır. Purkinje hücrelerinde Nissl cisimcikleri boldur, nukleus açık renktedir ve belirgin bir nukleolus içerirler.

- Stratum Granulosum; Bu tabakada 4-5 mikron çapında ve daha çok bulunan granüler hücreler ile daha büyük fakat daha az bulunan Golgi tip II hücreler yer almaktadır (Mescher, 2010). Golgi tip II hücreler granüler tabakada dağınık şekilde yerleşmişlerdir. Granüler tabakada düzensiz olarak dağılmış soluk boşluklar görülmektedir. Bu boşluklar glomerüller olarak adlandırılmaktadır (Eroschenko, 2016).

1.2.1.2 Medulla Spinalis (Omurilik)

Spinal kord; beyin sapı ile devamlılık gösterip, 42-45 cm uzunluğunda, 1 cm genişliğinde, yassı, silindirik bir yapıdadır. 31 adet segmente ayrılmıştır. Her segmentten bir çift spinal sinir çıkmaktadır. Spinal kordun enine kesitinde; ön kısmında fissura mediana anterior, orta kısmında kanalis sentralis, arka kısmında septum medianum posterior bölümlerinden oluşmaktadır. Medulla spinaliste cerebrum ve cerebellumun aksine nöron gövdelerini içeren substansia grisea içte, genellikle miyelinli sinir liflerinden oluşan substansia alba ise dış kısımdadır (Şekil1.5) (Ross, 2014).

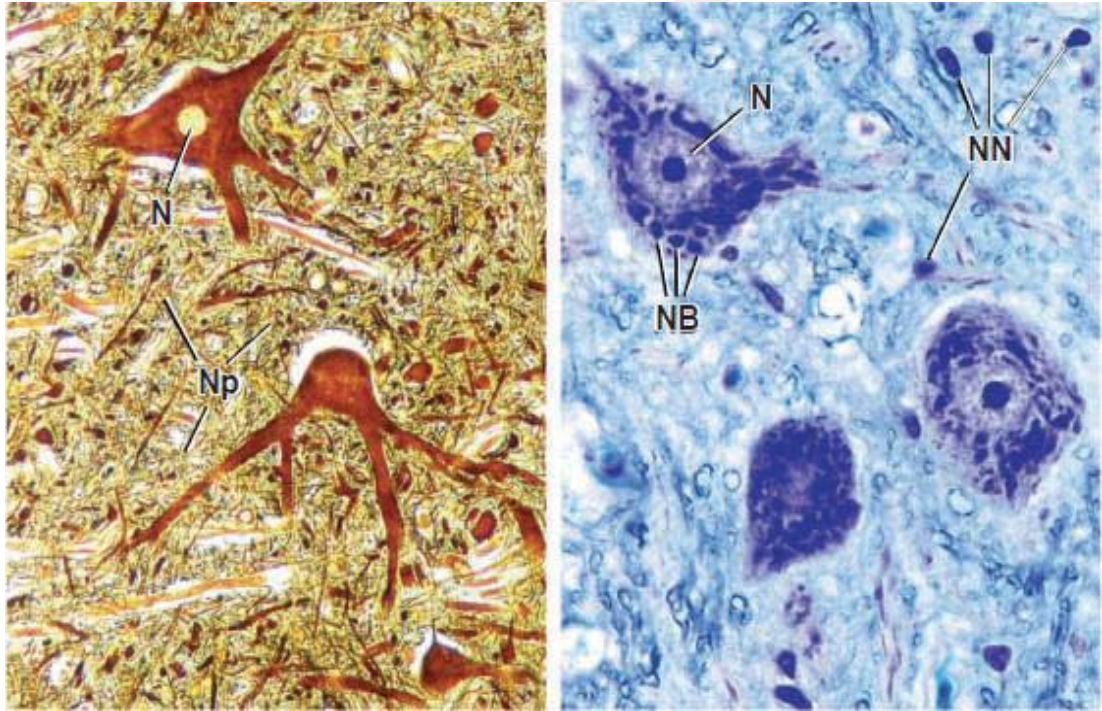


Şekil 1.5. Spinal kord (DH: Dorsal boynuz, VH: Ventral boynuz, Pia: Pia mater) (Ross ve Pawlina, 2014)

Substansia Grisea (Gri cevher); spinal kordun enine kesitlerinde ortada beyin ventrikülleri ile bağlantılı santral kanal (canalis centralis) bulunmaktadır. Bu kanal

etrafında ependimal hücreler yer almaktadır. İçerisinde beyin-omurilik sıvısı bulunmaktadır. Hemen etrafında kelebek şeklinde ya da H harfi şeklinde görülen gri bir yapı, dışında ise ak yapının olduğu görülmektedir. H'ın anterior kolları daha uzun olup kolumna anterior (ön boynuz), posterior kolları ise daha kısa olup kolumna posterior (arka boynuz) ismini alır. H'ın orta kısımlarında ise yanlara doğru üçgen çıkıntı yapan kolumna lateralis (yan boynuz) bulunmaktadır (Gartner, 2016). Ön boynuzlar motor, yan boynuzlar vejetatif, arka boynuzlar ise duyuşal fonksiyon ile ilgilidir. Spinal kordun grizeasında üç tip nöron bulunmaktadır. Bunlar;

- Motor (Radiküler) nöronlar (Resim 1.4); spinal kordun en büyük hücreleridir. Ön boynuzda yer alırlar (Dongmei Cui, 2011). Bu nöronlar impulsları MSS' den uzağı ilettikleri için efferent nöronlardır.



Resim 1.4. Motor nöronlar (Np: nöropil, NN: nukleus ve nöroglial hücre, NB: nissl cicimciğı) (Ross ve Pawlina, 2014)

- Duyusal (Funiküler) nöronlar; arka boynuzda bulunurlar. Bu nöronların aksonları periferik sinirlere katılmazlar. MSS'ye impulsları taşıdıkları için afferent nöron olarak adlandırılırlar.
- Golgi II tip nöronlar; özellikle arka boynuzda yer alan küçük nöronlardır. Bu nöronların hücre gövdeleri, dendrit ve aksonları substansia albaya geçmez. Golgi II tip nöronlar duyusal ve motor nöronlar arasında bağlantı kurarlar ve intrasegmeneter bağlantı nöronları olarak adlandırılırlar (Ross, 2014).

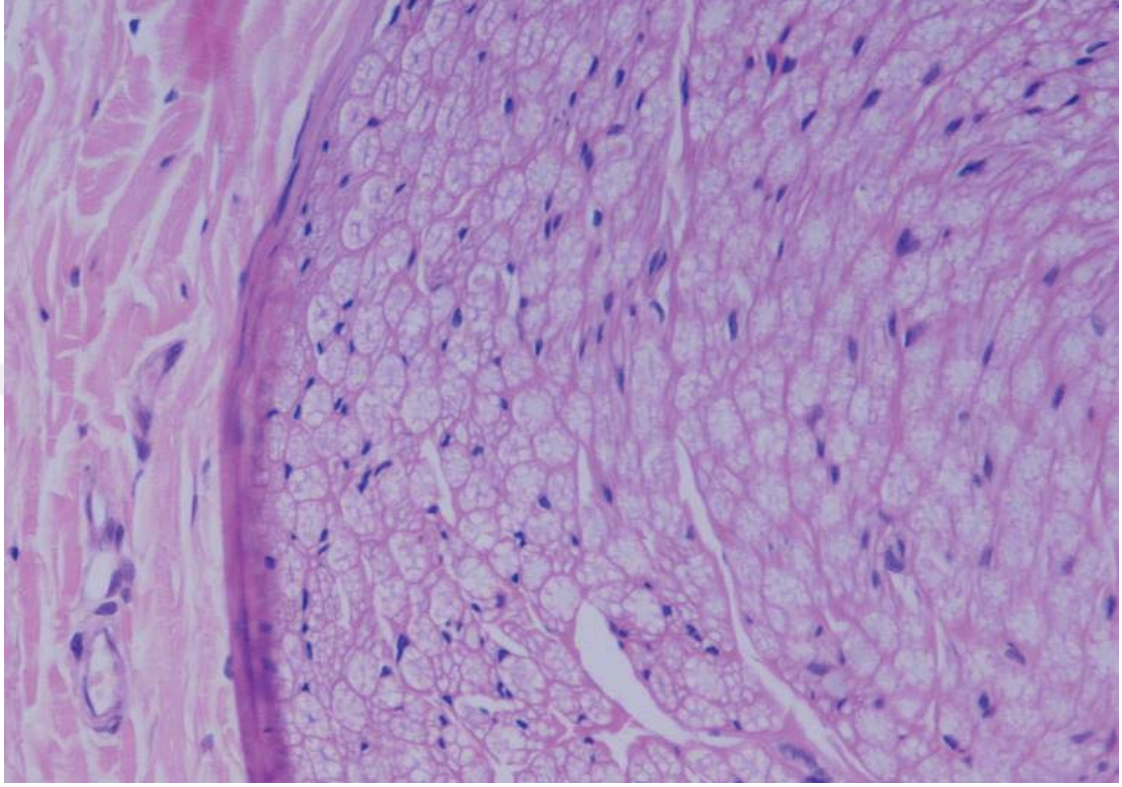
Substansia Alba (beyaz cevher); nöroglia hücrelerinden, kan damarlarından ve sinir liflerinden meydana gelmektedir. Glia hücrelerinin çoğunluğunu fibröz astrositler oluşturmaktadır (Eroschenko, 2016).

1.2.2 Periferik Sinir Sistemi

MSS' nin dışında yerleşmiş olan sinirleri, nöronları, aksonları ve destek hücrelerini içermektedir. Bunlar; cerebrumdan gelen kranial sinirler ve sinir hücre gövdelerini içeren gangliyonlardan oluşan spinal sinirlerdir (Eroschenko, 2016). PSS, vücudun dış alıcısı gibi işlev görmektedir. Dışarıdan aldığı duyu bilgilerini MSS'ne taşır ve gelen yanıtı ilgili dokulara götüren sinir ağından oluşmaktadır (Verkhatsky ve Butt, 2007).

Periferik sinir; bağ dokusu tarafından bir arada tutulan sinir lifleri demeti ve destekleyicisi olan Schwann hücreleri oluşturmaktadır (Ross, 2014). Bu hücreler sinir liflerini çevreleyerek miyelin oluşumunu sağlarlar. Periferik sinirler; epinöriyum, perinöriyum ve endonöriyum olmak üzere üç ayrı bağ dokusundan oluşmaktadır (Kierszenbaum, 2006). Epinöriyum; periferik sinirin en dış dokusunu oluşturmaktadır. Tip I kollajen ve fibroblastlardan oluşmuştur. Tüm siniri çevrelemektedir. Perinöriyum; akson gruplarını çevrelemektedir. Kan ve sinir bariyerinin oluşumuna katkıda bulunan özelleşmiş bağ dokusudur. Bu bariyer aksonu korur ve çoğu makromoleküllerin geçişini engeller. Endonöriyum; Tip III kollajen

lifleri, nadiren fibroblastları, mast hücreleri ve makrofajları içeren düzensiz sıkı bağ dokusundan meydana gelir (Resim 1.5) (Ross, 2014).



Resim 1.5. Periferik Sinir Sistemi (Tosun M, sanal histoloji lab)

Ganglionlar; MSS dışında yerleşik nöron topluluklarına ganglion adı verilmektedir. Ganglionlar dıştan bağ doku kapsülü ile sarılmaktadır. Bu kapsül büyük ganglionlarda sıkı ve kuvvetli, küçük ganglionlarda ise ince ve gevşektir. Morfolojik ve fonksiyonel özelliklerine göre kranio-spinal ganglionlar (duyusal) ve otonomik ganglionlar (motor) olmak üzere iki tipi vardır. Bunlar;

1) Kranio-spinal ganglionlar (duyusal); spinal sinirlerin dorsal köklerinde ve kranial sinirlerin V, VII, IX ve X. yolları üzerine yerleşmişlerdir. MSS'ne giden getirici uyarıları alırlar (Junqueira ve Carneiro, 2009) Sinir lifleri miyelinlidir. Nöronları pseudoünipolardır. Her bir nöronun etrafı satellit ya da manto hücresi

denen yassı hücreler tarafından sarılmıştır. Bu hücreler ganglion hücrelerinin beslenmesinde ve metabolizmasında rol oynar. Ganglionun periferik kısmında nöronlar çok sayıda, fibriller ise az sayıdadır ve korteks adını alır. İç kısmında ise nöronlar seyrek, fibriller çok sayıdadır ve medulla olarak adlandırılmaktadır.

2) Otonomik ganglionlar (motor); sempatik trunkuslarda, sölilik ve mezenterik gibi pleksuslarda ve visseral organların yakınında ya da içinde (Auerbach ve Meissner pleksuslar) bulunurlar. Otonomik ganglionlar satellit hücre sayısı seyrek olduğundan zayıf bir bağ doku kapsülü ile sarılmışlardır. Multipolar nöronlardır ve hücreler yıldız şeklindedir. Aksonları küçük olup miyelinsizdir (Kierszenbaum, 2006).

Otonom ganglionlar, üzerinde yerleştiği sinirin fonksiyonuna göre ikiye ayrılır. Bunlar; sempatik ve parasempatik ganglionlardır. Sempatik ganglion; MSS' de olan presinaptik hücrelerin aksonları ile perikaryonlarının sinaps yaptığı yerdir. Yani spinal kordun torasik ve lomber parçalarında yer alır. Bundan dolayı torakolomber bölümünde denilmektedir. Spinal korda yakınlığına göre paravertebral, prevertebral ve terminal ganglionlar olarak adlandırılırlar. Paravertebral olanlar kolumna vertebralisin her iki tarafında da dizilmiş olarak bulunurlar. Prevertebral olanlar sinir pleksuslarında bulunurlar. Örneğin; mezenterik ganglionlar, sölilik ganglionlar gibi. Terminal olanlar ise organların duvarları içine yerleşmişlerdir. Sempatik ganglionların kimyasal düzenleyicisi norepinefrindir, bu madde böbrek üstü bezi medüllası tarafından salgılanır. Bu hücreler sinirlerle uyarıldıklarında salgılarını kana boşaltırlar. Parasempatik ganglion; kafatası içinde III, VII, IX ve X. kafa çifti üzerinde ya da organ duvarlarında bulunurlar. Parasempatik ganglionların kimyasal düzenleyicisi ise asetilkolindir. Asetilkolinesteraz tarafından hızlı bir biçimde etkisiz hale getirilir. Parasempatik uyarının sempatik uyarıdan daha farklı etki göstermesinin nedenlerinden biride budur (Junqueira ve Carneiro, 2009).

Otonomik sinir sisteminin sempatik ve parasempatik bölümleri genelde aynı organı desteklerler. Bu ikisinin etkisi antagonisttir. Örneğin; sempatik kısmı kalp

kası kontraksiyon hızını arttırırken, parasempatik kısmı bu hızı azaltmaktadır (Ross ve Pawlina, 2014).

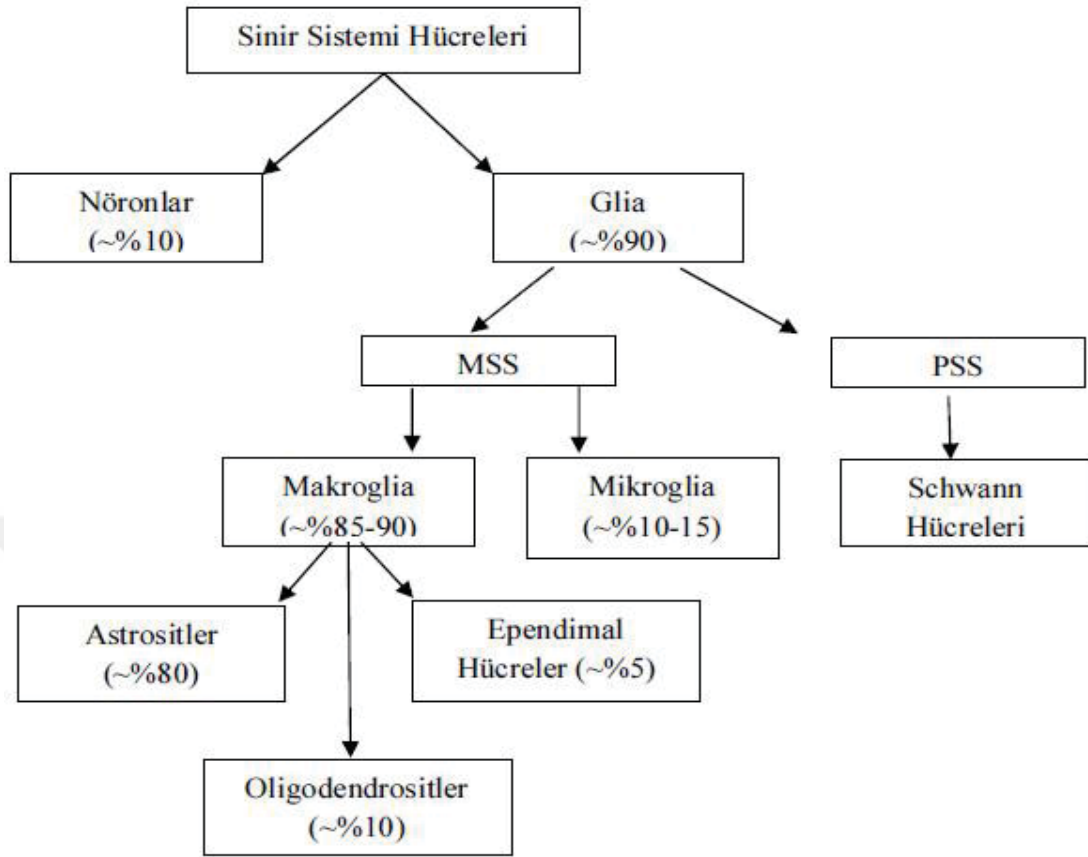
1.2.3. Sinir Sistemi Hücreleri

Sinir sistemi hücreleri nöron ve glia hücreleri olarak ikiye ayrılmaktadır. Bu hücrelerin %90'nını glia'lar oluştururken geri kalan %10'luk kısmını nöronlar oluşturmaktadır (Verkhratsky ve Butt, 2007). Glia hücreleri çoğalma özelliği gösterebilen hücrelerdir. Bundan dolayı çoğu benign ve malign beyin tümörleri glia kökenlidir (Kierszenbaum, 2006). Glia hücre miktarı canlıların sahip olduğu fiziksel büyüklükleriyle orantılıdır. Örneğin; küçük iplik kurdunda birkaç tane glia hücresi bulunurken, farede %65'ini, insanda %90'ını, filde %97'sini glia hücreleri oluşturmaktadır (Allen ve Barres, 2009).

Glia hücreleri, nöronların çevresinde yerleşiktir. Bu hücreler nöronlara yapısal destek sağlamada, besin ve oksijen temininde, patojenlerin yok edilmesinde ve nöronal iletişimde görev alırlar (Barres, 2008).

Glia hücreleri nöronlardan farklıdır. Glia hücreleri aksiyon potansiyeli oluşturmazken, nöronlar aksiyon potansiyeli oluşturabilirler. Diğer bir farkları ise glia hücreleri mitotik, nöronlar ise post mitotiktir (Herrup ve Yang, 2007).

Glia hücreleri, morfolojilerine, fonksiyon ve yerleşim yerlerine göre sınıflandırılırlar. MSS' de yer alan hücreler magroglia ve mikroglia, PSS'de yer alan glia hücreleri ise schwann hücreleri ve satellit hücreleri olarak adlandırılırlar (Şekil 1.6) (Verkhratsky ve Butt, 2007).



Şekil 1.6. Sinir sistemi hücrelerinin sınıflandırılması (Verkhatsky ve Butt, 2007).

1.2.3.1. Makroglialar

MSS’de yer alan glia hücrelerinin %85-90’nını oluşturmaktadır. Makroglialar; nöroektodermden köken alan astrositleri, oligodendrositleri ve ependimal hücreleri içerir (Kierszenbaum, 2006).

Astrositler; yıldız şekilli, en büyük ve en fazla bulunan glia hücreleridir. Protoplazmik ve fibröz olmak üzere iki tip astrosit vardır (Eşrefoğlu, 2018; Eroschenko, 2016). Bu astrositler morfolojik farklılıklarına rağmen görevleri benzerdir (Barres, 2008). Fibröz astrositler uzun ince yapıda olup fazla dallanmazlar ve substantia albada daha fazla bulunurlar (Verkhatsky ve Butt, 2007; Kierszenbaum, 2006). Protoplazmik astrositler ise substantia griseada daha fazla

bulunan, kısa geniş dallanan uzantılara sahip astrositlerdir (Eşrefoğlu, 2018). Her iki tip astrositte tight junction ve kan-beyin bariyerini oluştururlar (Eroschenko, 2016).

Gelişim ve yetişkin dönemde astrositler beyin fonksiyonlarında ve bilgi sürecinde önemli role sahiptirler. Beyinde homeostaziyi sağlayan temel hücrelerdir. Birbirlerine oluklu bağlantılar ile bağlıdırlar. Nöronların akson boyunca doğru yerleşimini sağlarlar. Bazı faktörler salarak hem presinaptik hem de post sinaptik süreci düzenlerler (Sofroniew ve Vinters, 2010). Nörotransmitter ve potasyum gibi bazı iyonların düzeylerini kontrol ederler (Barres, 2008). Astrositler sinir dokusu zedelenmelerine karşı bölünüp, ölen sinir ve glia hücrelerinin yerini doldururlar ve travma gibi olaylarda arayı dolduran gliyal skar (nedbe) dokusunu oluştururlar (Eroschenko, 2016).

Oligodendrositler; makrogliaların %15'ini oluşturmaktadır (Allen ve Barres, 2009). Nöron çevresinde en fazla görülen hücrelerdir. Astrositlere göre daha küçük, nükleusları heterokromatik ve düzensizdir. Organelden zengin olan bu hücreler yaygın golgi aygıtı, çok sayıda mitokondriyon ile mikrotübülleri içerir (Eşrefoğlu, 2018; Kierszenbaum, 2006). MSS'de miyelinin oluşumunu sağlayan hücrelerdir. Oligodendrositlerin hasarı sonucu myelizasyon bozulur ve dolayısıyla multipl skleroz ve kalıtsal nöropati gibi hastalıklar meydana gelir (Allen ve Barres, 2009).

Ependimal hücreler; beyin ventriküllerini ve spinal kanalı döşeyen tek katlı epitel görüntüsü veren kübik-prizmatik hücrelerdir. Tipik epitelden farklı olarak bazal lamina bulunmaz. Ependimosit olarak da adlandırılırlar. Bu hücreler BOS üretiminde ve bunun salınımında görev yaparlar (Eşrefoğlu, 2018; Ross ve Pawlina, 2014).

1.2.3.2.Mikroglia

MSS hücrelerinin %10-15'ni oluşturan mezoderm kökenli hücrelerdir. Makroglialara göre daha küçük olan bu hücreler heterojen şekilli ve dikdörtgene benzer nükleusları vardır. Erken gelişim döneminde beyine yerleşen hematopoietik kökenli makrofajlardan köken almıştır. Diğer glia hücrelerinden farklı olarak fagositoz

yaparlar. Bu hücrelerin en önemli görevi beynin hasar ve enfeksiyon durumunda hemen çoğalıp, ölü hücreleri yok etmeleridir (Barres, 2008; Davolos ve ark., 2005).

1.2.3.3. Schwann Hücreleri

PSS’de yer alan nöral krista kökenli hücrelerdir. Oligodendrositler gibi nöron aksonlarının miyelizasyonundan sorumludur. Ancak Schwann hücresi bir aksonun etrafında miyelin kılıfı oluştururken, oligodendrositler birden fazla nöron ve uzantıları etrafında kılıf oluşturabilirler. Fagositik aktive gösterirler (Ross ve Pawlina, 2014; Allen ve Barres, 2009). Schwann hücrelerinin çoğalabilmesi için endonörium gereklidir (Kierszenbaum, 2006).

1.2.3.4. Satelit Hücreleri

Nöral krista kökenli glia hücreleridir. Nöron gövdelerini çepeçevre saran küçük, yassı veya kübik şekilli hücrelerdir (Eşrefoğlu, 2018). Bu hücreler sensör görevi görüp, nöronlara destek olurlar ve kimyasal çevrenin düzenlenmesinde rol alırlar. Astrositler gibi oluklu bağlantılar ile bağlıdır. Beyin hasarına ve inflamasyona karşı duyarlıdırlar. Ağrı gibi patolojik durumlara katılırlar (Verkhatsky ve Butt, 2007).

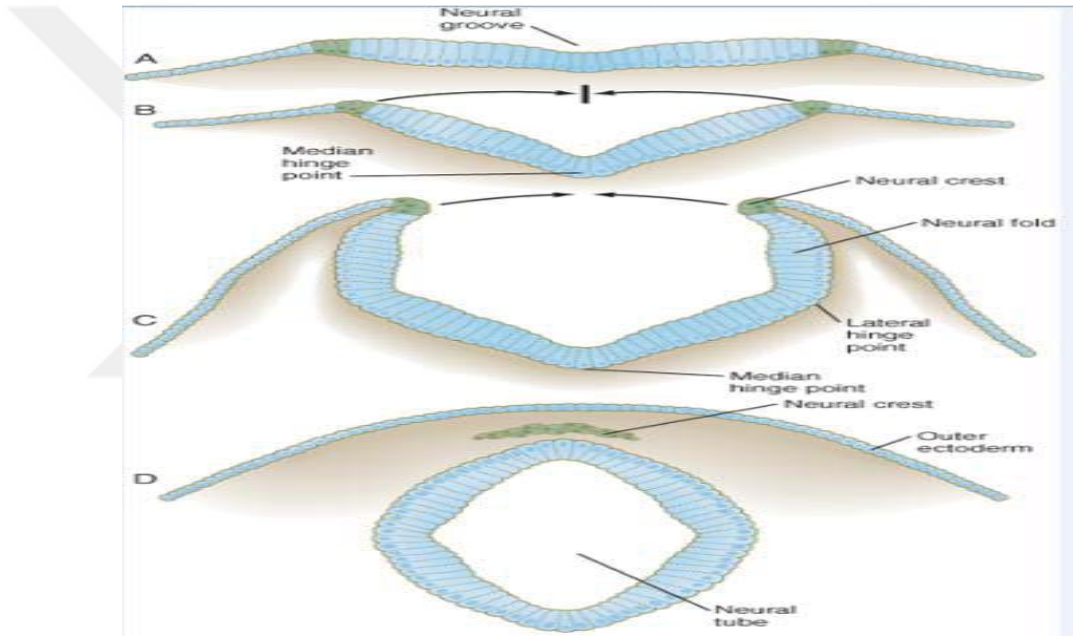
1.3.Sinir Sistemi Embriyolojisi

3. haftanın başı ile 8. haftanın sonu arasında devam eden embriyonik dönem; ektoderm (dış), mezoderm (orta) ve endoderm (iç) olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır. Organogenez dönemi olarak adlandırılan bu dönemin katmanlarının farklılaşmasıyla çeşitli organlar oluşmaktadır;

- Ektoderm: deri ve sinir sistemi
- Mezoderm: iskelet, kas sistemi ve bağ dokusu

- Endoderm: sindirim, solunum ve genitoüriner sistemleri oluşmaktadır (Eşrefoğlu, 2017).

Sinir sistemi, 3. haftanın başlarında embriyo 4-6 somit evresindeyken primitif düğümün önünde kalınlaşmış bir ektodermal plak olan nöral plak halinde belirmektedir. İlk olarak nöral plağın lateral kenarları, yukarı doğru kıvrılarak nöral katlantılar oluşturmaktadır. Gelişimin daha ileri dönemlerinde ise nöral katlantılar birleşerek nöral tüpü (kanalis nöralis) oluştururlar ve nöral tüpün oluşmasıyla 4. hafta evresi sona erer (Şekil1.7)



Şekil 1.7. Nöral tüp oluşumu (Carlson, 2009).

Nöral tüpün kapanmasından yani nöral katlantıların birbirlerine doğru yükselip kaynaşması sırasında nöroektodermin lateral sınırındaki hücreler mezoderm içine göç ederler. Bu göç sırasında epitelyal özelliklerini kaybedip mezenşimal hücrelere dönüşürler. Bu hücre topluluklarına nöral krista denir. Nöral kristadan gelişen yapılar; periferik sinirler, glia hücreleri, ganglionlar, meninksler, melanositler, odontoblastlar, adrenalmedulla hücreleri ve C hücreleridir (Eşrefoğlu, 2017).

Nöral tüpteki kaynaşma servikal, kaudal ve sefalik yönde gerçekleşir. Kaynaşma tamamlanana kadar sefalik ve kaudal uçları amnion boşluğuyla olan ilişkisini sürdürmektedir. Bunu kranial ve kaudal nöroporlar aracılığıyla sağlamaktadır. Kranial nöropor 25. günde, kaudal nöropor ise 27. günde kapanmaktadır. Nöroporların kapanması ile nörolasyon tamamlanmaktadır (Sadler, 2011). Kapanmadan sonra sinir sisteminin dar olan kaudal bölümünden spinal kord, daha geniş olan kranial bölümünden ise beyin vezikülleri oluşmaktadır (Eşrefoğlu, 2017). Beyin veziküllerinin ise prosensefalon (ön beyin), mezensefalon (orta beyin) ve rombensefalon (arka beyin) olmak üzere üç dilatasyon bölgesi vardır (Sadler, 2011).

Beynin kompakt yapısı nedeniyle beyin bölümlerinde kıvrımlar yani fleksura oluşumu meydana gelir. Mezensefalon bölgesinde meydana gelen fleksura kranialis ventralis, rombensefalon ile medulla spinalis arasındaki fleksura ise fleksura servikalis denir.

Prosensefalon; Kranial bölümü genişleyerek iki tarafa doğru lateral çıkıntılar oluşturur. Bunlara telensefalon denir. Bu bölgelerden paleokorteks, korpus striyatum ve neokorteks beyin hemisferleri gelişir. Kaudal bölümünden ise diensefalon meydana gelir (McGeady ve ark., 2011). Diensefalondan; epitalamus, talamus, hipotalamus ve infundibulum yapıları meydana gelmektedir (Eşrefoğlu, 2017).

Mesensefalon; arka beynin en kaudal bölümü hariç ileri dönemlerde önemli bir değişikliğe uğramaz. Buradan tektum, tegmentum ve cerebral pedinküller gelişmektedir (Moore ve Persaud, 2009).

Rhombonsefalon; kranial kısmı metensefalon, kaudal kısmı ise miyelensefalon olmak üzere iki kısımdan oluşur (Sadler, 2015). Metensefalon olarak adlandırılan ön bölümden dorsalde yerleşen cerebellum ve ventralde yer alan pons olmak üzere iki yapı farklılaşır. Arka bölüm olan miyelensefalondan ise medulla oblongata gelişir (McGeady ve ark., 2011).

Medulla Spinalis; 4. somit çiftinin kaudal kısmında kalan nöral tüpten gelişmektedir (Moore ve Persaud, 2009). Nöral tüpün duvarı nöroepitelyal hücreler içerir. Bu nöroepitelyal hücreler nöroblastlara farklılaşarak, hücrelerin dış kısmına göç ederler ve burada yeni bir tabaka olan manto tabakasını oluştururlar. Manto tabakasında yer alan nöroblastlardan çıkan sinir liflerini içeren tabaka oluşur. Bu da marjinal tabaka olarak adlandırılır. Marjinal tabaka içindeki aksonların miyelizasyonu ile substansia alba oluşur.

Glioblastlardan farklılaşan glia hücreleri de ventriküler tabakadan manto ve marjinal tabakaya göç ederler. Burada sinir lifleri ve nöronlar arasına yerleşirler (Sadler, 2011). Bazı glioblastlar astrositlere ve oligodendrositlere dönüşür. Nöroepitel hücreler, nöroblastları ve glioblastları oluşturduktan sonra ependim hücrelerine farklılaşırlar. Bu ependim hücreleri ise medulla spinalisin santral kanalına yerleşirler (Moore ve Persaud, 2009).

1.4. Kanser

Vücudumuzdaki organlar hücrelerden meydana gelmektedir. Kas ve sinir hücreleri dışındaki tüm sağlıklı vücut hücreleri bölünebilme yeteğine sahiptir. Her hücrenin hayatı boyunca belli sayıda bölünebilme yeteneği vardır. Buna karşın kanser hücreleri bu yeteneği kaybeder ve kontrolsüz bölünmeye başlayıp sınırsız çoğalırlar (Kutluk ve Kars, 1992). Hücrelerin bu şekilde anormal hızda büyümeleri ve çoğalmaları tümör adı verilen kitle oluşumuna neden olmaktadır (Cooper, 1992). Tümörler malign (kötü) huylu ve benign (iyi) huylu tümör olmak üzere ikiye ayrılırlar (Hanahan ve Weinberg, 2000). Eğer tümörler bulunduğu bölge dışında yerleşme eğilimi göstermiyorsa bunlara benign, bulunduğu yerden diğer doku ve organlara yayılma eğilimi gösteriyorsa bunlara da malign tümör denir (Kutluk ve Kars, 1992).

Kanser klonalite, otonomi, anaplazi ve metastaz yapma özellikleri ile tanımlanabilecek bir hastalık grubudur (Barry ve Dennis, 2012). Tüm kanserler,

DNA dizisindeki anormalliklerden meydana gelmektedir. %10- 15'i kalıtsal olup geriye kalan % 85- 90'nı DNA'nın mutajenlere maruz kalması, progressif değişikler ve replikasyonda meydana gelen hatalardan oluştuğu düşünölmektedir (Yokuş ve akır, 2012).

Farklı tipteki kanserler farklı hızlarda büyörlö, farklı yayılma biçimleri gösterir ve farklı tedavilere cevap vermektedirler. Bundan dolayı kanser hastalarına, kanser türüne göre farklı tedaviler uygulanır (Kutluk ve Kars, 1992).

Çalışmamızın ana materyali değişik kanser türlerinden biri olan ve mortalitesi yüksek bir malign tümör olan glioblastoma multiformedir. Bu alışmamızda bu tümörlerden izole edilmiş YKG-1 hücre hattında melatonin ve 13-cis-retinoik asidin sitotoksik etkisi ve klinik tedavilere olası katkıları araştırılmıştır.

1.4.1. Beyin Tümörleri

Beyin tümörleri tüm kanserlerin % 1,5'ini oluştururken kansere bağlı tüm ölümlerin ise %2'sine neden olmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda MSS tümörlerinde hızlı bir artış olduğu görölmüştür (Blumenthal ve Schulman, 2005). MSS tümörleri 20'li yaşlardan 70'li yaşlara kadar artış gösterip sonrasında azalmaktadır. Erkeklerde bayanlara oranla daha fazla olduğu görölmüştür (Sarkar ve ark., 2009).

Beyin tümörleri primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılırlar. Primer tümörler kafa içerisinde bulunan glial dokudan, nöronlardan, meninkslerden, damarlardan veya endokrin hücrelerden kaynaklanırlar. Yetişkinlerde en çok görölen beyin tümörü gliom'dur (Weil, 2006). Tüm glial tümörlerin %80-85'ini astrositomlar oluşturmaktadır. Astrositomlar histopatolojik görönmelerine göre 4 dereceye ayrılırlar ve GBM derece 4 astrositom olup en malign tümördür (Kleihues ve ark., 2007).

1.4.1.1. Glioblastoma Multiforme (GBM)

GBM başlıca serebral hemisferlerde yerleşim gösteren infiltran tümör olup en sık tutunduğu lokalizasyon frontal, en az tutunduğu lokalizasyon ise oksipital lob'dur (Kleihues ve ark., 2007; Louis ve ark., 2007).

GBM tüm intrakranial tümörlerin % 12-15'ini, astrositik tümörlerin ise % 50-60'nı oluşturur (Levin ve ark., 2001). En malign tümör olup erişkinlerde sık görülmektedir (Rosell ve ark., 2008). Çocukluk yaşlarda görülmeleri nadir olup erkeklerde daha fazla görülmektedir (Iacob ve Dinca, 2009).

GBM'ye neden olan etmenler tam belli olmayıp radyasyon, sigara, elektromanyetik dalgalar, alerji, viral enfeksiyon ve genetik yatkınlık gösterilmektedir (Blumenthal ve Schulman, 2005).

1.5. Melatonin

Kimyasal formülü N-asetil-5-metoksitriptamin olan melatonin küçük ve lipofilik bir yapıda olup pineal bezden (epifiz) salgılanmaktadır.

Melatonin yaş, çevresel ve hormonal gibi faktörlere bağlı olarak salınımı değişmektedir. Örneğin; ortam ışıklandırmasına duyarlı olan bu hormon geceleri gündüze göre 7-10 kat daha fazla salınım göstermektedir.

Vücut hücrelerinde reseptörü bulunan melatonin kronobiyolojik, uyku, kan basıncı düzenleyici, antioksidan, immün destekleyici, üreme fonksiyonları düzenleyici ve kanser önleyici olarak işlev ve etkileri olan bir hormondur (Topal ve ark, 2009).

Son dönemdeki çalışmalarda melatoninin hem nöroprotektif hem de antioksidan etkilerinin olduğu ortaya çıkmıştır (Lo'pez ve ark, 2002). Aynı zamanda nöroendokrin fonksiyonların düzenlenmesinde de rol oynamaktadır (He ve ark, 2016).

Melatonin'in yapılan bazı in vivo ve in vitro çalışmalarda tümör hücresi aktivitesinde rol oynayan telomeraz aktivitesini de azalttığı görülmüştür (Jung ve Ahmad, 2006).

1.6. 13- cis Retinoik Asit

Vitamin A türevi olan 13- cis Retinoik asit tıpta dermatolojik tedaviler başta olmak üzere değişik amaçlarla kullanılmaktadır (Ponthan ve ark, 2001). Retinoik asit ve türevleri (retinoidler) hücre farklılaşması, apoptotiz uyarıcı etkileri yanında, anti-oksidan ve anti-proliferatif etkilerinden dolayı kemoterapötik ajanlar olarak kullanılmaktadır (di Masi ve ark, 2015).

Temel bilimsel ve klinik araştırmalarda malign beyin tümörü olan hastalara 13- cis retinoik asit uygulanmış ve ortaya çıkan sonuçlarda 13-cis retinoik asitin malign gliomalara karşı aktiveye sahip olduğu görülmüştür (Yung ve ark, 1996; See ve ark, 2004).

Retinoik asitin yağda eriyen özelliği nedeniyle vücuttan atılımı zordur. Bundan dolayı eksikliği yanında fazla alımı da serebral problemler başta olmak üzere değişik klinik tablolara sebep olmaktadır (Ponthan ve ark, 2001).

1.7. Telomeraz

Telomerler, ilk defa 1938'de Muller tarafından tanımlanmış olup ökaryotik kromozomların uçlarında yer alırlar. Türler arasında farklılık gösteren (Tetrahymena' da "GGGGTT", insan ve diğer memelilerde ise "TTAGGG" dir) çok sayıda "TTAGGG" dizi tekrarı içeren heterokromatik yapıya sahiptirler (Holt ve ark, 1997).

Telomeraz, kromozomal uçlardaki "TTAGGG" tekrarlarının sentezinden sorumlu olan, germline dokularında ve tümörlü hücrelerde telomer uzunluğunun muhafaza edilmesine katılan ribonükleoprotein yapıdaki özel bir DNA polimerazdır (Hiyama K1 ve ark, 1995; Wright WE ark, 1996). Bu enzim embriyonik hücreler ve

erişkin kök hücrelerinde aktif olup, somatik hücrelerde saptanmamaktadır. İmmortal (ölümsüz) tümör hücrelerinde ise yeniden aktive olmaktadır (Gorham ve ark, 1997). Telomeraz aktivitesine sahip bu tür hücrelerde, hücre bölünmesinde meydana gelen telomer kaybı telafi edilir ve hücrenin bölünmeye devam etmesi sağlanır. Bu şekilde sabit kromozom uzunluğu korunmaktadır. Bu korunan kromozom uzunluğunun, hücresel yaşlanmayı engellediği ve kromozom dayanıklılığı sağladığı kabul edilmektedir.

Yapılan çalışmalarda, birçok tümör çeşidinin taranması telomeraz aktivitesi ile malignensi arasında güçlü bir ilişkinin olduğunu göstermiştir (Özdemir ve ark, 2004). Örneğin; telomeraz aktivitesi, hematolojik malignensilerin % 67- 100'ünde, primer akciğer karsinomalarının % 80'inde, prostat karsinomalarının % 78- 84'ünde, beyin tümörlerinin % 66-94'ünde, meme karsinomalarının % 93'ünde belirlenmiştir (Mu ve ark, 1999).

Bu da immortal tümoral hücrelerde telomerazın reaktif olduğunu göstermektedir (Shay ve Wright, 1996).

Çalışmamızın amacı; glioblastoma multiforme hücre hattında 13-cis-retinoik asid ve melatonin'in saf ve kombine dozlarda kullanımında hücrelerin viabiliteleri üzerine olan etkilerini araştırmak ve bu hücrelerde telomeraz aktivitesini değerlendirmektir. Bunun yanında bu hücrelerde Caspase 3, Beclin 1 ve apoptotik hücre ölümlerinin düzeyini belirlemektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Etik Kurul

Çalışmamız kapsamında öncelikle Afyon Kocatepe Üniversitesi İnsan Etik Kurulu'ndan (AKÜİEK) etik çalışma onayı alındı (17.10.2017 tarih ve 2017/254 sayılı).

2.2. Kimyasallar

- Hücre hattı YKG1 (TKG 0453, Riken, Japan)
- Telomeraz (Trapeze XL Telomerase Detection Kit, S7707, USA& Canada)
- Tunel Apoptosis Assay Kit (TAAP01D)
- Melatonin (Alfa Aesar, Germany)
- 13-cis retinoikasit (m.w.300.44, Canada)
- RPMI 1640 (Capricorn, Almanya)
- MTT (A2231, Applichem)
- FBS (F9665, Applichem)
- Penicillin Streptomycin (P4333, Applichem)
- Primer hücre antikorları; Caspase 3 (ab4051) (Abcam, UK), BECN1 (H-300, USA) (1/50 dilüsyon yapılarak kullanıldı)
- Sekonder kit; Large Volume HRP Polymer (RTU), (Thermo, USA)
- Large Volume Vision Mount (Thermo, USA)
- AEC Single/ Plus (Abcam, UK)
- PBS, Sigma (USA)
- Tween 20, (Merck, Almanya)
- Mayer's Hematoxylin, (Thermo, USA)
- Hydrogen Peroxide %35, (Merck, Almanya)
- Metanol, (Merck, Almanya)
- Volume UltraAb Diluent, (Thermo, USA)

- Hydrophobic Pap-Pen, (Japonya)
- Su Bazlı Kapatma Solüsyonu, Thermo (USA)

2.3. Deney Grupları

Çalışmamızda kullanılan 13-cis Retinoik asit ve Melatonin ayrı ayrı ve birlikte olmak üzere 96 well-platelerde hücre hattı kültür ortamına konuldu. Etken maddelerin bireysel etkileri ve bunun yanında birbirlerine olan etkileri test edildi. Bu amaçla farklı 16 grup oluşturuldu. Bu gruplar sırasıyla;

G0 : Kontrol

G1 : Melatonin 0,5 mM

G2 : Melatonin 1 mM

G3 : Melatonin 2 mM

G4 : 13-cis retinoik 1 μ M

G5: 13-cis retinoik 5 μ M

G6 : 13-cis retinoik 10 μ M

G7 : 13-cis retinoik 1 μ M+ Melatonin 0,5 mM

G8 : 13-cis retinoik 1 μ M+ Melatonin 1 mM

G9 : 13-cis retinoik 1 μ M+ Melatonin 2 mM

G10 : 13-cis retinoik 5 μ M+ Melatonin 0,5 mM

G11 : 13-cis retinoik 5 μ M+ Melatonin 1 mM

G12 : 13-cis retinoik 5 μ M+ Melatonin 2 mM

G13 : 13-cis retinoik 10 μ M+ Melatonin 0,5 mM

G14 : 13-cis retinoik 10 μ M+ Melatonin 1 mM

G15 : 13-cis retinoik 10 μ M+ Melatonin 2 mM

2.4. Hücre Kültürü

YKG1 hücre hattından 40000/cm² hücre yoğunluğu olacak şekilde alınan örnek %20 FBS ve %80 RPMI 1640, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), ve 10 mM HEPES içeren flasklarda 37°C, %5 CO₂ ve %95 hava içeren inkübatörde inkübe edilip konfluens sağlandıktan sonra 75 cm²'lik flasklara 20 ml besi yeri içinde 3x10⁶ hücre olacak şekilde kültür kaplarına ayrıldı ve 2 gün süreyle inkübe edildi. Süspansiyon steril kapaklı tüplere aktararak 400xg ve 4°C'de 5 dakika santrifüj edilerek hücre peleti elde edildi. Bu peletten 2x10⁴ hücre/ml de olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonundan 100 µl alınıp 96 kuyulu hücre kültürü kaplarının her kuyucuğuna aktararak MTT hücre viabilite testi uygulandı. Aynı peletin bir kısmı 1 cc besi yeri ile tekrar süspanse edildikten sonra immunositokimyasal boyama yapıldı.

2.4.1. MTT Hücre Viabilite Ölçüm Testi

2x10⁴ hücre/ml de olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonundan 100 µl kadar alınıp 96 kuyulu hücre kültürü kaplarının her kuyucuğuna aktarıldı. Melatonin ve 13-cis-retinoik asitin saf ve kombine dozları uygulanmak suretiyle 37°C'de inkübe edildi ve sonrasında her bir kuyucuğa 20 µl MTT boyası (5 mg/ml) ilave edildi ve hücreler 37°C'de 2 saat daha inkübe edildi. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılıp ve her bir kuyuya 200 µl DMSO eklenerek 10 dakika daha inkübe edildi. Renk değişimi, mikropleyt okuyucuda 540 nm dalga boyu ile spektrofotometrik olarak belirlendi. Bileşen ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edildi, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edildi (Denizot ve Lang, 1986).

2.4.2. İmmünohistokimyasal Boyama

- Her bir kriyovial içerisinde 1,5x10⁶ ml hücre alındı.
- Polilizinli lamlara PAP-PEN (hidrofobik kalem) ile kuyucuklar çizildi.

- Her bir kuyucuğa 15 µl olacak şekilde kültüre edilmiş YKG-1 tümör hücreleri damlatıldı.
- Hücrelerin lama yapışması için oda ısısında kurumaya bırakıldı.
- Hücre membranını açıp porları daha geçirgen hale getirmek için kuyucuklara PBS ile hazırladığımız % 0,2'lik Tween 20 damlatılıp 20 dakika bekletildi.
- Lamlar 2x3'er dakika olacak şekilde PBS ile yıkandı.
- 10 dakika %3 Metanol + Hidrojen peroksitte bekletilerek preparatlardaki endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi sağlandı.
- Lamlar 2x3'er dakika olacak şekilde PBS ile yıkandı.
- Hücrelere 1/50 oranında sulandırılarak hazırladığımız Caspase 3 ve Beclin primer antikorları damlatılıp bir gece buzdolabında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası preparatlar oda ısısında 10 dakika bekletildi.
- Lamlar 2xPBS ile yıkandı.
- Primary Antibody Enhancer solüsyonu damlatılıp 10 dakika bekletildi.
- Lamlar 2xPBS ile yıkandı.
- HRP Polymer damlatıldı ve 15 dakika bekletildi.
- Lamlar 2xPBS ile yıkandı.
- Renklendirme işlemi için AEC solüsyonu damlatılarak 10 dakika bekletildi.
- Lamlar 2xdistile suyla (dH₂O) yıkandı.
- Mayers Hematoksilen ile 50 saniye bekletilerek zıt boyama yapıldı.
- Lamlar distile su (dH₂O) ile iyice yıkandı.
- Su bazlı kapatma solüsyonu ile kapatıldı.

2.4.3. TdT-dUTP nick-end-labelling (Tunel) Boyama

- Polilizinli lamlara PAP-PEN (hidrofobik kalem) ile kuyucuklar çizildi.

- Her bir kuyucuğa 15 µl olacak şekilde kültüre edilmiş YKG-1 tümör hücreleri damlatıldı.
- Hücrelerin lama yapışması için oda ısısında kurumaya bırakıldı.
- Rehydrate edildi.
 - %100' lük alkol 5 dk
 - %90'lık alkol 3 dk
 - %80'lik alkol 3 dk
 - %70'lik alkol 3dk
 - PBS 3 dk
- %3'lük Hidrojen peroksitte 4 dk bekletildi.
- PBS 3x2 dk
- Permeabilizasyon
 - PBS Tween 20'de hazırlamış olduğumuz %0.2'lik Triton X damlatılıp 30 dk bekletildi.
 - Yıkama yapılmadan Proteinaz K 50 µl damlatılıp 7 dk bekletildi.
- PBS 3x2 dk
- TDT Reaction buffer damlatılıp 10 dk bekletildi.
- Daha sonra yıkamadan TDT Reaction mixture damlatılıp 90 dk 37 °C'lik etüvde bekletildi.
 - Hazırlanması TDT enzim reagent 5 µl + TDT label reagent 45 µl
- PBS 3x2 dk
- 50 µl Background reducing buffer damlatılıp 30 dk oda ısısında bekletildi.
- PBS 3x2 dk
- 50 µl mouse antıdığ damlatılıp 60 dk 37°C'lik etüvde bekletildi.
- PBS 3x2 dk
- 50 µl HRP polimer damlatılıp 30 dk bekletildi.
- PBS 3x2 dk
- DAB chromogen / DAB buffer damlatılıp 15 dk bekletildi.
 - DAB hazırlanışı; 1ml DAB buffer+ 30 µl DAB kromojen

- Daha sonra yıkamadan mayers hematoksilen damlatılıp 1 dk bekletildi.
- Akarsu altında 2x3 dk bekletildi.
- %95 etanolde 2x5 dk bekletildi.
- Xylene 2x5 dk bekletildi.
- Entellan ile kapama işlemi yapıldı.

2.4.4. Telomeraz Analizi

TRAPEze® XL Telomerase Detection Kit S7707 prosedürüne göre yapılmıştır.

2.4.5. Preparatların Değerlendirilmesi ve Görüntü Analizi

İmmünohistokimyasal ve TdT-dUTP nick-end-labelling (Tunel) olarak yapılan boyamalar Işık Mikroskopunda (Nikon E-600) x40 objektif altında Nikon NIS 4.2 Image Analysis Software aracılığıyla sayıldı. Her preparatda rastgele alanlarda immünopozitif ve immünonegatif olmak üzere toplam 500 hücre sayıldı. İmmünopozitif/immünonegatif hücreler oranlanmak suretiyle elde edilen değerler istatistiksel analizde kullanıldı. Bu sayım sürecinde toplamda immünohistokimya boyamada 48000 hücre, Tunel boyama da ise 8000 hücre sayımı gerçekleştirildi.

2.4.6. İstatistiksel Analiz

İmmünohistokimyasal sayımlardan elde edilen oranlar SPSS for Windows 21.0 ticari istatistik analiz yazılımı ile analiz edildi. Gruplar arası farklılıkların belirlenmesinde Kruskal Wallis (H Testi) kullanıldı (Tablo 3.3). Test sonucunda farklılık oluşturan grup ya da grupların belirlenmesinde çoklu karşılaştırma testlerinde Dunn Testi kullanıldı. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

TdT-dUTP nick-end-labelling (Tunel) boyama sayımlarından elde edilen oranlar SPSS for Windows 21.0 ticari istatistik analiz yazılımı ile analiz edildi. Gruplar arası farklılıkların belirlenmesinde Kruskal Wallis (H Testi) kullanıldı. Test sonucunda farklılık oluşturan grup ya da grupların belirlenmesinde chi-square (ki-kare) testi kullanıldı.

3. BULGULAR

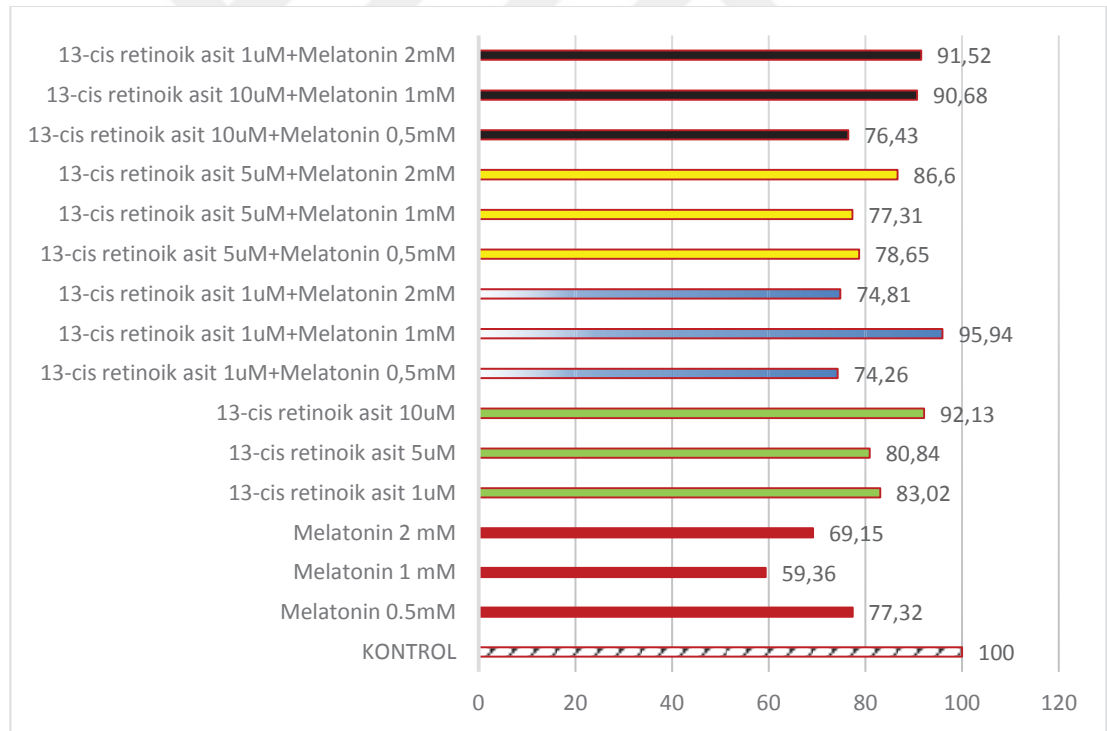
3.1. MTT test sonuçları

YKG-1 GBM hücre hattında farklı ve saf dozlarda 13-cis retinoik asit ve melatonin yanında aynı maddelerin kombine doz uygulaması MTT testi sonuçlarına göre bütün gruptaki hücre viabilitesini azaltmaktadır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. YKG-1 hücre kültüründe farklı dozlarda uygulanan melatonin ve 13-cis retinoik asitin gruptaki viabilite oranları

GRUPLAR	Mtt Testi Hücre Viabilite Oranları
Kontrol	100
Melatonin 0.5mM	77,32
Melatonin 1 mM	59,36
Melatonin 2 mM	69,15
13-cis retinoik asit 1uM	83,02
13-cis retinoik asit 5uM	80,84
13-cis retinoik asit 10uM	92,13
13-cis retinoik asit 1uM+Melatonin 0,5mM	74,26
13-cis retinoik asit 1uM+Melatonin 1mM	95,94
13-cis retinoik asit 1uM+Melatonin 2mM	74,81
13-cis retinoik asit 5uM+Melatonin 0,5mM	78,65
13-cis retinoik asit 5uM+Melatonin 1mM	77,31
13-cis retinoik asit 5uM+Melatonin 2mM	86,6
13-cis retinoik asit 10uM+Melatonin 0,5mM	76,43
13-cis retinoik asit 10uM+Melatonin 1mM	90,68
13-cis retinoik asit 10uM+Melatonin 2mM	91,52

Bunlardan ilki farklı dozlarda saf melatonin uygulanan gruplardaki GBM hücre viabilitesinde dikkati çeken bir azalma olduğu ki bu melatoninin terapötik etkinliğini gösteren önemli bir bulgu olarak değerlendirildi. Diğer yandan hücre viabilite oranının bilhassa grup 2 (melatoninin 1mM)'de en çok düştüğünü gözlemledik. Bu etkinin doza bağlı olarak artış göstermemesi önemli bir bulgu olarak değerlendirildi. Çalışmamızda YKG-1 GBM hücre hattına saf olarak farklı dozlarda 13-cis retinoik asit uygulamasında hücre viabilitesinin çok değişmediği ve sitotoksik etkisinin belirgin olmadığı belirlendi. Ayrıca bu etkinin melatoninde retinoik aside göre çok daha belirgin olduğu görülmüştür. Çalışmamızda kombine dozlar uygulanan gruplarda hücre viabilitesinin çok düşmediği gözlenmiştir. Bunun yanında 8.grupta (1µM 13-cis retinoik asit+Melatonin 1mM) hücre viabilitesini neredeyse yok denecek kadar az oranda düşürdüğünü gördük (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. YKG-1 hücre kültüründe farklı dozlarda uygulanan melatonin ve 13-cis retinoik asitin gruplardaki viabilite oranlarının grafik gösterimi

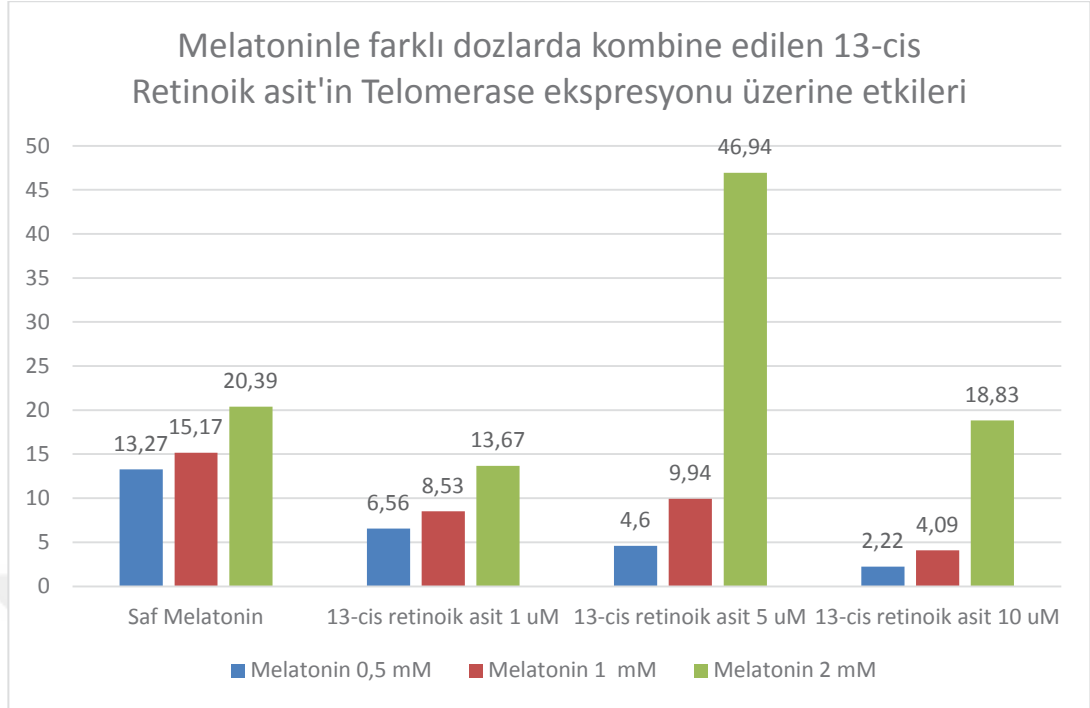
3.1.1.Telomeraz Gen Ekspresyonu sonuçları

Telomeraz gen ekspresyonunda YKG-1 glioblastoma multiforme hücre hattına saf olarak uyguladığımız melatonin ve 13-cis retinoik asitin artan doza bağımlı olarak telomeraz aktivitesini arttırdığını gördük (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Gruplardaki telomeraz gen ekspresyonu değişimi

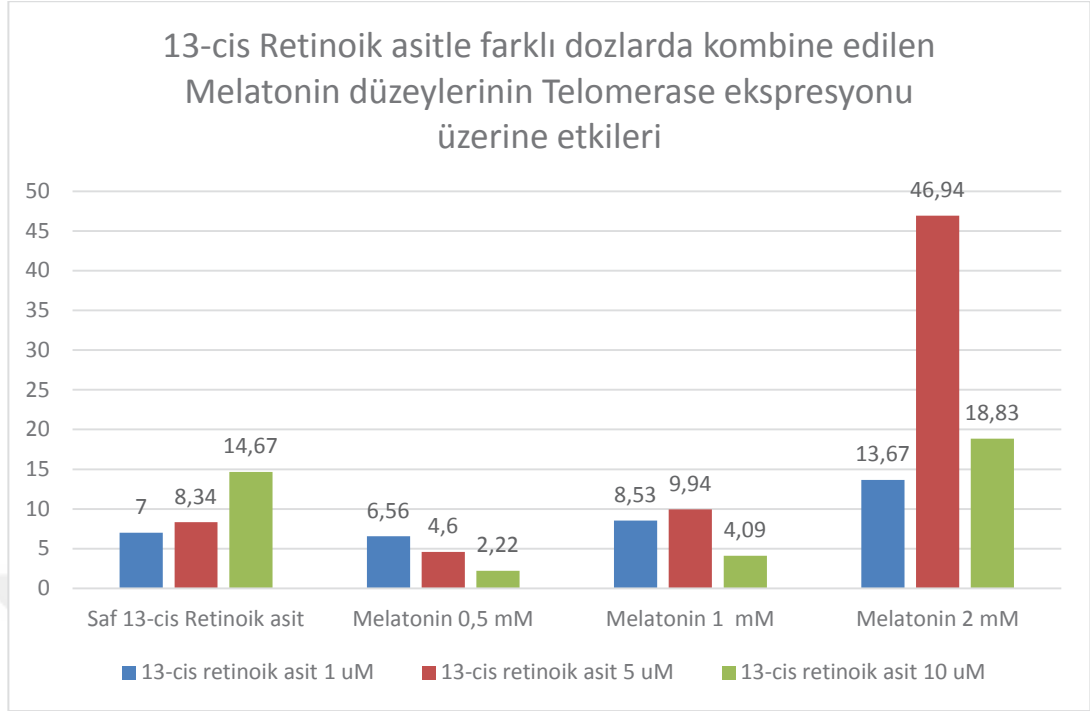
Gruplar	Telomeraz Gen ekspresyonu Misli değişim
Kontrol	1
1.Melatonin 0.5mM	13,26911273
2.Melatonin 1 mM	15,16941132
3.Melatonin 2 mM	20,39297004
4.13-cis retionik 1uM	7,003479688
5.13-cis retionik 5uM	8,342633608
6.13-cis retionik 10uM	14,66940623
7.13-cis ret.1uM+Melat.0,5mM	6,555975563
8.13-cis ret.1uM+Melat.1mM	8,531565403
9.13-cis ret.1uM+Melat.2mM	13,66876011
10.13-cis ret.5uM+Melat.0,5mM	4,603753142
11.13-cis ret.5uM+Melat.1mM	9,93700077
12.13-cis ret.5uM+Melat.2mM	46,94209995
13.13-cis ret.10uM+Melat.0,5mM	2,22049663
14.13-cis ret.10uM+Melat.1mM	4,092012287
15.13-cis ret.1uM+Melat.2mM	18,82709586

Melatonin 13-cis retinoikasitle kombine uygulamasında da telomeraz aktivitesini arttırdığını ki bu değerin grup 12’de (13-cis retinoikasit 5µM+ melatonin 2mM) en fazla olduğu (46,94) görülmüştür (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Graplarda farklı dozlarda melatonin ile kombine edilen 13-cis retinoik asitin telomerez ekspresyonu üzerine olan etkileri

Grup 13'te (13-cis retinoikasit 10µM+ melatonin 0,5mM) ise telomerez aktivitesinin hem saf uygulanan melatonine göre hemde kombine uygulanan dozlara göre telomerez ekspresyonunun en az olduğu (2,22) görüldü (Şekil 3.3). Telomerez gen ekspresyon bulgularına göre 13 cis retinoik asitin bu tip hücre tümör hattında melatoninden daha fazla telomerez baskılayıcı etkisinin olduğu göstermiştir.



Şekil 3.3. Gruplarda farklı dozlarda 13-cis retinoik asit ile kombine edilen melatonin'in telomerase ekspresyonu üzerine olan etkileri

3.1.2. İmmünohistokimyasal Boyama Analiz Sonuçları:

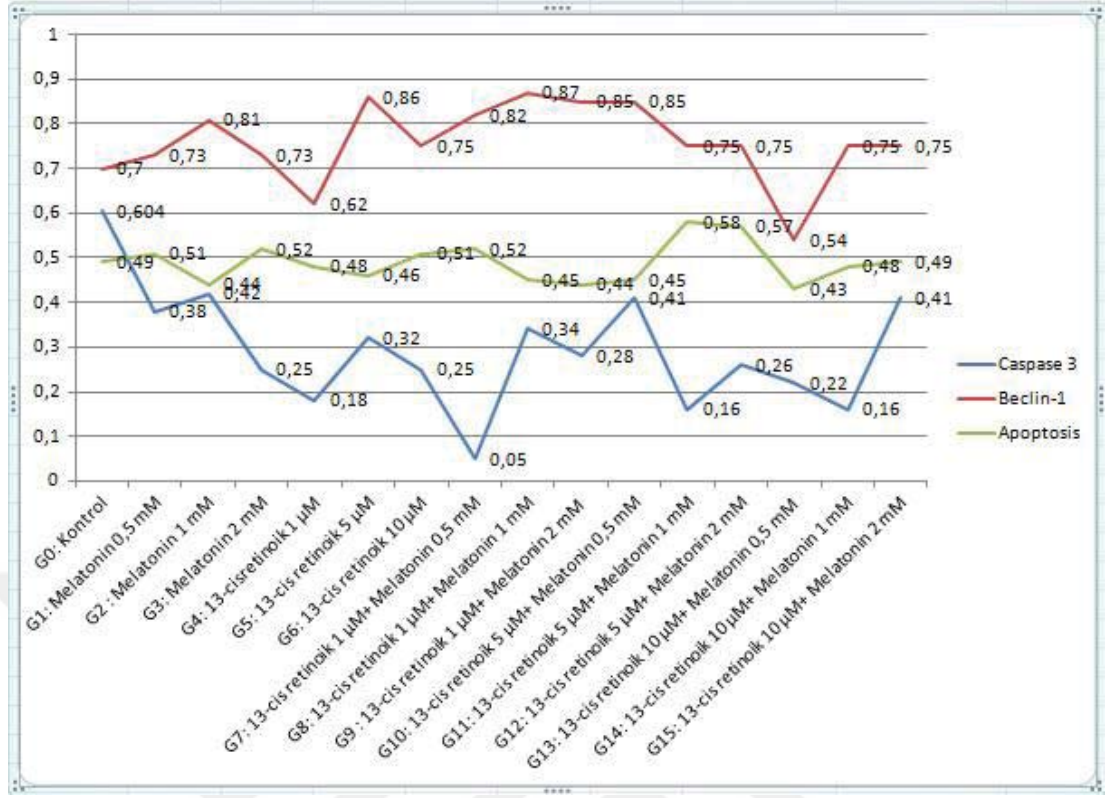
Yapılan caspase 3(cas3) ve beclin 1(becn1) immünohistokimyasal boyamalarının ışık mikroskopik değerlendirmesinde her grupta mevcut olan hücreler sayıldı. İmmünopozitif hücrelerin immünonegatif hücrelere oranı hesaplandı (Şekil 3.4).

Tablo 3.3. Kruskal-Wallis testi sonuçları

GRUP	Caspase 3	Beclin-1
G0: Kontrol	0,56 ± 0,097 (0,604)	0,71 ± 0,02 (0,70)
G1: Melatonin 0,5 mM	0,38 ± 0,053 (0,38)	0,72 ± 0,06 (0,73)
G2 : Melatonin 1 mM	0,45 ± 0,094 (0,42)	0,77 ± 0,12 (0,81)
G3: Melatonin 2 mM	0,29 ± 0,066 (0,25)	0,71 ± 0,04 (0,73)
G4: 13-cisretinoik 1 µM	0,17 ± 0,019 (0,18)	0,63 ± 0,04 (0,62)
G5: 13-cis retinoik 5 µM	0,26 ± 0,14 (0,32)	0,88 ± 0,02 (0,86)

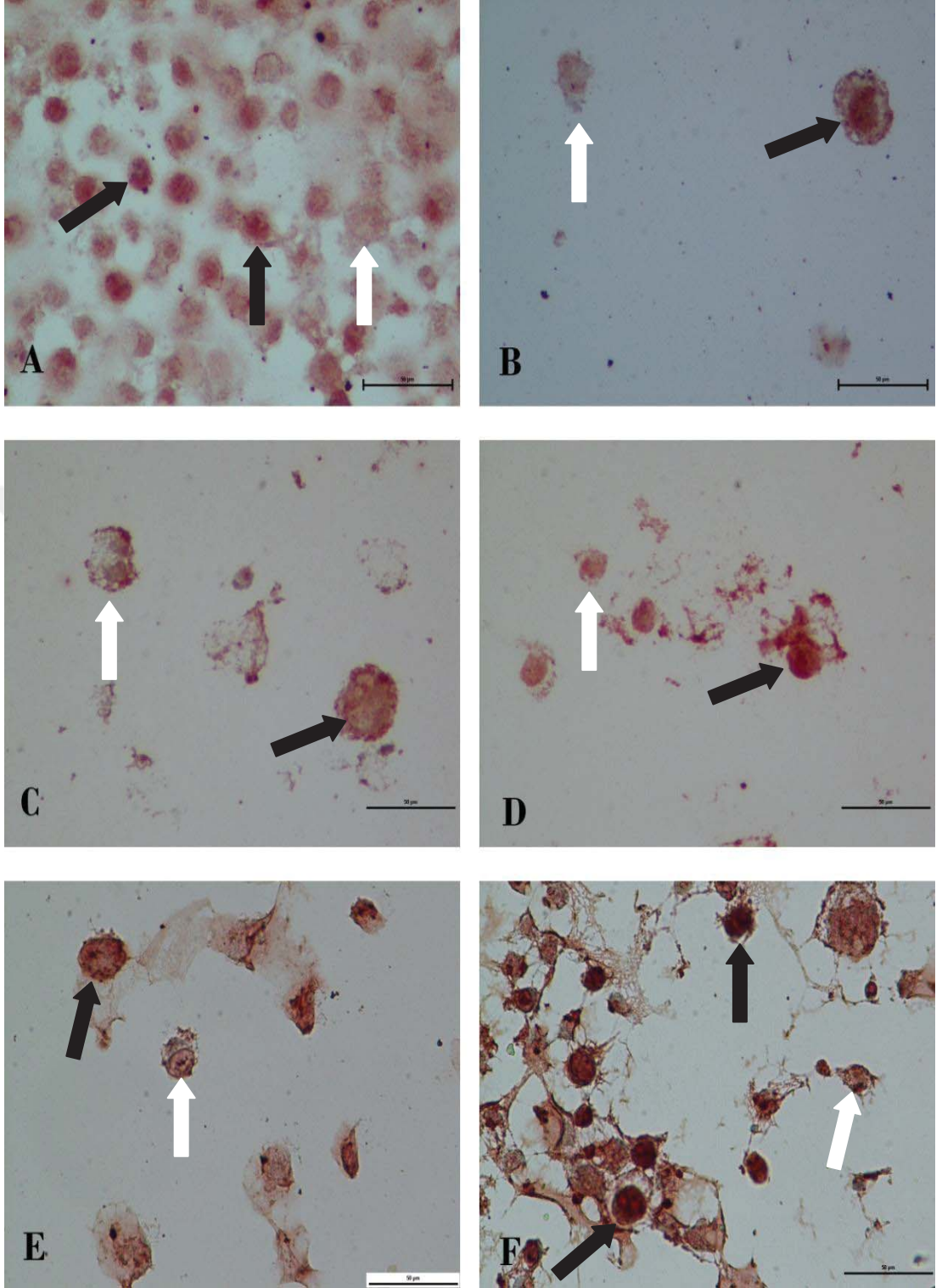
G6: 13-cis retinoik 10 μ M	$0,24 \pm 0,016$ (0,25)	$0,75 \pm 0,02$ (0,75)
G7: 13-cis retinoik 1 μ M+ Melatonin 0,5 mM	$0,048 \pm 0,02$ (0,05)	$0,83 \pm 0,09$ (0,82)
G8: 13-cis retinoik 1 μ M+ Melatonin 1 mM	$0,33 \pm 0,10$ (0,34)	$0,87 \pm 0,02$ (0,87)
G9 : 13-cis retinoik 1 μ M+ Melatonin 2 mM	$0,33 \pm 0,099$ (0,28)	$0,85 \pm 0,02$ (0,85)
G10: 13-cis retinoik 5 μ M+ Melatonin 0,5 mM	$0,44 \pm 0,088$ (0,41)	$0,87 \pm 0,05$ (0,85)
G11: 13-cis retinoik 5 μ M+ Melatonin 1 mM	$0,24 \pm 0,17$ (0,16)	$0,75 \pm 0,04$ (0,75)
G12: 13-cis retinoik 5 μ M+ Melatonin 2 mM	$0,27 \pm 0,03$ (0,26)	$0,77 \pm 0,03$ (0,75)
G13: 13-cis retinoik 10 μ M+ Melatonin 0,5 mM	$0,22 \pm 0,02$ (0,22)	$0,65 \pm 0,04$ (0,64)
G14: 13-cis retinoik 10 μ M+ Melatonin 1 mM	$0,16 \pm 0,01$ (0,16)	$0,54 \pm 0,01$ (0,54)
G15: 13-cis retinoik 10 μ M+ Melatonin 2 mM	$0,42 \pm 0,02$ (0,41)	$0,74 \pm 0,01$ (0,75)

Caspase-3 proteini ekspresyonu değerlendirilmesinde, her grupta düşük düzeylerde ekspresyon olduğu ve bu seviyelerin Beclin-1 ekspresyonu ile karşılaştırıldığında çok düşük düzeylerde olduğu gözlenmiştir. Hücrelerin büyük kısmının ölümünün beclin-1 ekspresyonu sonucu ortaya çıkan otofajik hücre ölümü sonucu olduğu görülmüştür. Caspase 3 ekspresyonunda apoptotik hücre ölüm değerlerinden çok düşük değerlerde olması bize apoptotik hücre ölümünün intrinsek mekanizmalardan olmadığını göstermektedir (Şekil 3.4).



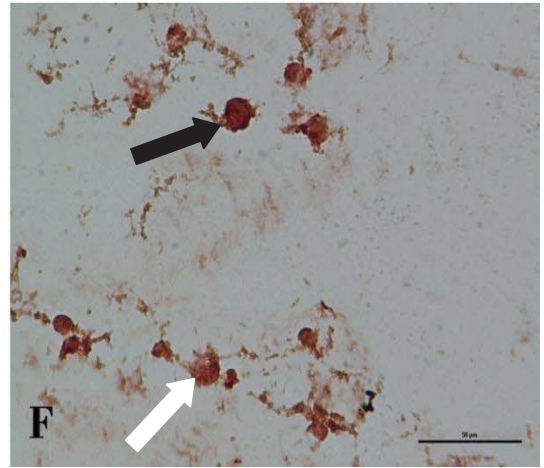
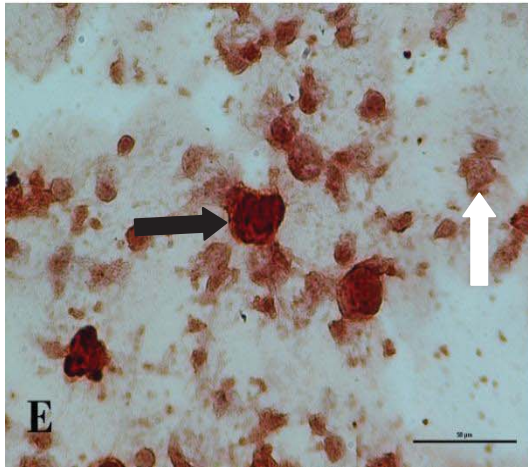
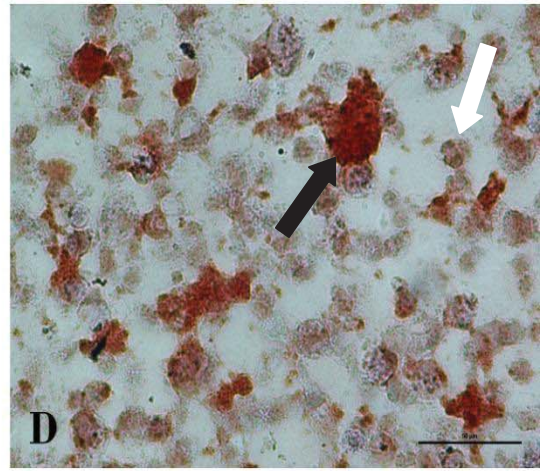
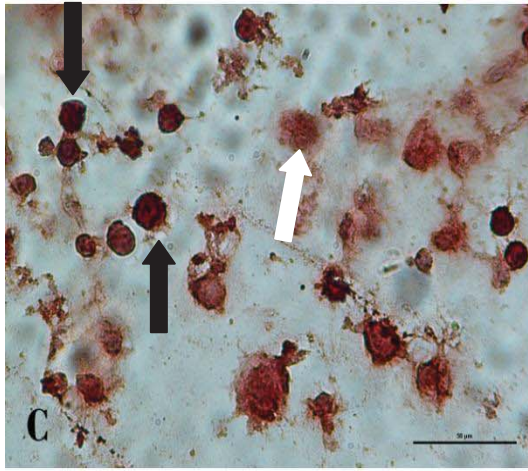
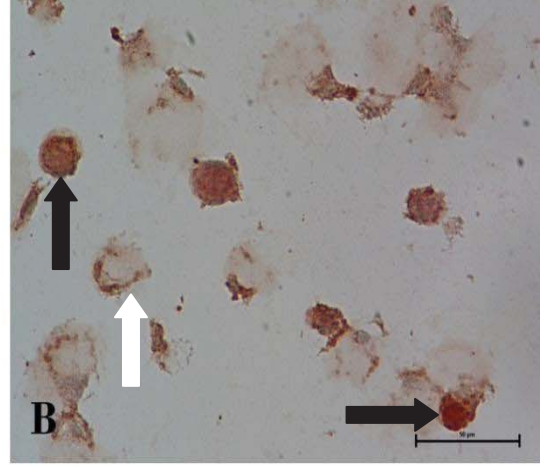
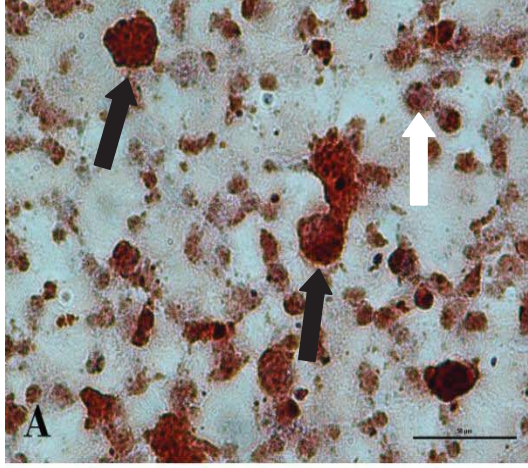
Şekil 3.1. Kullanılan parametrelerde elde edilen immunopozitif ve immunonegatif hücre oranlarının karşılaştırılması

Caspase 3 immünositokimyasal değerlendirme sonuçlarında en yüksek boyanma oranı kontrol grubunda tespit edildi (Şekil 3.4). Grup 7 (13-cis retinoik 1 µM+ Melatonin 0,5 mM)' deki pozitif boyanan hücrelerin negatif hücrelere oranının kontrol, grup 1, 2, 8, 9, 10 ve 15' e göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdiği tespit edildi ($p<0,05$). Grup 4 ve 14 (13-cis retinoik 10 µM+ Melatonin 1 mM)' ün caspase 3 oranının kontrol, grup 1, 2, 10 ve 15' ten daha düşük olduğu ve bu düşüklüğün istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0,05$). Grup 13 (13-cis retinoik 10 µM+ Melatonin 0,5 mM)' ün caspase 3 boyanma oranının kontrol, grup 2, 10 ve 15. gruptan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi. Grup 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13 ve 14 ün caspase 3 boyanma oranlarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık oluşturacak şekilde düşük olduğu tespit edildi ($p<0,05$).



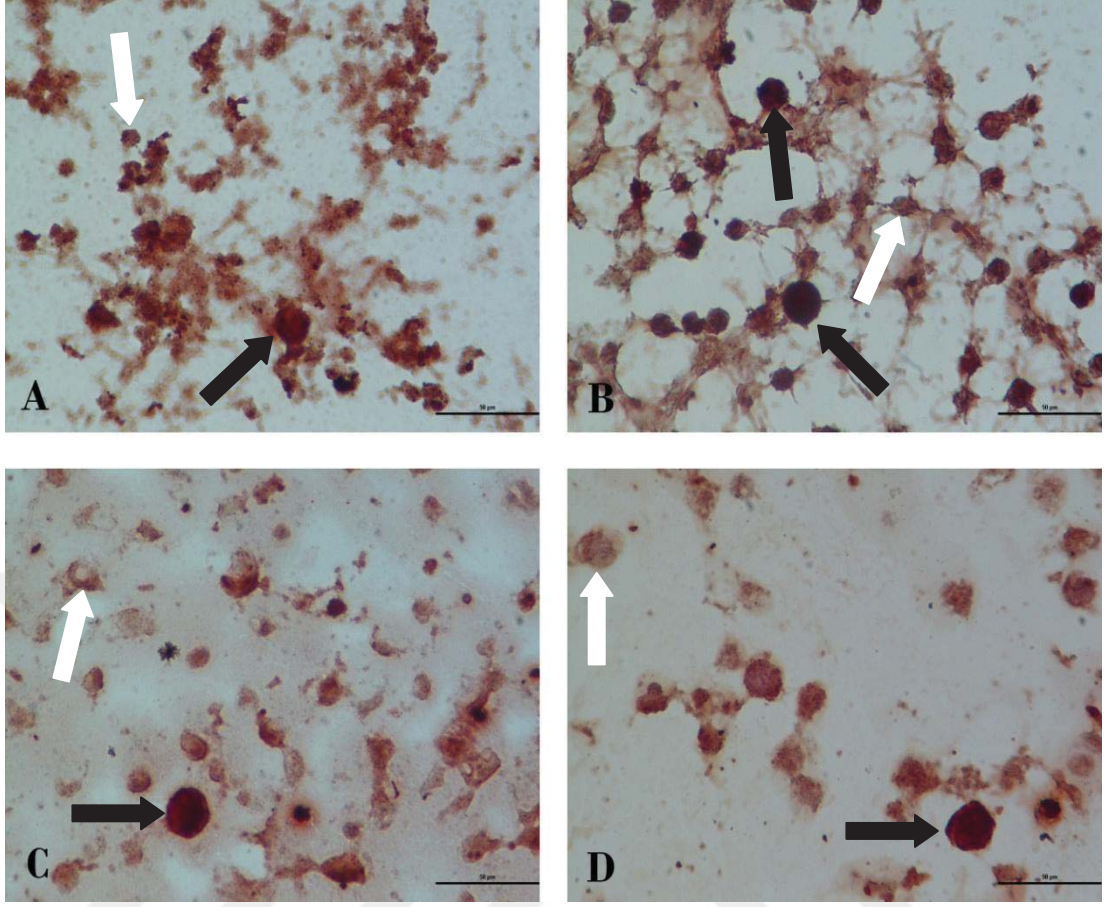
Resim 3.1A. Caspase 3 ekspresyonunun immunositokimyasal olarak gösterimi (Caspase 3, 1/50, x40). **A:** Kontrol grubu, **B:** G1, **C:** G2, **D:** G3, **E:** G4, **F:** G5

(: immüno pozitif hücre, : immüno negatif hücre)

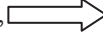


Resim 3.2A. Caspase 3 ekspresyonunun immunositokimyasal olarak gösterimi (Caspase 3, 1/50, x40). **A:** G6, **B:** G7, **C:** G8, **D:** G9, **E:** G10, **F:** G11

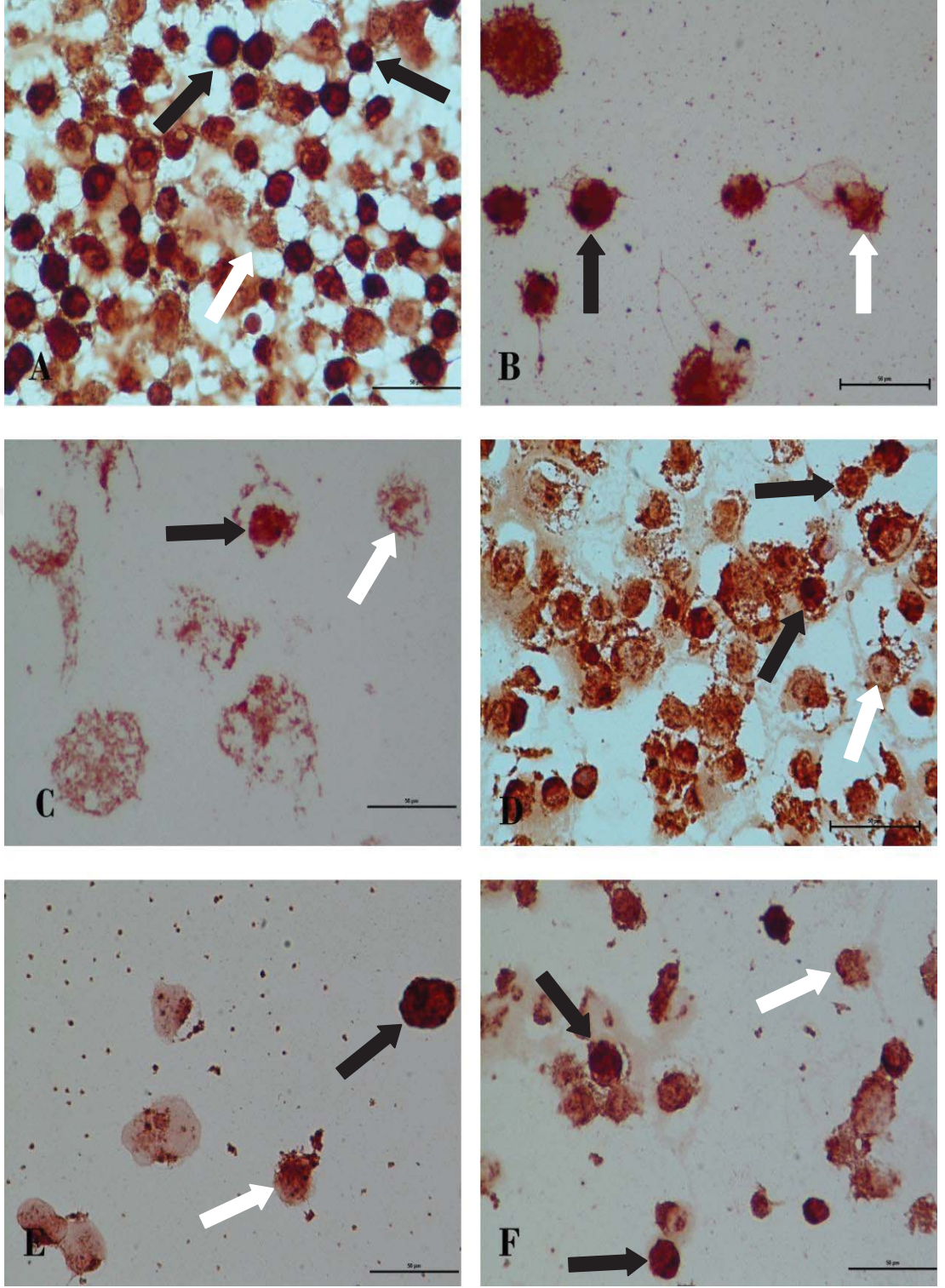
( : immünopozitif hücre,  : immünonegatif hücre)



Resim 3.3A. Caspase 3 ekspresyonunun immunositokimyasal olarak gösterimi (Caspase 3, 1/50, x40). **A:** G12, **B:** G13, **C:** G14, **D:** G15

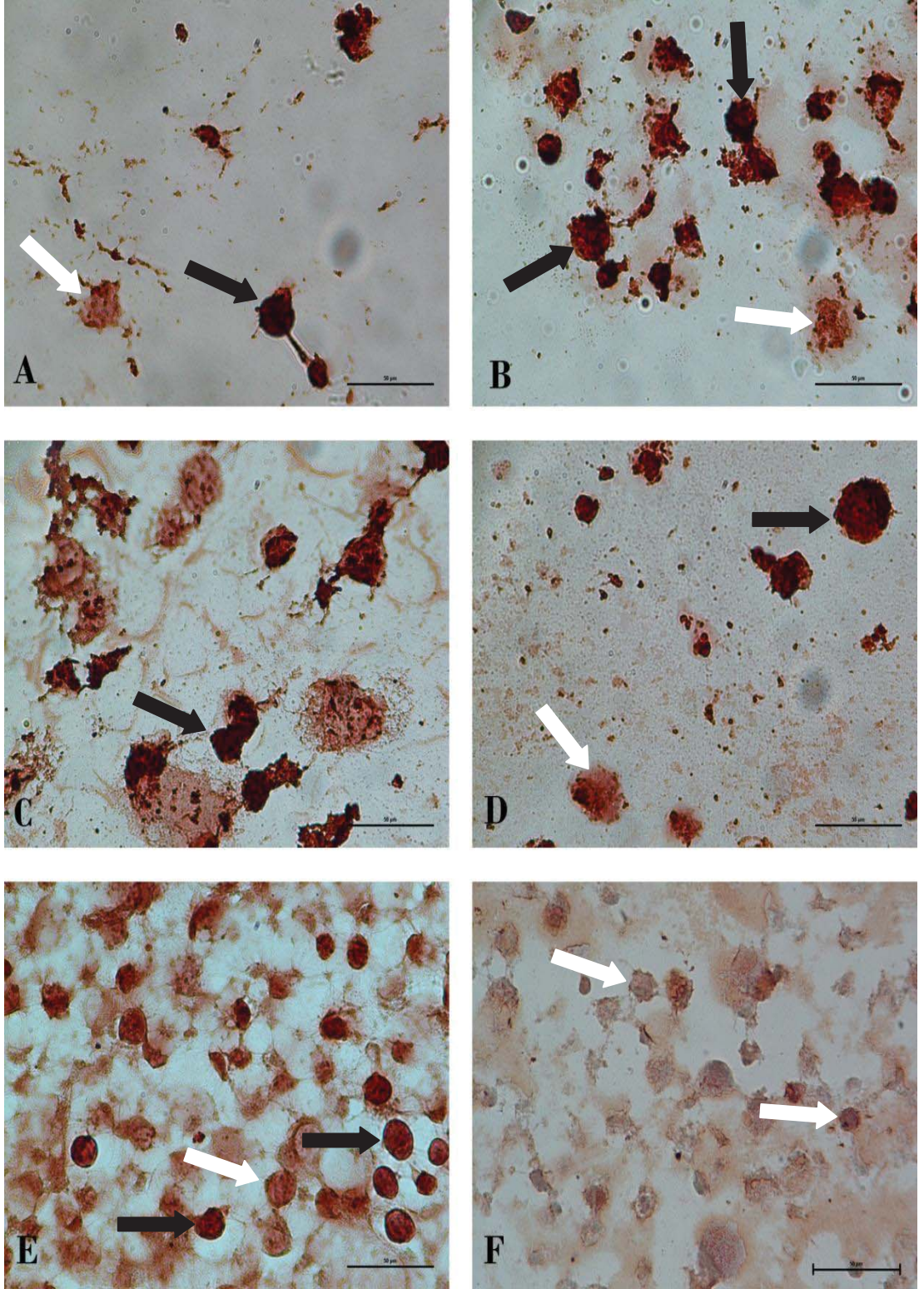
( : immüno pozitif hücre,  : immüno negatif hücre)

Beclin 1 immüno sitokimyasal boyanma oranı analiz sonuçlarına göre; 1. grup boyanma oranı 5. gruptan istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek, 8. gruptan anlamlı olarak düşük olduğu tespit edildi. Grup 5, 8, 9 ve 10' nun boyanma oranlarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı tespit edildi ($p < 0,05$). Grup 3' ün boyanma oranının 5, 8 ve 10. gruplardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi ($p < 0,05$). Grup 4 ve 13 boyanma oranı grup 5, 7, 8, 9 ve 10' dan daha düşük olarak tespit edildi ve bu düşüklüğün istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0,05$). Grup 14' ün boyanma oranlarının grup 2, 5, 7, 8, 9, 10 ve 12' den anlamlı olarak düşük olduğu tespit edildi ($p < 0,05$).



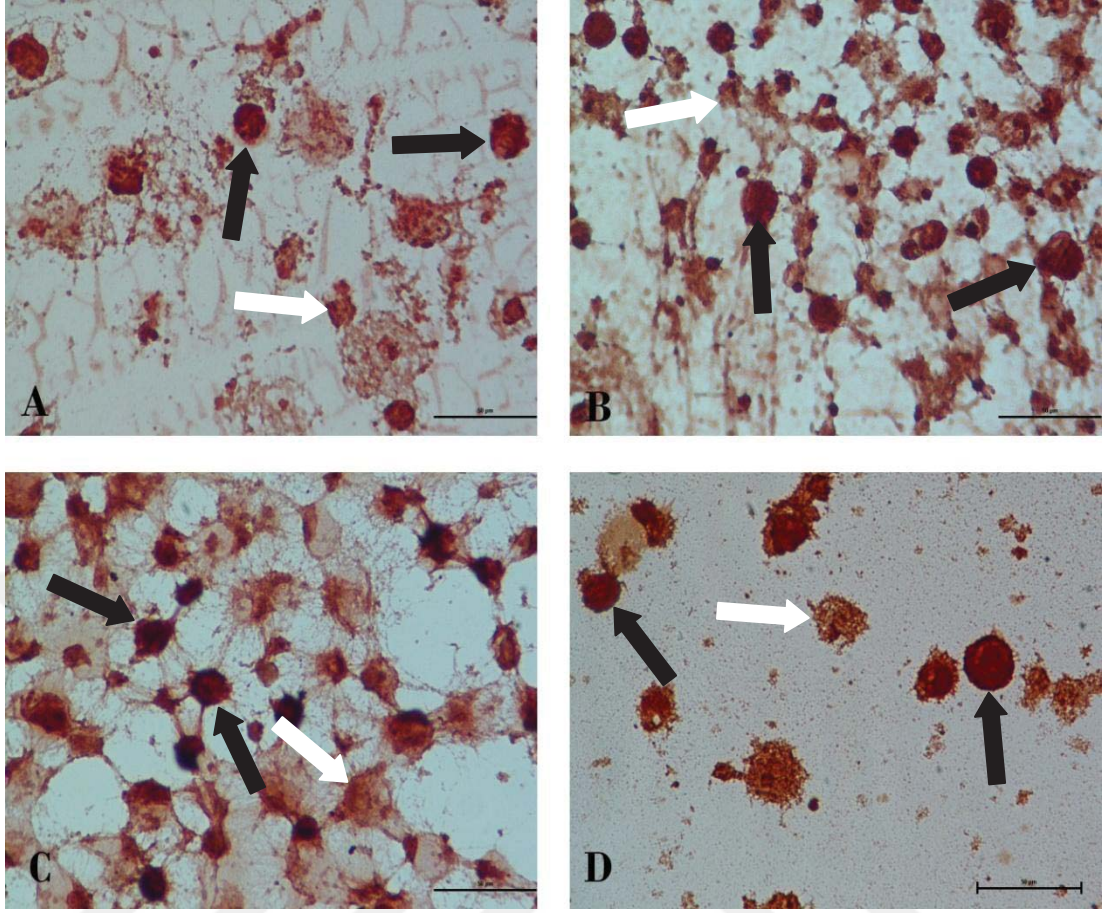
Resim 3.1B. Beclin 1 ekspresyonunun immunositokimyasal olarak gösterimi (Beclin 1, 1/50, x40). A: Kontrol grubu, B: G1, C: G2, D: G3, E: G4, F: G5

( : immüno pozitif hücre,  : immüno negatif hücre)



Resim 3.2B. Beclin 1 ekspresyonunun immunositokimyasal olarak gösterimi (Beclin 1, 1/50, x40). A: G6, B: G7, C: G8, D: G9, E: G10, F: G11

( : immünopozitif hücre,  : immünonegatif hücre)



Resim 3.3B. Beclin 1 ekspresyonunun immunositokimyasal olarak gösterimi (Beclin 1, 1/50, x40). **A:** G12, **B:** G13, **C:** G14, **D:** G15

(**→** : immüno pozitif hücre, **→** : immüno negatif hücre)

3.1.3. TdT-dUTP nick-end-labelling (Tunel) Boyama Analiz Sonuçları

TUNEL boyanan hücre kültürlerinin, her bir grubundan 500 hücre sayıldı ve pozitif ve negatif hücre sayısı elde edildi. Elde edilen pozitif ve negatif hücre sayıları Kutsal ve arkadaşlarının uygulamalı istatistik kitabından tanımladığı ki kare testiyle karşılaştırıldı (tablo 3.4). Apoptotik hücre sayısı en çok grup 11 de tespit edildi ve diğer gruplarla arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($p=0,000$)(Tablo 3.5).

Grup 12, Grup 11den sonra en çok apoptotik hücreyi içeren grup olarak tespit edildi. Bu grubun da diğer gruplarla arasında anlamlı bir farklılık olduğu tespit edildi

($p=0,000$)(tablo3.6). Diğer yandan, en az apoptotik hücre sayısına sahip grup Grup 14 olarak tespit edildi ve bu grubun da diğer gruplarla arasında anlamlı bir farklılık olduğu izlendi ($p=0,000$)(Tablo3.7). Grup 13 grup 14'ün ardından 2. en az apoptotik hücreye sahip grup olarak tespit edildi ve diğer gruplarla arasında anlamlı bir farklılık olduğu gözlemlendi ($p=0,036$)(Tablo3.8). Geri kalan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi.

Tablo 3.4. Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	128,004 ^a	15	,000
Likelihood Ratio	130,390	15	,000
Linear-by-Linear Association	6,411	1	,011
N of Valid Cases	8000		

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 238,81.

Tablo 3.5. Chi-Square Tests

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	17,507 ^a	11	,094
Likelihood Ratio	17,517	11	,093
Linear-by-Linear Association	1,146	1	,284
N of Valid Cases	6000		

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 240,08.

Tablo 3.6. Chi-Square Tests

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	22,175 ^a	12	,036
Likelihood Ratio	22,192	12	,035
Linear-by-Linear Association	3,629	1	,057
N of Valid Cases	6500		

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 238,15.

Tablo 3.7. Chi-Square Tests

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	57,398 ^a	14	,000
Likelihood Ratio	57,543	14	,000
Linear-by-Linear Association	,317	1	,573
N of Valid Cases	7500		

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 244,87.

Tablo 3.8. Chi-Square Tests

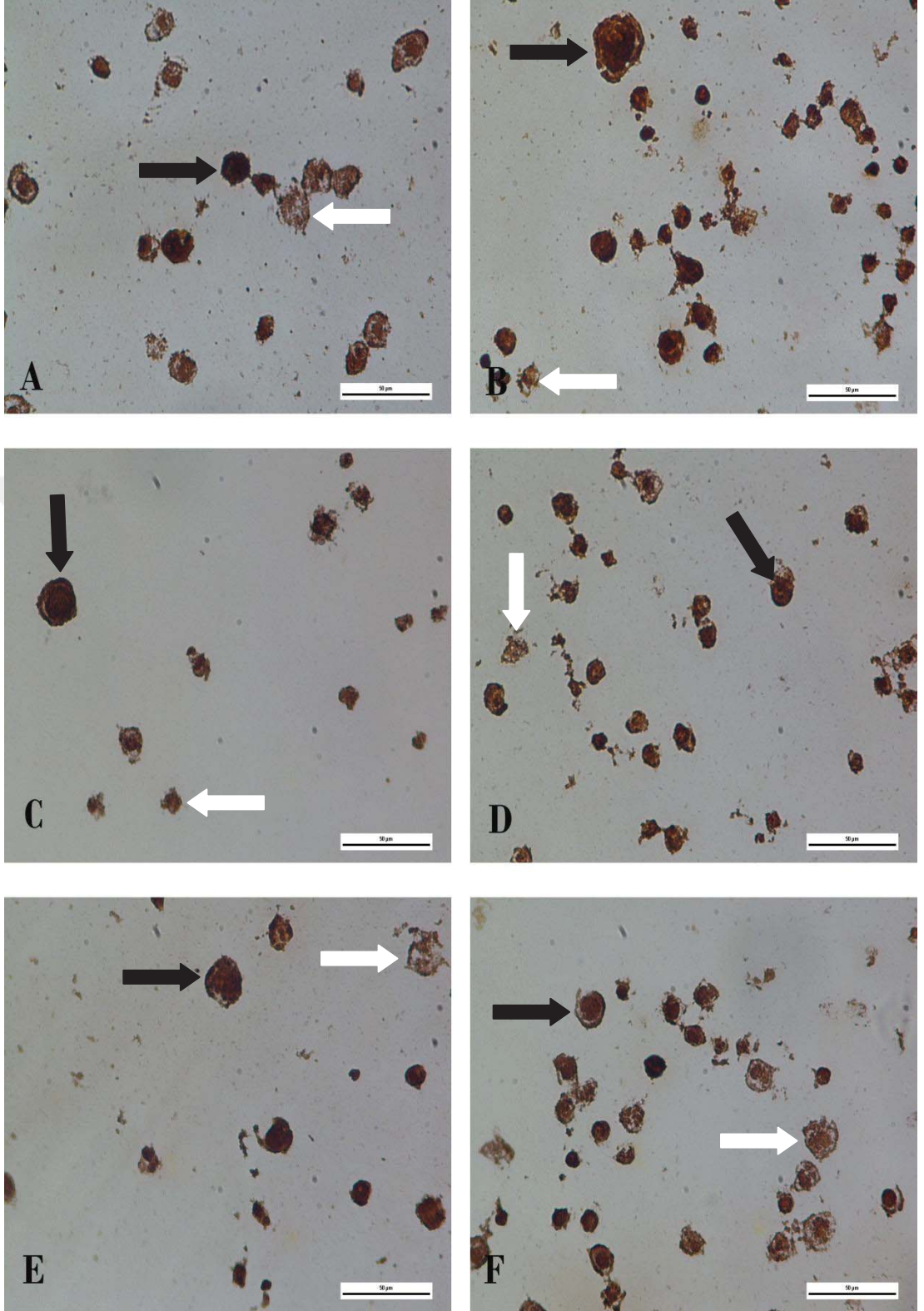
	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	39,176 ^a	13	,000
Likelihood Ratio	39,238	13	,000
Linear-by-Linear Association	,214	1	,644
N of Valid Cases	7000		

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 241,57.

Tablo 3.9. TdT-dUTP nick-end-labelling (Tunel) boyama sonucu elde edilen gruplar arası farklılık oluşturan değerler

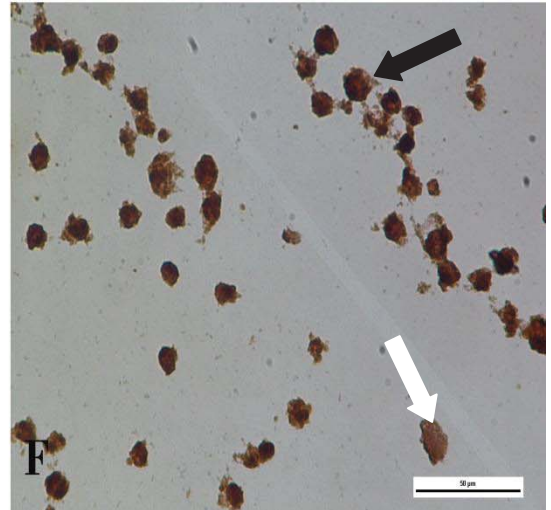
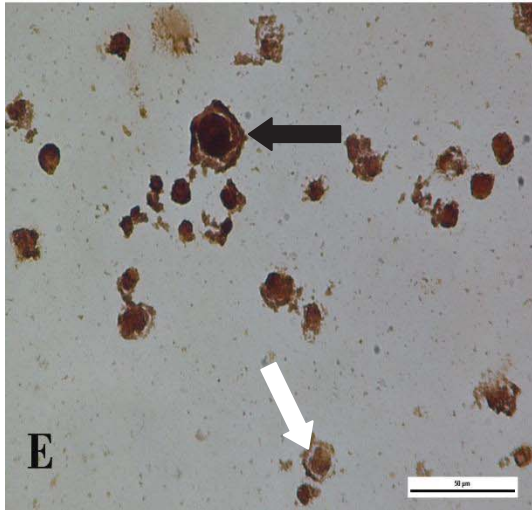
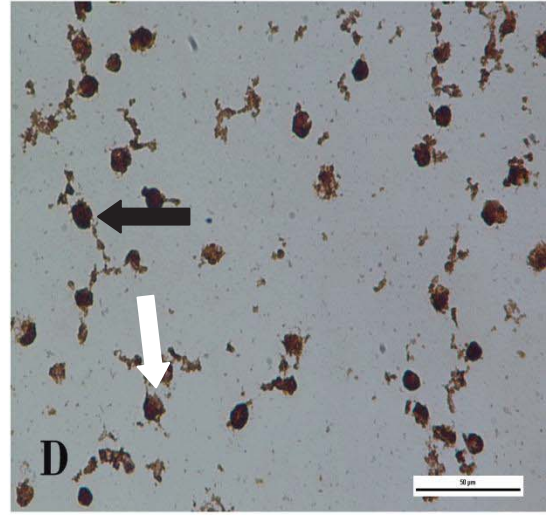
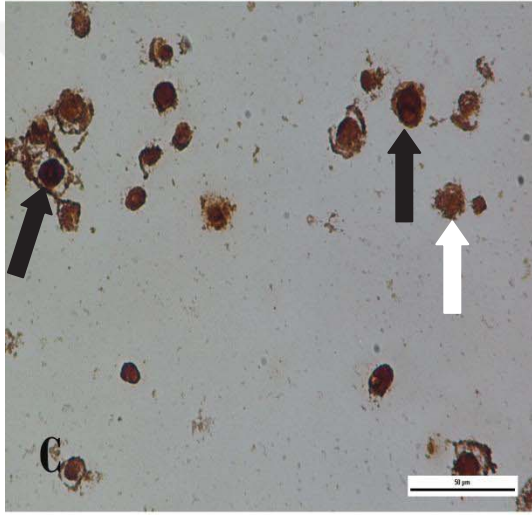
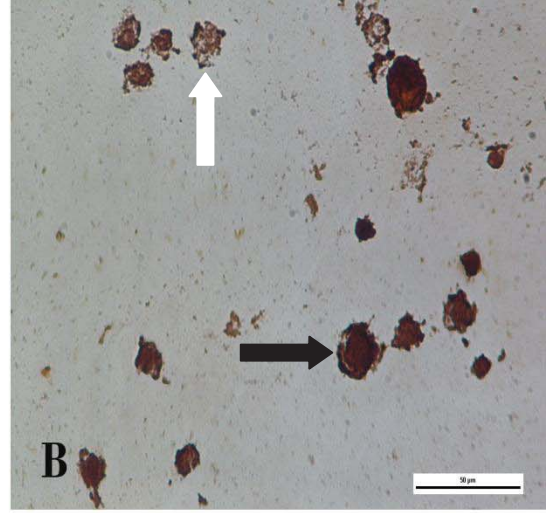
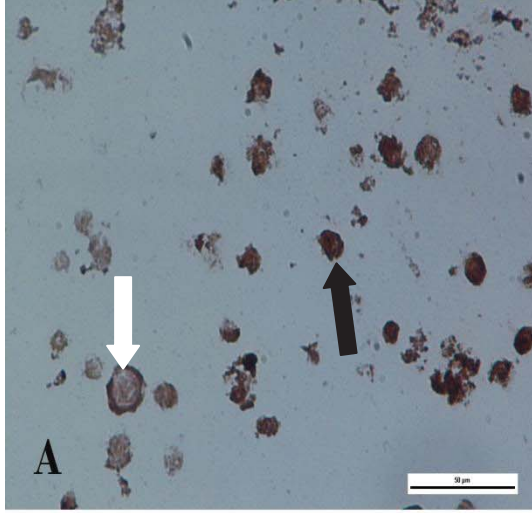
GRUPLAR	P değeri
Grup 11 ^a	0,000
Grup 12 ^b	0,000
Grup 13 ^c	0,036
Grup14 ^d	0,000

G^a : Apoptotik hücre sayısının en fazla olduğu grup; G^b: ikinci en çok apoptotik hücre içeren grup; G^c: İkinci en az apoptotik hücre içeren grup; G^d: En az apoptotik hücre içeren grup



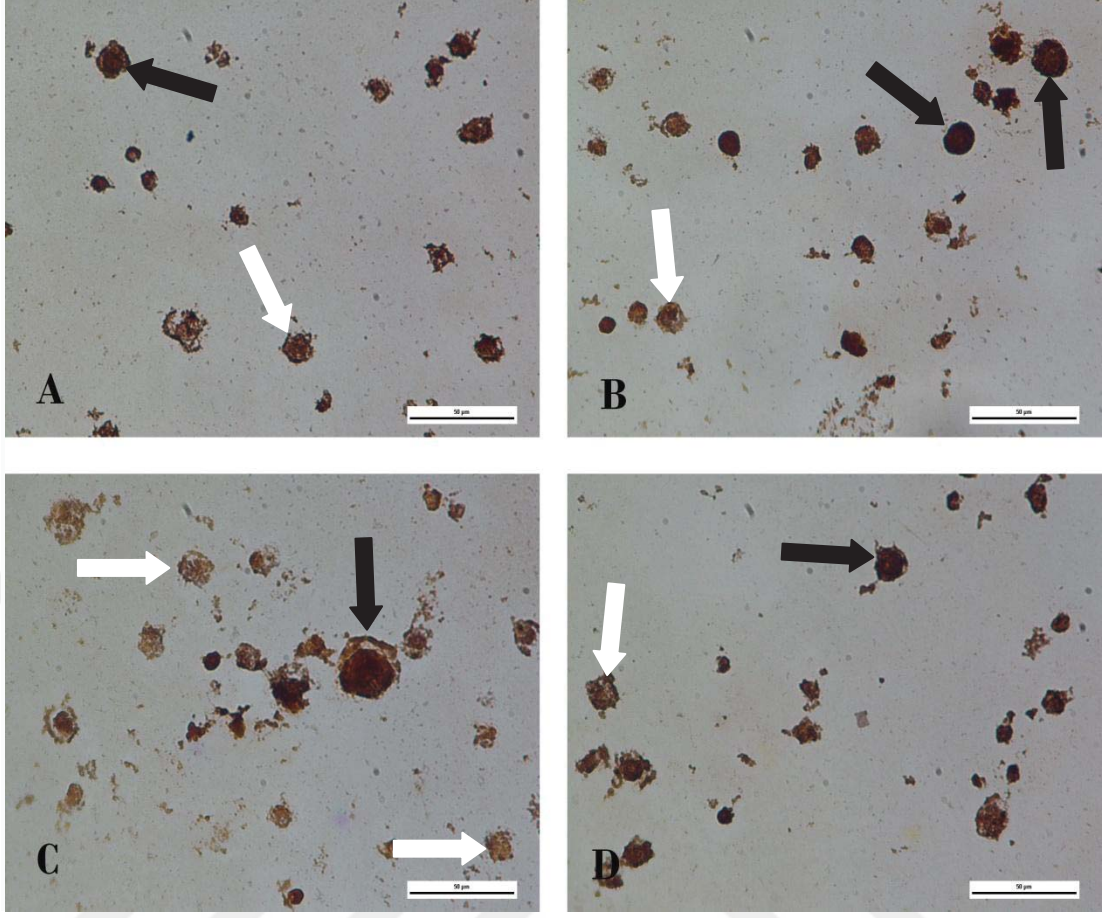
Resim 3.1C. TdT-dUTP nick-end-labelling (Tunel) boya gösterimi (x40). **A:** Kontrol grubu, **B:** G1, **C:** G2, **D:** G3, **E:** G4, **F:** G5

(: pozitif hücre, : negatif hücre)



Resim 3.2C. TdT-dUTP nick-end-labelling (Tunel) boya gösterimi (x40). **A:** G6, **B:** G7, **C:** G8, **D:** G9, **E:** G10, **F:** G11

( : pozitif hücre,  : negatif hücre)



Resim 3.3C. TdT-dUTP nick-end-labelling (Tunel) boya gösterimi (x40). **A:** G12, **B:** G13, **C:** G14, **D:** G15

( : pozitif hücre ;  : negatif hücre)

4. TARTIŞMA

Kanser günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri olup, sıklığı sürekli artış göstermektedir. Bu artışın nedenlerine baktığımızda başta çevresel karsinojenik moleküllerin çoğalması, modern teknolojinin getirdiği yan etkiler ve stres yer almaktadır (Ünal, 2012; Khurana ve ark., 2009).

Kanser türleri arasında beyin kanserlerinin agresif bir türü olan GBM'nin oluşum nedenleri tam olarak belirlenmemiş olup, küratif bir tedavisi olmadığı için tanı sonrası ortalama yaşam süresi oldukça kısadır. Bundan dolayı beyin tümörleri içinde önemli bir yeri vardır (Losieau ve ark., 2009). Primer beyin tümörleri arasında en sık görülen GBM yaklaşık olarak %20-30'nu oluşturmakta olup, toplumda bu tümör yaklaşık 100.000'de 5 kişide görülmektedir. Erkeklerde kadınlara oranla daha fazla rastlanılmaktadır (Yılmaz, 2012; Kleihues, 2007). GBM'de en etkili tedavi şekli cerrahi tedavi olmakla birlikte günümüzde değişik ilaçların glioblastoma multiforme hücrelerinde değişik mekanizmalarla tümörü geriletmediği ortaya konmuştur (Adamson, 2009; Lo'pez ve ark., 2002). Bizde bu çalışmamızda daha önce farklı türdeki beyin tümörlerinde ayrı ayrı veya kombine dozlarda kullanılarak tedavi amaçlı uygulanan, ve tümör hücrelerinde öldürücü etkisi olan A vitamini analogu isotretinoin (13-cis retinoik asit) ve bir endojen hormon olan melatoninin GBM hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etkiyi ve bu etkiyi hangi hücre ölüm mekanizmalarını aktive etmek suretiyle gerçekleştirdiğini ve bu süreçte hücre yaşamında çok etkin bir enzim olan telomerazın etkinliğini incelemeyi amaçladık.

Pineal bez (epifiz); beynin işlevini etkileyen birçok nörohormonu üretir. Bu hormonlardan biride melatonindir. Melatonin; kimyasal formülü N-asetil-5-metoksitriptamin olan endojen bir hormondur. Salgısı sirkadien bir ritim göstermekte olan melatonin ışığa duyarlı olup salınımı geceleri gündüze oranla 7-10 kat daha fazladır. Melatoninin birçok dokuda reseptörleri olduğu bilinmekte beraber özellikle merkezi sinir sisteminde çok yaygın olup çevresel, hormonal, yaş vb. faktörlere bağlı olarak yaygınlığı değişmektedir. Melatoninin saf anti-kanser etkisinin yanında kronobiyolojik düzenleyici, antioksidan ve immün destekleyici özellikleri de vardır

(Topal ve ark., 2009). Yapılan hem in vitro hemde in vivo çalışmalarda, melatoninin glioblastoma hücrelerinin hücre proliferasyonunu düşürdüğü, aynı zamanda glioblastoma oluşumunu uyaran hücrelerde ve glioblastoma hücrelerine uygulanan ilaçların etkinliğinin sinerjik olarak arttırılmasında etkin olduğu ortaya konmuştur (Das ve ark., 2007). Yapılan bir başka çalışmada ise melatonin tedavisinin glioblastoma oluşumunu uyaran hücrelerde proliferasyonunu azalttığını ve kök hücre belirteçlerinin ekspresyonunda azalmayla birlikte kendiliğinden yenilenme ve klonojenik yeteneğinde azalmaya neden olduğu ortaya konmuştur. Buradan da yola çıkarak melatonin tedavisinin kök hücre özelliklerini modüle ederek otofajinin ultrastrüktürel özellikleriyle birlikte hücre ölümüne neden olduğu görülmektedir (Martín V.2014). Bizde çalışmamız YKG-1 GBM hücre hattında farklı ve saf dozlarda 13-cis retinoik asit ve Melatonin yanında aynı maddelerin kombine dozlarını kullanmak suretiyle bu malign hücrelerdeki sitotoksik etkiyi ve bu süreçte telomeraz etkinliğini araştırdığımızda önemli sonuçlar elde ettik. Bunlardan ilki farklı dozlarda saf Melatonin uygulanan gruplarda ki GBM hücre viabilitesinde dikkati çeken bir azalma olmasıydı ki bu melatoninin terapötik etkinliğini gösteren önemli bir bulgu olarak değerlendirildi. Bu etkinin doza bağlı olarak artış göstermemesi önemli bir bulgu olarak değerlendirildi. Diğer yandan hücre viabilite oranının bilhassa grup 2’de yani melatoninin 1 mM verildiği grupta en çok düştüğünü gözlemlememiz ilginç bir veri olarak değerlendirildi.

Vitamin A türevi olan 13-cis retinoik asit tıpta dermatolojik tedaviler başta olmak üzere farklılaşma, anti-proliferatif, pro-apoptotik ve anti-oksidan etkileri nedeniyle potansiyel kemoterapötik ajanlar olarakta kullanılmaktadırlar (di Masi ve ark., 2014). Yağda eriyen bir vitamin türevi olup vücuttan atılımı zordur. Bundan dolayı eksikliği yanında fazla alımı da başta serebral problemler olmak üzere değişik klinik tablolara neden olmaktadır. Son dönemlerde yapılan çalışmalarda 13-cis retinoik asidin içinde GBM tedavisinin de olduğu değişik klinik durumlarda kullanıldığı görülmektedir (Ponthan ve ark., 2001). Hücre kültüründeki glioma hücrelerine karşı retinoik asit ve türevlerinin büyüme önleyici aktiviteye sahip olduğu değişik çalışmalarda gösterilmiştir (See ve ark., 2004). Bunlardan bir tanesinde GBM olan hastalarda 13-cis-retinoik asit kullanılmış ve sonuçlarda, 13-cis-retinoik asidin malign gliomalara karşı etkin olduğu görülmüştür (Yung ve ark.,

1996). Bunun yanında 13-cis retinoik asitin kullanıldığı başka bir çalışmada ise hücre farklılaşma potansiyelinin GBM'nin klinik tedavisinde başarılı olmadığı görülmüştür (Milanovic ve ark., 2015). Çalışmamızda YKG-1 GBM hücre hattına saf olarak farklı dozlarda 13-cis retinoik asit uygulamasında hücre viabilitesinin çok değişmediği ve sitotoksik etkisinin belirgin olmadığı belirlendi. Ayrıca bu etkinin melatoninde retinoik aside göre çok daha belirgin olduğu görülmüştür. Yapılan başka bir çalışmada başka bir beyin tümörü hattı olan SH5Y nöroblastoma hücre hattında uygulanan retinoik asidin melatoninle kombininde meydana gelen sitotoksik etkinin retinoik asidin tek başına kullanıldığı zamanki etkiden belirgin derecede yüksek olduğu ve bu iki etken madde arasında pozitif yönde bir etkileşim olduğunu ortaya çıkmıştır (Tosun ve ark., 2011). Çalışmamızda ise bu iki ilacın kombine uygulamasının GBM'de etkiyi artırıcı veya azaltıcı etkisinin olmadığını ortaya koymuştur. Bu bulgular farklı tümör tipleri arasında kemoterapötiklerin etkinliklerinin değişebildiği olarak değerlendirildi. Yine bu çalışmada kombine dozlar uygulanan gruplarda hücre viabilitesinin çok düşmediği gözlenmiştir. Bunun yanında hücre viabilitesini en çok düşüren 1mM dozundaki melatoninin (%59,36) 1µM 13-cis retinoik asitle kombinasyonunda (%95,94) hücre viabilitesini neredeyse yok denecek kadar az oranda düşürdüğünü gördük. Bu bulgu melatoninin sitotoksik etkisinin 13-cis retinoik asit tarafından antagonize edildiği olarak yorumlandı.

Telomer; kromozomların uç kısmında yer alan DNA ve protein içeren bölgeleridir. Telomerlerin sentezinden telomer terminal transferaz (telomeraz) enzimi sorumludur (Yıldız ve ark., 2009). Telomeraz; ribonükleoprotein yapıda özel bir DNA polimeraz olup kromozomal uçlardaki 'TTAGGG' tekrarlarının sentezinden sorumludur. Telomeraz, embriyonik hücreler ve kök hücrelerde aktif olup normal somatik hücrelerde saptanmamaktadır (Morin, 1997).

Normal somatik hücrelerde; hTERTgeni eksprese olmadığından dolayı telomeraz aktivitesi görülmez ya da çok az görülür. Tümör hücrelerinde ise hTERTgeninin çok aktif olmasından dolayı telomeraz enzim aktivitesi çok yüksektir. Tümör hücrelerinin sonsuz bölünme yeteneği ve dirençli yapıda olması bu geri kazanılmış telomeraz aktivitesinden kaynaklanmaktadır (Sharma ve ark., 1996). Tümör hücrelerinin %90'ında telomeraz aktivitesi tespit edilmiştir. Bu durum

ölümsüz hücrelerde telomerazın tekrar aktive olduğunu göstermektedir. Telomeraz aktivitesi yüksek olan tümör hücrelerinin telomerleri ise dayanıklıdır (Kim ve ark., 1994). Yapılan çalışmalarda tümör hücrelerinin kontrolsüz çoğalması ile telomeraz aktivitesi arasında doğrusal bir ilişki olduğu görülmüştür (Hastie ve Allshire, 1989). İn vivo ortamda yapılan çalışmalarda benign tümörlerde telomeraz aktivitesinin olmadığı ve telomerazları kısaldıkça erken evrelerine geri döndükleri görülmüştür. Metastatik tümörlerde ise yüksek telomeraz aktivitesi ortaya çıkmıştır (Atlı ve Bozcuk, 2002). Yapılan bir başka araştırmada ise beyin tümörlerinin telomerazla olan ilişkisinde normal beyin dokusunda telomeraz aktivitesi saptayamazken, malign tümörlerde %81, metastatik tümörlerde ise %100 aktive tespit etmişlerdir. Telomeraz aktivitesi (+) olan hastaların prognozunun, telomeraz aktivitesi (-) olanlara göre daha kötü olduğunu ortaya koyan araştırmacılar, telomeraz aktivitesinin beyin tümörlerinin teşhisinde ve prognoz tayininde kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (Nakatani ve ark., 1997). Telomerazın, tedavilerde kansere karşı kullanılan ilaçlar için ideal bir hedef olabilmesi beklenilmektedir. Telomeraz aktivitesini engelleyen ilaçlar, telomer boylarını kısaltarak, tümör hücrelerini yaşlandırıp öldürdüğü ve normal vücut hücrelerinde telomeraz aktivitesi bulunmadığı için böyle bir tedavinin tümör hücrelerine özgü olacağı ve kanser ilaçlarına göre daha az toksik olduğu görülmüştür (Hastie ve Allshire, 1989). Bizde çalışmamızda YKG-1 glioblastoma hücre hattında melatonin ve 13-cis retinoik asitin telomeraz aktivitesine olan etkilerini karşılaştırdık. Literatürde yaptığımız taramalarda kullandığımız bu 2 maddenin telomeraz aktivitesine olan etkisi ile ilgili çok az sayıda çalışma mevcut olup bu 2 parametrenin aynı çalışmada kullanıldığı bir çalışmaya rastlayamadık. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda melatoninin, tümör hücresi aktivitesi konusunda önemli bir kriter olarak görülen telomeraz aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (Topal ve ark., 2009). Çalışmamızda ise YKG-1 glioblastoma multiforme hücre hattına saf olarak uyguladığımız melatoninin artan doza bağımlı olarak telomeraz aktivitesini arttırdığını gördük. Bu melatoninin telomeraz üzerine olan eksprese edici etkisinin kanser hücrelerinin yaşayabilirliğini arttırıcı etki yaptığı yönünde bir bulgu olarak yorumlandı. Her ne kadar bu istemediğimiz bir etki olsa da melatoninin kanserli olmayan sağlıklı nöronal hücrelerde telomeraz aktivitesini arttırmaya bağlı olarak sinir sistemini koruyucu etki yaptığını deneysel olarak ortaya

koyması nedeniyle burada elde edilen sonuç çalışmamız hipotezine ek olarak elde ettiğimiz bir bulgu oldu. Diğer yandan değişik hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan 13-cis retinoik asitin telomeraz üzerine baskılayıcı etkisinin her ne kadar anti tümör etkinliği açısından olumlu olduğu görülse de sağlıklı hücrelere uygulanması durumunda telomer kısaltıcı etkisiyle olumsuz bazı klinik durumlara zemin hazırlayabileceğini düşünmek yanlış olmayacaktır. Ancak hem melatonin hemde 13-cis retinoik asitin sağlıklı nöronlar üzerine etkilerinin in vitro ve in vivo olarak ortaya konmasının uygun olacağını düşünmekteyiz. Bununla birlikte, melatoninin telomeraz aktivitesini arttırmasına karşın viabiliteyi azaltıcı etkisinin gruplar arasında en yüksek düzeyde olması zıt bir bulgu olarak değerlendirildi. Diğer yandan 13-cis retinoikasitle kombine uygulamasında da telomeraz aktivitesini arttırıcı etkisinin bir miktar baskılandığının tespiti 13-cis retinoik asitin bu tip hücre tümör hattında melatonininden daha fazla telomeraz baskılayıcı etkisini göstermiştir. Bu tümörün ilerleyişini ve yaşamını engelleyici bir bulgu olmasına karşın yapılan viabilite testinde viabilitenin 13 cis retinoik asit kullanılan ve kombine dozlarda çok değişmemesi ve melatonin dışında viabilitenin yüksek değerlerde kalması nedeniyle bu hücre hattında sitotoksik etkinliğinin düşük olduğunu ortaya koymuştur. Elde edilen bu sonuçlar bu kanser hücre hattında melatonin ve 13 cis retinoik asitin hücre viabilitesi üzerine oluşturdıkları etkilerin telomeraz etkinliği üzerine olan etkilerinden kaynaklanmadığını ve başka yolların veya mekanizmaların bu süreçte etkin olduğunu açık bir şekilde ortaya koymaktadır.

Hücre intiharı olarakta bilinen apoptozis fizyolojik bir olaydır. Apoptozis, organizmada hasar görmüş ya da organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde görev alır ve bunun yanında tümörlerde sık görülen bir olay olup hücre ölümüne yol açan aktif olarak düzenlenmiş bir hücresel süreçtir. Apoptozise direnç göstermek, hücre kaybını azaltarak tümöre bir avantaj sağlamaktadır (Rashed ve Ragab, 2004). Hücre ölümü hücrenin yaşam döngüsünün tamamlandıktan sonra organizmadan elimine edilmesi sürecidir. Burada hücre farklı yollar üzerinden aktive edilerek farklı tipte hücre ölüm çeşitleriyle dokulardan uzaklaştırılırlar. Bu hücre ölüm çeşitleri arasında en yaygın bilineni apoptozis ve nekrozistir. Son yıllarda giderek önemi artan otofaji ve onun yanındaki diğer ölüm çeşitleri olan nekroptozis, pyroptozis, onkozis ve değişik alt tipler günümüzde halen yaygın olarak

araştırılmaktadır. Çalışmamız konusu içinde kullandığımız hücre hattı üzerinde verdiğimiz kimyasal ajanların sitotoksik etkilerini belirlemek ve bu hücre ölümlerinin hangisi yoluyla ve hangi yolak üzerinde olduğunu ortaya koymak amacıyla en yaygın görülen 2 ölüm çeşidi olan apoptozis ve otofaji yanında apoptozisin intrinsek mekanizması içinde çok önem arz eden Caspase 3 aktivasyonunu belirlemeyi amaçladık. Çalışmamızda nekroz değerlendirme yapmama nedenimiz çalışmamızın hücre hattı üzerinde yapılması doku bütünlüğü olmamasıdır.

Caspase 3 proteini, sistein-aspartik asit proteaz (kaspaz) ailesinin bir üyesi olup pek çok hücre tipinde hem ekstrinsik (ölüm ligandı) hem de intrinsik (mitokondriyal) yollardan apoptozise neden olmaktadır (Chowdhury ve ark., 2008; Salvesen, 2002). Çalışmamızda caspase 3 proteini ekspresyonu değerlendirilmesinde şekil 3.4'te görüldüğü üzere her grupta düşük düzeylerde ekspresyon olduğu ve bu seviyelerin Beclin-1 ekspresyonu ile karşılaştırıldığında çok düşük düzeylerde olduğu gözlenmiştir.

Fizyolojik bir olay olan otofaji; hücrenin stres faktörleri altında örneğin; açlık, kanser, bakteriyel-fungal-viral enfeksiyonlar gibi söz konusu organizmanın homeostazını korumak adına gelişen hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptozda olduğu gibi otofaji ile ilgili proteinler vardır. Bunlar arasında Beclin, ATG, LC3 gibi proteinler yer almaktadır (Mizushima ve Komatsu, 2011). Beclin-1 insanlarda BECN1 geni tarafından kodlanan bir protein olup bu protein, BCL-2 ile etkileşime girerek, hem otofaji hem de hücre ölümünün düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Yang ve Daniel, 2007). Çalışmamızda şekil 3.4'te görüldüğü üzere hücrelerin büyük kısmının ölümünün beclin-1 ekspresyonu sonucu ortaya çıkan otofajik hücre ölümü sonucu olduğu açıkça bellidir. Bu önemli ve özgün bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır. Daha önce yaptığımız literatür araştırmalarında böyle bir sonucun belirtildiği çalışmaya rastlayamamıştık. Diğer yandan apoptotik hücre ölümü değerlendirilmesinde tüm gruplarda hemen hemen birbirine paralel oranlarda verilen ilaçlardan ve dozlardan bağımsız ölüm görülmesi bu süreçte apoptotik hücre ölümünün ayrıca indüklenmediğini ortaya koymaktadır. Ayrıca caspase 3 ekspresyonunda apoptotik hücre ölüm değerlerinden çok düşük değerler bize apoptotik hücre ölümünün intrinsek mekanizmalardan olmadığını göstermektedir.

Burada ekstrensek veya başka bir intrensek yolağın aktivasyonu söz konusu olarak gözükmektedir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Elde edilen veriler melatonin ve 13 cis retinoik asitin YKG1 GBM hücre hattı hücrelerinde viabilite bakımından farklı tarzda etkiler yaptığını, melatoninin hücre viabilitesini azaltmasına karşın 13 cis retinoik asitin viabilite üzerine çok anlamlı etkisinin olmadığını hatta melatonin ile kombinasyonlarında melatoninin sitotoksik etkisini antagonize ettiğini ve hücre viabilitesini arttırdığının görülmesi bu tümör tedavilerinde tümör hücrelerinin viabilitesini azaltma bakımından tedavi düzenlenmesi planlandığında kombinasyon tedavisinden daha çok bilhassa saf melatonin uygulanmasının daha efektif olabileceğini ortaya koymuştur. Diğer yandan melatoninin telomeraz ekspresyonu arttırıcı etkisinin 13 cis retinoik asit tarafından antagonize edilmesi bu tip tümörlerde telomeraz aktivasyonu baskılamak suretiyle oluşturulacak tedavilerde ilaç kombinasyon tedavilerinin daha efektif olabileceğini göstermektedir. Diğer yandan her iki maddenin de etkinlikleri gösterirken telomeraz aktivitesini arttırma veya azaltmak suretiyle etkin olmadıkları gözlenmiştir. Bu nedenle bu iki maddenin viabilite azaltıcı etkilerini başka bir yolak üzerinden aktive etmek suretiyle yaptıkları görülmektedir. Bu nedenle GBM tedavilerinde telomeraz aktivitesini azaltmak suretiyle tedavi planlanması yerine tümör hücrelerinin viabilitesini azaltmak suretiyle tedavi planlaması yapılmasının daha doğru bir yöntem olduğunu düşünmekteyiz.

Diğer yandan bu tümör hücrelerinin melatonin ve 13 cis retinoik asite maruz bırakılmaları sürecinde hücrelerin ölümlerinin özellikle otofajik hücre ölümü tarzında olması apoptotik hücre ölümünün daha düşük düzeylerde olması ve hatta intrinsek yolaklardan önemli bir tanesi olan caspase-3 aktivasyonunun oldukça düşük düzeyde olması çalışmamızın özgün bir verisi olarak elde edildi. Bu nedenle burada hücre ölümü mekanizmasında gerek ekstrinsek apoptotik mekanizmalarının ve gerekse intrinsek otofajik hücre mekanizmalarının aktif olması tedavi yönünde farklı bakış açıları getirebilecektir.

ÖZET

Melatonin ve 13-cis-retinoik asitin YKG-1 Glioblastoma multiforme hücre hattında telomeraz aktivitesi üzerine olan etkilerinin karşılaştırılması

Glioblastoma Multiforme (GBM) erişkinlerde görülen en sık ve en malign astrositik beyin tümörüdür. İntrakranial tümörlerin %12-15'ni, astrositik tümörlerin ise %50-60'nı oluştururlar. GBM ölüm oranı çok yüksek olmakla birlikte henüz etkili bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Diğer yandan sık olarak malignansilerin %85'inde yüksek telomeraz aktivitesi olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle telomeraz aktivitesinin, kanser teşhisinde önemli bir gösterge olabileceği düşünülmektedir. Tümörlerin %90'ında yüksek düzeyde telomeraz aktivitesi saptanmaktadır. Kanser hücrelerinin sonsuz bölünme yeteneği ve dirençli yapıda olması, bu geri kazanılmış telomeraz aktivitesinden kaynaklanmaktadır.

Çalışmamız içerik bakımında oldukça ölümcül bir tümör olan YKG-1 glioblastoma hücre hattı hücrelerinde A vitamini analogu olan isotretinoin (13-cis retinoik asit) ve bir endojen hormon olan melatonin (MLT)'in telomeraz aktivitesi üzerine olan etkilerini karşılaştırdık. Melatonin ve 13-cis retinoik asiti hem ayrı ayrı hemde kombine ederek bu kombinasyonlardaki viabiliteler MTT kullanılmak suretiyle hesaplandı. MTT sonuçları alınırken aynı örneklerden immunositokimyasal boyama ve apoptotik boyama yapılarak örneklerdeki caspase-3 ve beclin-1 ekspresyonları belirlenip değerlendirildi. Daha sonra ışık mikroskopunda immunopozitif ve immunonegatif hücreler sayılıp birbirine oranlandı ve sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildi.

Sonuç olarak; YKG-1 GBM hücre hattında 13-cis retinoik asitin hücre viabilitesi üzerine oluşturdukları etkilerin telomeraz etkinliği üzerine olan etkilerinden kaynaklanmadığını ve başka yolların veya mekanizmaların bu süreçte etkin olduğunu ve hücre ölümünün beclin-1 ekspresyonu sonucu ortaya çıkan otofajik hücre ölümünden kaynaklandığı sonucunu elde ettik.

Anahtar Kelimeler:

- Telomeraz aktivitesi, Glioblastoma multiforme, melatonin, 13-cis retinoik asit

SUMMARY

The comparison of the telomerase activity on melatonin and 13-cis-retinoic acid treated YKG-1 Glioblastoma multiforme cell line

Glioblastoma Multiforme (GBM) is the most common and most malignant astrocytic brain tumor seen in adults. They constitute 12-15% of intracranial tumors and 50-60% of astrocytic tumors. The incidence is higher in males than in females. Although the mortality rate of GBM is very high, there is no effective treatment method yet. On the other hand, 85% of malignancies (eg hematological malignancies) were found to have high telomerase activity. Therefore, telomerase activity is thought to be an important indicator in cancer diagnosis. High levels of telomerase activity are detected in 90% of tumors. The ability of cancer cells to have infinite cleavage ability and resistance is due to this recovered telomerase activity.

We compared the effects of isotretinoin (13-cis retinoic acid), a vitamin A analogue, and an endogenous hormone, melatonin (MLT) on telomerase activity in YKG-1 glioblastoma cell line cells, a highly lethal tumor. Melatonin and 13-cis retinoic acid were separately and combined to calculate viability in these combinations using MTT. While MTT results were obtained, immunocytochemical staining and apoptotic staining of the same samples were performed to determine the caspase-3 and beclin-1 expressions in the samples. Then, immunopositive and immunonegative cells were counted in the light microscope and the results were statistically analyzed.

As a result; We concluded that the effects of 13-cis retinoic acid on cell viability in the YKG-1 GBM cell line were not due to its effects on telomerase activity and other pathways or mechanisms were effective in this process and cell death was caused by autophagic cell death caused by beclin-1 expression.

Keywords:

- Telomerase activity, Glioblastoma multiforme, melatonin, 13-cis retinoic acid

KAYNAKLAR

- ADAMSON C, KANU OO, MEHTA AI, DI C, LIN N, MATTOX AK, ET AL. (2009). Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18(8):1061-83.
- ALLEN, N. J., BARRES, B.A. (2009). Neuroscience: Glia more than just brain glue. *Nature*. 457(7230): 675-7
- ATLI K, BOZCUK AN. Telomerler ve Hücresel Yaşlanma. *Geriatri* 2002; 5: 111-4.
- BARRES, B.A. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*, 6;60(3):430-40.
- BARRY, B., L., DENNIS, A., C. (2012). *Medical Oncology& Principles of Cancer Biology*.
- BLUMENTHAL, D.T., SCHULMAN, S.F. (2005). Survival outcomes in glioblastoma multiforme, including the impact of adjuvant chemotherapy. *Expert Rev Neurother*. 5(5):683-90.
- CHOWDHURY I, THARAKAN B, BHAT GK. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2008; 151(1): 10-27
- COOPER, G.M. (1992). *Elements of Human Cancer*. Dana-Farber Cancer Institute Harvard Medical School.
- COUNTER CM., AVILION AA., LEFEUVRE CE., STEWART NG., GREIDER CW., HARLEY CB., BACCHETTI S., (1992); Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J*. 1992 May;11(5):1921-9.
- CUI, D., NAFTEL, J., DALEY, W., LYNCH, J., HAINES, D., YANG, G., FRATKIN, J. (2011). *Atlas of Histology with Functional and Clinical Correlations*. 1rd Ed. Lippincott Williams & Wilkins a Wolters Kluwer Business.
- DAS A, BANIK NL, RAY SK.(2007). Differentiation decreased telomerase activity in rat glioblastoma C6 cells and increased sensitivity to IFN-gamma and taxol for apoptosis. *Neurochem Res*. 2007 Dec;32(12):2167-83. Epub 2007 Aug 13.
- DAS A, BANIK NL, RAY SK.(2009). Molecular mechanisms of the combination of retinoid and interferon-gamma for inducing differentiation and increasing apoptosis in human glioblastoma

T98G and U87MG cells. *Neurochem Res.* 2009 Jan;34(1):87-101.doi: 10.1007/s11064-008-9669-x. Epub 2008 Mar 27. PubMed PMID: 18368485.

DAVALOS, D., GRUTZENDLER, J., YANG, G., KIM, J.V., ZUO, Y., YUNG, S., LITMANN,D.R.,DUSTIN, M.L., GAN, W.B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8(6):752-758.

DI MASI A, LEBOFFE L, DE MARINIS E, PAGANO F, CICCONI L, ROCHETTE-EGLY C, LO-COCO F, ASCENZI P, NERVI C.(2015). Retinoic acid receptors: from molecular mechanisms to cancer therapy. *Mol Aspects Med.* 2015 Feb;41:1-115. doi:10.1016/j.mam.2014.12.003. Epub 2014 Dec 25.

EROSCHENKO, V. (2016). DiFiore'nin Histoloji Atlası. 12. Baskıdan Çeviri. Palme Yayıncılık.

ERSOY, M., KALKAN A.İ. (1996). Anatomy and tracts of the spinal cord. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 16

EŞREFOĞLU, M. (2017). Embriyoloji. 1. Baskı. İstanbul Tıp Kitabevleri

EŞREFOĞLU, M. (2018). Histoloji Atlası. 1.Baskı. İstanbul Tıp Kitabevleri.

FISHER JL, SCHWARTZBAUM JA, WRENSCH M, WIEMELS JL.(2007) Epidemiology of brain tumors. *Neurologic Clinics* 2007;25(4): 867-890.

GARTNER, L., HIATT, J. (2016). Brs Hücre Biyolojisi ve Histoloji. 7. Baskı. İstanbul Tıp Kitabevi.

GORHAM, H., YOSHIDA, K., MARSH, G., MANEK, S., CHARNOCK, M., TARIN, D., GOODISON, S. (1997). Telomerase activity in human gynaecological malignancies. *J Clin Pathol.* 50(6):501-4.

GÖKMEN, F.G. (2003). Sistematik Anatomi. Güven Kitabevi, İzmir.

GÜNERİ YILDIZI, M. , ARASI, S., CANSARAN DUMAN, D.(2009). The Role of Telomeres in Aging and Cancer Relationships *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2009; 66 (4): 187-195

HANAHAN, D., WEINBERG, R.,A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 100:57-70.

HASTIE, N.D., ALLSHIRE, R.C., (1989). Human Telomeres: Fusion and Interstitial Sites, *TIG*, 5(10):326-330.

- HE, YM., DENG, HH., SHI, MH., BODINGA, BM., CHEN, HL., HAN, ZS., JIANG, ZL., LI, QW. (2016). Melatonin modulates the functions of porcine granulosa cells via its membrane receptor MT2 in vitro. *Anim Reprod Sci.* 172:164-72.
- HERRUP, K., YANG, Y. (2007). Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology. *Nat Rev Neurosci.* 8(5):368-78.
- HIYAMA, K., HIYAMA, E., YAMAKIDO, M., INAI, K., GAZDAR, AF., PIATYSZEK, MA., SHAY, JW. (1995). Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst.* 21;87(12):895-902.
- HOLT, SE., WRIGHT, WE., SHAY, JW. (1997). Multiple pathways for the regulation of telomerase activity. *Eur J Cancer.* 33(5):761-6.
- IACOB, G., DINCA, E.B. (2009). Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *Journal of medicine and life*, 2(4):386-93.
- JUNG, B., AHMAD, N. (2006). Melatonin in cancer management: progress and promise. *Cancer Res.* 66(20):9789-93.
- JUNQUEIRA, L., CARNEIRO, J. (2009). *Temel Histoloji.* Nobel Tıp Kitapevi.
- KHURANA VG, TEO C, KUNDI M, HARDELL L, CARLBERG M. (2009). Cell phones and brain tumors: a review including the long-term epidemiologic data. *Surg Neurol.* 2009 Sep;72(3):205-14; discussion 214-5.
- KIERSZENBAUM, A. (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi.* Palme Yayıncılık.
- KİM NW, PIATYSZEK MA, PROWSE KR, HARLEY CB, WEST MD, HO PL, COVIELLO GM, WRIGHT WE, WEINRICH SL, SHAY JW. Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer. *Science* 1994; 266: 2011-5.
- KİNG GB., TU'NEZ I., BELLON A., ORTIZ GG., TAYC FA.(2003); Melatonin prevents cytoskeletal alterations and oxidative stress induced by okadaic acid in N1E-115 cells *Experimental Neurology* 182 (2003) 151–159
- KLEIHUES, P., LOUIS, D.N., WISTLER O.D., BURGER, P.C., SCHEITHAUER, B.W. (2007). WHO classification of tumours of the central nervous system (4th Ed.). International Agency for Research on Cancer (IARC) Lyon. sy:10-11.
- KUTLUK, T., KARS, A. (1992). *Kanser Konusunda Genel Bilgiler.* Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü. Ankara.

- LEVIN, V.A., LEIBEL, S.A., GUTIN, P.H. (2001). *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (6th Ed). sy:2100-60.
- LO'PEZ PM, A' GUEDA MCM, LO'PEZ MF, MUN JR.(2002). Comparison of melatonin versus vitamin C on oxidative stress and antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease induced by okadaic acid in neuroblastoma cells. *European Journal of Pharmacology*. 451 (2002) 237–243
- LO'PEZ, P.M., A' GUEDA M.C.M, LO'PEZ M.F, MUN J.R. (2002). Comparison of melatonin versus vitamin C on oxidative stress and antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease induced by okadaic acid in neuroblastoma cells. *European Journal of Pharmacology*. 451: 237–243
- LOISEAU, H., HUCHET, A., RUÉ, M., COWPPLI-BONY, A., BALDI, I. (2009). Epidemiology of primary brain tumor. *Revue neurologique*. 165(8-9):650-70.
- LOUIS, D.N., OHGAKI, H., WIESTLER, O.D., CAVENEE, W.K., BURGER, P.C., JOUVET, A., SCHEITHAUER, B.W., KLEIHUES, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. 114(2):97-109.
- MARTIN V., SANCHEZ AM., PUENTE-MONCADA N., GOMEZ-LOBO M., ALVAREZ-VEGA MA., ANTOLIN L RODRIGUEZ C., (2014); Involvement of autophagy in melatonin-induced cytotoxicity in glioma-initiating cells. *J Pineal Res*. 2014 Oct;57(3):308-16.doi: 10.1111/jpi.12170. Epub 2014 Sep 9.
- MCGEADY, T., QUINN, P., FITZPATRICK, E., RYAN, M. (2011). *Veteriner Embriyoloji*. Medipres Matbaacılık. 2nd Ed.
- MESCHER, A. (2009). *Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas*. 12rd Ed. The McGraw-Hill Companies.
- MILANOVIĆ D, STIČT C, RÖHRICH M, MAIER P, GROSU AL, HERSKIND C. Inhibition of 13-cis retinoic acid-induced gene expression of reactive-resistance genes by thalidomide in glioblastoma tumours in vivo. *Oncotarget*. 2015 Oct 6;6(30):28938-48. doi: 10.18632/oncotarget.4727
- MIZUSHIMA N, KOMATSU M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 2011; 147 (4): 728-41.
- MOORE, K., PERSAUD, T. (2001). *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*. 8. Baskıdan Çeviri. Nobel Tıp Kitabevleri.

- MORIN GB. Telomere Control of Replicative Lifespan. *Exp Gerontol* 1997; 32: 375-82.
- MU, XC., BRIEN, TP., ROSS, JS., LOWRY, CV., MCKENNA, BJ. (1999). Telomerase activity in benign and malignant cytologic fluids. *Cancer*. 25;87(2):93-9.
- NAKATANI K, YOSHIMI N, MORI H, YOSHIMURA S, SAKAI H, SHINODA J, SAKAI N. The significant role of Telomerase Activity in Human Brain Tumors. *Cancer* 1997; 80(3): 471-6.
- OZAN, H. (2014). Ozan Anatomi. Klinisyen Tıp Kitabevleri. Ankara.
- ÖZDEMİR, M., GÜNEŞ, H.V., BAŞARAN, A., DEĞİRMENCİ, İ., SOLAK, M., COŞAN. (2004). Kronik Lenfositik ve Akut Myeloblastik Lösemili Hastalarda Telomeraz Enzim Aktivitesi Tayininin Önemi; İlk Sonuçlarımız. *Kocatepe Tıp Dergisi*. Cilt: 5, No: 2.
- PONTHAN F, BORGSTROM P, HASSAN M, WASSBERG E, REDFERN CPF, KOGNER P THE VİTAMİN A ANALOGUES: 13-cis Retinoic Acid, 9-cis Retinoic Acid, 13-6307 Inhibit Neuroblastoma Tumour Growth In Vivo *Medical and Pediatric Oncology* 36:127–131 (2001)
- RASHED M M, RAGAB N M. (2004): The pattern of expression of the apoptotic inducer fas and the apoptotic inhibitor bcl-2 oncogenes immunohistochemically in bone-marrow invaded by the non-hodgkin lymphomas. *Turk. J. Haematol.*, 21 (3): 141-147.
- ROSELL, R., DE LAS PENAS, R., BALANA, C., SANTARPIA, M., SALAZAR, F., AGUIRRE, D., I., REGUART, N., VILLA, J., WEI, J., RAMIREZ, J.L., MOLINA, M.A., CAJAL, S.R., JABLONS, D., TARON, M. (2008). Translational research in glioblastoma multiforme: molecular criteria for patient selection. *4(2):219-228*.
- ROSS, M., PAWLINA, W. (2014). *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*. 6. Baskıdan Çeviri. Palme Yayıncılık.
- SADLER, T. (2011). *Langman Medikal Embriyoloji*. 11. Baskıdan Çeviri. Palme Yayıncılık. Ankara.
- SALVESEN GS. Caspases and apoptosis. *Essays Biochem*. 2002;38:9-19. Review. PubMed PMID: 12463158.
- SARKAR, C., JAIN, A., SURİ, V. (2009). Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian Journal of Cancer*. 46(2):108-119.
- SEE, SJ., LEVIN, VA., YUNG, WK., HESS, KR., GROVES, MD. (2004). 13-cis-retinoic acid in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol*. 6(3):253-8.

- SHARMA HW, MALTESE JY, ZHU X, KAİSER HE, NARAYANAN R. Telomeres, telomerase and cancer: is the magic bullet real? *Anticancer Res.* 1996 Jan-Feb;16(1):511-5.
- SHAY, JW., WRIGHT, WE. (1996). Telomerase Activity in Human Cancer . 8(1): 66-71.
- SOFRONIEW, M.V., VINTERS, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica.* 119: 7-35.
- TANER, D. (2011). Fonksiyonel Nöroanatomi. 10. Baskı, ODTÜ Yayıncılık, Ankara.
- TOSUN, M., SOYSAL, Y., MAS, N., KARABEKİR, S. (2011). 13-cis retinoik asid ve melatoninin neuroblastoma hücrelerinin morfolojileri ve viabiliteleri üzerine olan etkilerinin karşılaştırılması. 09-TIP-20
- TOPAL, T., ÖTER, Ş., KORKMAZ, A. (2009). Melatonin ve Kanserle ilişkisi. *Genel Tıp Dergisi.* 19(3): 137-143.
- ÜNAL, T. (2012). Neoplazi. Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi.
- VERKHRATSKY A., BUTT A. (2007). *Glial Neurobiology A Textbook*
- WEIL, R.,J. (2006). Glioblastoma Multiforme- Treating a Deadly Tumor with Both Strands of RNA. *Perspectives.* 3 (1): e31.
- WRIGHT, WE., PIATYSZEK, MA., RAINEY, WE., BYRD, W., SHAY, JW. (1996).Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet.* 1996;18(2):173-9.
- YANG CAO, DANİEL J KLİONSKY, Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein *Cell Research* (2007) 17:839-849. doi: 10.1038/cr.2007.78; published online 25 September 2007
- YILMAZ, A., ALTUĞ F., DÜZ E., ÇIRAK B. (2002) Treatment Options and Effects of Survival in Glioblastoma Multiforme 2012;23(1):25-29 doi: 10.5505
- YOKUŞ, B., ÇAKIR, D. (2012). Kanser Biyokimyası. Dicle Üniv. Veterinerlik Fakültesi Dergisi. *Derleme.* 1(2): 7-18
- YUNG, W.K.A., KYRITSIS, A.P., GLEASON, M.J., LEVIN, V.A. (1996). Treatment of Recurrent Malignant Gliomas with High-Dose 13-cis-Retinoik acid. *Clin Cancer Res.*2(12):1931-5.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Karaman ilinde doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Karaman ilinde tamamladım. 2009 yılında Afyon Kocatepe Üniversitesi Yabancı Diller fakültesinde 1 yıllık İngilizce hazırlık eğitiminden sonra, 2010 yılında Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm'ünde lisans eğitimine başladım. 2011-2013 yılları arasında Afyon Kocatepe üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji/Embriyoloji alanında gönüllü olarak staj yaptım. 2014 yılında lisans eğitimimi bitirip aynı yıl Afyon Kocatepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Pedagojik Formasyon Eğitimine başladım ve 2015 yılında sertifikamı aldım. 2016 yılında Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladım. Bu süreç içerisinde mesleki tecrübemi arttırmak adına uluslararası kongrelere katıldım.