



**MOTESANİB'İN DİKLOFENAK DİETİLAMİN
İLE KOMBİNASYONUNUN ANTİKANSER,
ANTIİNFLAMATUVAR VE
ANTİANJİYOJENİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Nour ALAFANDI

Eskişehir-2025

**MOTESANİB'İN DİKLOFENAK DİETİLAMİN İLE KOMBİNASYONUNUN
ANTİKANSER, ANTİİNFLAMATUVAR VE ANTİANJİYOJENİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nour ALAFANDI

Doktora Tezi

Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Anadolu Üniversitesi

Lisanüstü Eğitim Enstitüsü

Şubat 2025

Eskişehir

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nour ALAFANDI'nın "Motesanib'in Diklofenak Dietilamin İle Kombinasyonunun Antikanser, Antiinflamatuvar Ve Antianjiyojenik Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tezi .../.../20.. tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakoloji Ana Bilim dalında Doktora Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

		<u>Ünvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Danışman)	:		
Üye	:		
Üye	:		
Üye	:		
Üye	:		
			

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

MOTESANİB'İN DİKLOFENAK DİETİLAMİN İLE KOMBİNASYONUNUN ANTİKANSER, ANTİİNFLAMATUVAR VE ANTİANJİYOJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nour ALAFANDI

Farmakoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Şubat 2025

Danışman: Prof. Dr. MİRİŞ DİKMEN

Anjiyogenezis, hücrel sinyal iletim yolları arasında kanser tedavisinde yeni terapötiklerinin geliştirilmesi için önemli bir moleküler hedeftir. EGFR ve PI3Kinaz'ın ifade düzeyleri ve inflamatuvar sitokinlerin kanser hücreleri üzerindeki etkilerinden dolayı, bu yolağın düzenleyicileri, antineoplastik tedavide önem taşımaktadır. VEGF-VEGFR sistemi tümör anjiyogenezisi dahil olmak üzere fizyolojik ve patolojik anjiyogenezde önemli rol oynamaktadır.

Bu çalışmada; bir anjiokinaz inhibitörü olan motesanibin (AMG 706) ve diklofenak dietilaminin, U87MG (Glioblastoma)/THP-1(Monosit) kökültür ortamında antiproliferatif, apoptotik ve antiinflamatuvar etkileri ile HUVEC (İnsan umbilikal ven endotel hücresi) hücrelerinde antiproliferatif ve antianjiyogenik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu nedenle önce U87MG, THP-1 ve HUVEC hücre hatlarında, motesanib, diklofenak dietilamin ve kombinasyon uygulamalarının MTT yöntemi ile sitotoksik etkileri belirlenmiş ve kombin uygulamaların CDI değerleri hesaplanmıştır. Özellikle motesanibin U87MG hücrelerinde antiproliferatif etkileri ile HUVEC hücrelerinde antimigrasyon etkileri gerçek zamanlı analiz sisteminde değerlendirilmiştir. Motesanib ve diklofenak dietilaminin HUVEC hücrelerinde hücre migrasyonuna etkileri morfolojik olarak da çalışılmıştır. U87MG/THP-1 kökültür hücre modeli oluşturularak, glioma hücrelerinde, motesanib ve diklofenak dietilamin kombinasyonlarının apoptotik etkileri Annexin V-PI, kaspaz-3 ve mitokondriyal membran potansiyeli analizleri ile, antiinflamatuvar etkileri de IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8 ve IL-10 sitokin analizleri ile flow sitometride değerlendirilmiştir. Ayrıca ROS ve COX-2 düzeylerine etkiler flow sitometride analiz edilmiştir.

Sonuç olarak, motesanib, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının U87MG ve HUVEC hücrelerinde önemli antiproliferatif etkileri olduğu, özellikle kombine uygulamalarda aditif etkinin meydana geldiği belirlenmiştir. Motesanib HUVEC hücrelerinde konsantrasyon artışına bağlı olarak antimigrasyon etki göstermiş ve antianjiyogenik etkiler meydana getirmiştir. U87MG/THP-1 kökültür modelinde, glioma hücrelerinde motesanib ve diklofenak dietilamin kombinasyonlarının önemli apoptotik (40 μ M motesanib+200 μ M diklofenak dietilaminin) ve antiinflamatuvar (20 ya da 40 μ M motesanib ile 200 μ M diklofenak dietilaminin) etkileri belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Motesanib, Diklofenak dietilamin, Glioblastoma, HUVEC, Antikanser, Antianjiyogenik

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ANTICANCER, ANTIINFLAMMATORY AND ANTIANGIOGENIC EFFECTS OF THE COMBINATION OF MOTESANIB AND DICLOFENAC DIETHYLAMINE

Nour ALAFANDI

Department of Pharmacology

Institute of Postgraduate Education, Anadolu University

February 2025

Supervisor: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Angiogenesis is an important molecular target for the development of new therapeutics in cancer treatment among cellular signaling pathways. Due to the expression levels of EGFR and PI3Kinase and the effects of inflammatory cytokines on cancer cells, regulators of this pathway are important in antineoplastic therapy. The VEGF-VEGFR system plays an important role in physiological and pathological angiogenesis, including tumor angiogenesis.

In this study; It was aimed to investigate the antiproliferative, apoptotic and anti-inflammatory effects of motesanib (AMG 706), an angiokine inhibitor, and diclofenac diethylamine in U87MG (Glioblastoma)/THP-1 (Monocyte) coculture model and the antiproliferative and antiangiogenic effects in HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell) cells. Therefore, firstly, the cytotoxic effects of motesanib, diclofenac diethylamine and combination applications were determined by MTT method in U87MG, THP-1 and HUVEC cell lines and the CDI values of the combined applications were calculated. Especially, the antiproliferative effects of motesanib in U87MG cells and the antimigration effects in HUVEC cells were evaluated by real-time analysis system. The effects of motesanib and diclofenac diethylamine on cell migration in HUVEC cells were also studied morphologically. By establishing the U87MG/THP-1 coculture cell model, the apoptotic effects of motesanib and diclofenac diethylamine combinations in glioma cells were evaluated by Annexin V-PI, caspase-3 and mitochondrial membrane potential analyses, and the antiinflammatory effects were evaluated by IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8 and IL-10 cytokine analyses by flow cytometry. In addition, ROS and COX-2 levels were analyzed by flow cytometry.

In conclusion, it was determined that motesanib, diclofenac diethylamine and their combinations had significant antiproliferative effects on U87MG and HUVEC cells, and that additive effects occurred especially in combined applications. Motesanib showed antimigration effect and produced antiangiogenic effects in HUVEC cells depending on the increase in concentration. In the U87MG/THP-1 coculture model, significant apoptotic (40 μ M motesanib+200 μ M diclofenac diethylamine) and anti-inflammatory (20 or 40 μ M motesanib with 200 μ M diclofenac diethylamine) effects were determined in glioma cells.

Keywords: Motesanib, Diclofenac diethylamine, Glioblastoma, HUVEC, Anticancer, Antiangiogenic

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması, deneysel çalışmaların yürütülmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamalarında sağladığı kıymetli katkılar için; bilgi ve deneyimlerini paylaşarak yol göstermesi, bilimsel bakış açımı geliştirmemde sunduğu rehberlik, her aşamada verdiği destek, sabır ve hoşgörüsü için saygıdeğer hocam Prof. Dr. Miriş Dikmen'e en derin şükranlarımı sunarım. Kendisi, sadece akademik gelişimime değil, bilimsel etik ve disiplin anlayışımın şekillenmesine de büyük katkı sağlamış; bilgi ve tecrübesiyle bana ilham kaynağı olmuştur. Tüm emeği ve katkıları için kendisine sonsuz minnettarım."

"Sitokin analizleri başta olmak üzere laboratuvar çalışmalarında ve tezime dair her aşamada bilgi ve tecrübeleriyle desteğini esirgemeyen; samimi ve destekleyici yaklaşımıyla her zaman yanımda hissettiğim saygıdeğer hocam Prof. Dr. Zerrin Cantürk'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, doktora tezim kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmaların yürütülmesi, analizlerin yapılması ve sonuçların değerlendirilmesinde göstermiş oldukları katkılar için..."

Akademik hayatım boyunca desteğini, bilgisini ve güler yüzünü hiç esirgemeyen, faydalı yönlendirmeleri ile tezime çok önemli katkıları olan çok sevgili hocam Prof. Dr. Rana ARSLAN'a,

Bu zorlu süreçte laboratuvar ve tez aşamalarında birlikte çalışarak birbirimizi motive ettiğimiz, destekleriyle bu yolculuğu daha anlamlı kılan canım yol arkadaşlarıma; laboratuvarda her zaman yardımlarını esirgemeyen sevgili lisansüstü öğrencilerine gönülden teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan, sevgileri, fedakârlıkları ve sonsuz destekleriyle bana güç veren en kıymetlilerim; canım annem Zukaa Asfari'ye, değerli babam Mohamed Alafandi'ye ve sevgili kardeşlerime AYA, JUD ve ÖMAR en derin teşekkürlerimi sunarım.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

Nour ALAFANDI

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Kanser	6
2.1.1. Tanım.....	6
2.1.2. Tarihçe.....	7
2.2. Glioblastoma.....	7
2.2.1. Epidemiyoloji	10
2.2.2. Etiyoloji	11
2.2.2.1. Çevresel faktörler	11
2.2.2.2. Genetik faktörler	12
2.2.2.3. Alerji hikâyesi.....	13
2.2.3. Patofizyoloji.....	13
2.2.4. Histopatoloji.....	13
2.2.5. Gliomların moleküler patogenezi ve histolojisi	14
2.2.6. Glioblastoma ve tümör mikroçevresi.....	31
2.2.7. Tümör ilişkili makrofajlar ve inflamasyon	33
2.2.7.1. Siklooksijenaz (COX) ve prostaglandin E2 (PGE2)	34
2.2.8. Glioblastomada apoptozun düzenlenmesi.....	36
2.3. Motesanib	38
2.3.1. Kimyasal yapısı.....	38
2.3.2. Motesanib'in etki mekanizması.....	39
2.3.3. Farmakokinetik	42
2.4. Diklofenak Dietilamin.....	43

2.4.1. Diklofenak dietilamin'in etki mekanizması	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	49
3.1. Kullanılan Malzemeler	49
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	50
3.3. Kullanılan Malzemelerin Steril Edilmesi.....	50
3.4. Deneylerde Kullanılan U87MG, THP-1 ve HUVEC Hücrelerinin Kültür Ortamında Çoğaltılması ve Sayımı.....	50
3.5. Kullanılan Kimyasal Maddelerin Hazırlanması	52
3.6. MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi	53
3.7. Motesanib, Diklofenak Dietilamin ve Kombinasyonlarının U87MG, HUVEC ve THP-1 Hücreleri Üzerinde Sinerjistik, Additif ve Antagonistik Etkilerinin Değerlendirilmesi	55
3.8. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA-DP) İle U87MG Hücrelerinde Motesanib'in Anti-Proliferatif Etkilerinin Belirlenmesi	56
3.9. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA-DP) ile HUVEC Hücrelerinde Motesanib'in Hücre Migrasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi.....	57
3.10. HUVEC Hücrelerinde Motesanib'in Migrasyona Etkilerinin Morfolojik Değerlendirilmesi	58
3.11. Apoptotik Ve Antiinflamatuvar Etkinin Belirlenmesi İçin U87MG-THP-1 Kokültür Modelinin Oluşturulması.....	59
3.12. Akış Sitometride Annexin V-PI Yöntemi İle Apoptotik Etkinin Belirlenmesi	60
3.13. Akış Sitometride Kaspaz-3 Aktivasyonunun Belirlenmesi.....	61
3.14. Mitokondriyal membran potansiyeli (JC-1)'nin Belirlenmesi.....	62
3.15. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Düzeyinin Belirlenmesi.....	63
3.16. COX-2 düzeyinin Belirlenmesi.....	64
3.17. Akış Sitometride Sitokin (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 ve IL-10) Düzeylerinin Belirlenmesi	64
3.17.1. İnterlökin 1-beta (IL-1 β) sitokin analizi.....	65
3.17.2. TNF- α , IL-6, IL-8 ve IL-10 sitokin analizleri.....	65
3.18. İstatistiksel Değerlendirmeler	66
3.19. Etik Bildirim	66
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	67

4.1. Bulgular.....	67
4.1.1. Motesanib, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının U87MG, HUVEC ve THP-1 hücrelerinde sitotoksik etkilerinin MTT yöntemi ile değerlendirilmesi	67
4.1.2. Motesanib (40, 20, 10 µM) ve diklofenak dietilamin (200, 100, 50 µM) kombinasyonlarının U87MG ve HUVEC hücrelerinde sinerjistik, additif ve antagonist etkilerinin değerlendirilmesi.....	71
4.1.3. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA-DP)’inde U87MG hücrelerinde motesanib’in antiproliferatif etkileri	73
4.1.4. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA-DP) ile HUVEC hücrelerinde motesanib’in hücre migrasyonuna etkileri.....	74
4.1.5. HUVEC hücrelerinde motesanib ve diklofenak dietilamin’in hücre migrasyonuna etkileri	75
4.1.6. Akış sitometride annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi	75
4.1.7. Akış sitometride kaspaz-3 Aktivasyonu ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi	78
4.1.8. Akış sitometride JC-1 boyama yöntemi ile hücrelerin mitokondrial membran bütünlüğünün değerlendirilmesi	80
4.1.9. Akış sitometride ROS düzeylerinin belirlenmesi.....	82
4.1.10. Akış sitometride COX-2 düzeylerinin belirlenmesi.....	84
4.1.11. Akış sitometride sitokin (IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8 ve IL-10) düzeylerinin belirlenmesi.....	86
4.1.11.1. IL-1β sitokin miktarlarının değerlendirilmesi	86
4.1.11.2. TNF-α sitokin miktarlarının değerlendirilmesi.....	88
4.1.11.3. IL-6 sitokin miktarlarının değerlendirilmesi	90
4.1.11.4. IL-8 sitokin miktarlarının değerlendirilmesi	92
4.1.11.5. IL-10 sitokin miktarlarının değerlendirilmesi	93
4.2. Tartışma ve Sonuç.....	94
KAYNAKÇA.....	112
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2. 1. Glioblastomda bildirilen gen değişikliklerine ve mutasyon sıklığına genel bakış (Ohgaki ve Kleihues, 2007; Huang vd., 2007; Nagarajan ve Costello, 2009)	18
Tablo 2. 2. Vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörleri (Shibuya vd., 1995; Donnem, 2010)	30
Tablo 4. 1. U87MG ve HUVEC hücrelerinde MTT sonuçlarına göre hesaplanan %İnhibisyon değerleri.....	70
Tablo 4. 2. U87MG hücrelerine Motesanib, diklofenak dietilamin ve kombine uygulamaların 48 saat için hücre canlılık (%) oranları (ortalama $\pm$ standart hata) ve CDI değerleri	72
Tablo 4. 3. HUVEC hücrelerine Motesanib, diklofenak dietilamin ve kombine uygulamaların 48 saat için hücre canlılık (%) oranları (ortalama $\pm$ standart hata) ve CDI değerleri	72
Tablo 4. 4. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombine uygulamalarını Annexin-PI Apoptoz Sonuçları (%).	76
Tablo 4. 5. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombine uygulamalarını kaspaz-3 seviyelerine etkisi.	79
Tablo 4. 6. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombine uygulamalarını JC-1seviyelerine etkisi	80
Tablo 4. 7. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombine uygulamalarını ROS seviyelerine etkisi	83
Tablo 4. 8. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombine uygulamalarını COX-2 seviyelerine etkisi	84
Tablo 4. 9. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombine uygulamalarını IL-1 β seviyelerine etkisi	87

Tablo 4. 10. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 µM), diklofenak dietilamin (200 µM) ve kombine uygulamalarını TNF-α seviyelerine etkisi	89
Tablo 4. 11. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 µM), diklofenak dietilamin (200 µM) ve kombine uygulamalarını IL-6 seviyelerine etkisi	91
Tablo 4. 12. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 µM), diklofenak dietilamin (200 µM) ve kombine uygulamalarını IL-8 seviyelerine etkisi	92
Tablo 4. 13. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 µM), diklofenak dietilamin (200 µM) ve kombine uygulamalarını IL-10 seviyelerine etkisi	94

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2. 1. TC sağlık bakanlığı 2015 verilerine göre yaşa özel beyin ve sinir sistemi kanserleri.....	10
Şekil 2. 2. Glial tümörlerin gen ekspresyon alt tipleri, Glioblastomanın farklı alt tiplerinin patogenezinde gözlenen sıralı genetik değişiklikler	16
Şekil 2. 3. INK4A tarafından başlatılan hücre döngüsü durdurma yolları	19
Şekil 2. 4. Birincil/De Novo ve ikincil glioblastomalara giden genetik yollar	20
Şekil 2. 5. Glioblastomada hücre döngüsü, proliferasyon ve apoptozda görev alan proteinler	22
Şekil 2. 6. EGFR/PTEN/Akt/mTOR yolu	22
Şekil 2. 7. EGFR'nin hücre içi sinyal ileti yolağı	24
Şekil 2. 8. VEGF sistemi ve reseptörleri	26
Şekil 2. 9. VEGF'ler ve ilgili VEGFR'ler, ilişkili ana sinyal yolları	27
Şekil 2. 10. EP Reseptörleri aracılığıyla PGE2 sinyalleşmesinin gliomagenezdeki rolü	35
Şekil 2. 11. GBM TMC'deki COX-2/PGE2 otokrin ve parakrin geri besleme döngüleri	36
Şekil 2. 12. Motesanib'in kimyasal yapısı	38
Şekil 2. 13. Motesanib'in etki mekanizması	39
Şekil 2. 14. Motesanibin kimyasal yapısı ve tek başına motesanib ile muamele edilen hücre hatlarının konsantrasyon-cevap eğrileri	41
Şekil 2. 15. Motesanib tarafından hedeflenen mekanizmalar arasında VEGF, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve KIT bulunmaktadır	42
Şekil 2. 16. Diklofenak dietilamin'in kimyasal yapısı	44
Şekil 2. 17. COX-2 türevi prostaglandinlerin karsinogenezde rol aldığı farklı mekanizma	47
Şekil 3. 1. MTT'nin yapılışı	55
Şekil 3. 2. İnvazyon ve migrasyon çalışmalarında kullanılan 16 kuyucuklu CIM plaka	58
Şekil 4. 1. Motesanib, Diklofenak dietilamin (DK) ve kombine konsantrasyonlarının, U87MG Hücre Hattında 48. saat % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi (Ortalama $\pm$ Standart hata)	67

Şekil 4. 2. Motesanib, Diklofenak dietilamin (DK) ve kombine konsantrasyonlarının, HUVEC Hücre Hattında 48. saat % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi (Ortalama $\pm$ Standart hata).....	68
Şekil 4. 3. Motesanib, Diklofenak dietilamin (DK) ve kombine konsantrasyonlarının, THP-1 Hücre Hattında 48. saat % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi (Ortalama $\pm$ Standart hata).....	70
Şekil 4. 4. Motesanib konsantrasyonlarının 48 saatlik U87MG hücre proliferasyon eğrileri.....	73
Şekil 4. 5. RTCA DP sisteminde U87MG hücrelerinde Motesanib'in 48. saatteki hücre indeks değerlerine göre IC50 değerinin hesaplandığı konsantrasyon-hücre indeksi eğrisi (IC50: 23 μ M).....	73
Şekil 4. 6. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) ile Motesanibin HUVEC hücrelerinin migrasyonu üzerine etkilerinin zaman ve konsantrasyona bağlı değişimi .	74
Şekil 4. 7. Motesanib (40, 20, 10 μ M) ve diklofenak dietilamin (200 μ M) konsantrasyonlarının HUVEC hücre migrasyonuna etkilerinin 48 saatlik inkübasyon sonundaki ışık mikroskop görüntüleri (MB:10X)	75
Şekil 4. 8. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombine uygulamalarının apoptotik etkilerinin akış sitometride belirlenmesi.....	76
Şekil 4. 9. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombine uygulamalarının kaspaz-3 seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi.....	78
Şekil 4. 10. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombine uygulamalarının mitokondrial membran bütünlüğüne olan etkilerinin (JC-1) akış sitometride belirlenmesi.....	80
Şekil 4. 11. U87MG ve THP-1 (LPS+)ko-kültür hücrelerinde Motesanib (40,20 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombinasyonlarının ROS seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi.....	82
Şekil 4. 12. U87MG hücrelerinde Motesanib (40,20 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombinasyonlarının COX-2 seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi	84
Şekil 4. 13. U87MG hücrelerinde Motesanib (40,20 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombinasyonlarının IL-1 β seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi.....	86

Şekil 4. 14. U87MG hücrelerinde Motesanib (40,20 µM), diklofenak dietilamin (200 µM) ve kombinasyonlarının TNF-α seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi.....	88
Şekil 4. 15. U87MG hücrelerinde Motesanib (40,20 µM), diklofenak dietilamin (200 µM) ve kombinasyonlarının IL-6 seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi.....	90
Şekil 4. 16. U87MG hücrelerinde Motesanib (40,20 µM), diklofenak dietilamin (200 µM) ve kombinasyonlarının IL-8 seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi.....	92
Şekil 4. 17. U87MG hücrelerinde Motesanib (40,20 µM), diklofenak dietilamin (200 µM) ve kombinasyonlarının IL- 10 seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi.....	93



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	:Amerika Birleşik Devletleri
ANOVA	:Varyans Analizi
APC	:Antijen Sunucu Hücre
ASA	:Asetil salisilik asit
ATCC	:American Type Culture Collection
ATRX	:Alfa talasemiX'e bağlı zihinsel gerilik sendromu
BRAF ^{MT}	:BRAF mutant
Cbl	:Casitas B-lineage lymphoma protooncogene
CDI	:İlaç Etkileşim Katsayısı
CDK	:Siklin Bağımlı Kinaz
CI	:Hücre indeksi
COX-1/2	:Siklooksijenaz1/2
DC	:Dendritik Hücre
DMSO	:Dimetilsülfoksit
DNA	:Deoksiribonükleik asit
DSÖ	:Dünya Sağlık Örgütü
ECM	:Ekstraselüler matriks
EDTA	:Etilen diamin tetra asetikasit
EGF	:Epidermal büyüme faktörü
EGFR	:Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT	:Epitelyal mezenkimal değişim
FBS	:Fötal sıgır serumu
FDA	:U.S.Food and DrugAdministration
FGFR	:Fibroblast büyüme faktörü reseptörü
FITC	:Floresein izotiyosiyanat
GATA4	:GATA-binding protein 4
GBM	:Glioblastoma multiforme
GH	:Büyüme hormonunun
HIF	:Hipoksi ileindüklenebilir faktör
IC50	:Medyan inhibitör konsantrasyon

IDH	:İzositratdehidrogenaz
IGF	:İnsülin benzeri büyüme faktörleri
IL-10	:İnterlökin-10
IL-1 β	:İnterlökin-1 β
IL-6	:İnterlökin-6
IL-8	:İnterlökin-8
JAK	:Januskinaz
JC-1	:JC-1 (5,5', 6,6'-tetrahidrokloro-1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolilkarbosiyanin iyodür)
KRAS ^{MT}	:KRAS mutant
LPS	:Lipopolisakkarit
MAPK	:Mitojenle aktive protein kinaz
MMP	:Matriks metalloproteinaz
MEM	:Minimum essential medium
MGMT	:O6-metilguaninDNA metiltransferaz
mTOR	:Rapamisinin memeli hedefi
n	:Tekrarsayısı
NADPH	:Nikotinamid adenindinükleotit fosfat
NSAİ	:Nonsteroidal Antienflamatuar İlaçlar
p	:İstatistiksel anlamlılık
PBS	:Fosfat tamponlu salin solüsyonu
PG	: Prostaglandin
PI	:Propidyum iyodid
PI3K	:Fosfoinositid3-kinaz
PKC	:Protein Kinaz C
PGE2	:ProstaglandinE2
PTEN	:Fosfataz ve tensin homolog
RTK	:Reseptör tirozin kinazlar
RF	: Radyo frekans
RNA	:Ribonükleik asit
ROS	:Reaktif oksijen türleri
RPM	:Dakikadaki dönme sayısı
RTCA DP	:Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi
SSS	:Santral sinir sistemi

STAT	:Sinyal trans duserive transkripsiyon aktivatörü
TAM	:Tümör ilişkili makrofaj
TCA	:Trikarboksilik asit
TERT	:Telomeraz ReversTranskriptaz
TGF α	:Dönüştürücü büyüme faktörü- α
TGF- β	:Dönüştürücü büyüme faktörü- β
TMÇ	:Tümör mikroçevresi
TNF α	:Tümör nekroz faktör α
TP53	:Tümörprotein P53
TPA	:12-O-tetradekanoilphorbol-13-asetat
TXA2	:Tromboksan A2
VEGF	:Vasküler endotelyal büyüme faktörü
MTT	:3-(4,5- dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromür

1. GİRİŞ

Kanser, vücuttaki anormal hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmasıyla ortaya çıkan bir hastalıktır. Dünya çapında önemli bir sağlık sorunu olan kanser, günümüzde endişe verici bir hızla artmaktadır. Her yıl dünya genelinde 12,7 milyon yeni vaka teşhis edilmekte ve 7,5 milyon kişi kanser nedeniyle hayatını kaybetmektedir (Cancer Research UK, 2011).

Kanser tedavisinde, ölüm oranlarını azaltmak ve hastaların yaşam sürelerini uzatmak için farklı tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlar arasında cerrahi müdahale, radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi, immünoterapi gibi klasik yöntemlerin yanı sıra sinyal iletim inhibitörleri, gen tedavisi ve anjiyogenez inhibitörleri gibi yenilikçi yaklaşımlar da bulunmaktadır (Terreo ve Li, 2004).

Kanser hücreleri, otonomi, temas inhibisyonunun kaybı, apoptozun baskılanması, anjiyogenez, ölümsüzlük, invazyon ve metastaz gibi belirgin özelliklere sahiptir (Akbulut ve Akbulut, 2005). Bu özellikler arasında anjiyogenez, şüphesiz en kapsamlı şekilde araştırılanlardan biridir.

Tümörler, yeterli beslenme ve oksijen kaynağına bağımlıdır. Besinlerin difüzyon yoluyla sağlanması, genellikle 1-2 mm çapındaki küçük tümörler için yeterli olsa da, daha büyük tümörlerin büyüebilmesi ve klinik kansere dönüşmesi için yetersizdir. Bu nedenle, tümör büyümesi için “tümör anjiyogenez” adı verilen yeni kan damarlarının oluşumu şarttır. Bu süreç, tümöre gerekli besinleri, oksijeni, proteolitik enzimleri ve diğer temel bileşenleri sağlar (Tobelem, 2007).

Anjiyogenez, mevcut damar yapılarından yeni kan damarlarının oluşumunu ifade eder. Normal fizyolojik koşullarda, bu süreç yalnızca belirli durumlarda, örneğin adet döngüsü sırasında endometrial gelişim, yara iyileşmesi sırasında doku onarımı veya embriyogenez sırasında organ gelişimi gibi durumlarda sınırlı olarak görülür (Maharaj vd., 2006). Ancak, tümörlerle ilişkili anjiyogenez, hastalığın ilerlemesi ve metastazın gerçekleşmesinde kritik bir rol oynar (Konukoğlu ve Turhan, 2005).

Anjiyogenez tetikleyen en güçlü faktörlerden biri, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) olarak bilinir. VEGF, kötü huylu hücrelere oksijen ve besin sağlayarak hayatta kalmalarını ve büyümelerini destekler (Grimm, D., vd., 2009; Hanahan, D., vd., 1996). Ayrıca, VEGF neoplastik dokulara göç eden kemik iliği kaynaklı kök hücreler için bir

kemoatraktan gibi davranarak tümör ilerlemesine katkıda bulunur (Zhang, W., 2014; Rafii, S., 2002).

Tirozin kinazlar (TK'ler), adenozin trifosfatın (ATP) fosfat gruplarını polipeptitlerin tirozin kalıntılarına aktarmasında rol oynar. Bu enzimler, hücresel proliferasyon, farklılaşma, hayatta kalma ve hareket gibi süreçlerin düzenlenmesi için kritik öneme sahiptir (Zhang vd., 2009). Protein kinazlar, proteinleri fosforile ederek onların işlevlerinde değişikliklere neden olur.

Tirozin kinaz reseptör inhibitörleri, kanser tedavisinde hedefe yönelik yaklaşımlar arasında önemli bir yere sahiptir. Bu maddeler, TK'lerin katalitik bağlanma bölgelerinde ATP inhibisyonu yaparak çalışır. Ancak, bu inhibitörlerin etki spektrumları, farmakokinetik özellikleri ve yan etki profilleri çeşitlilik gösterebilir (Hartmann vd., 2009).

Glioma, özellikle yüksek dereceli glioma (HGG), tedavisi oldukça zor, kötü huylu bir beyin tümörüdür. Cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi gibi standart tedavilere direnç göstermesi, tedavi sürecini daha da zorlaştırır. Gliomalar, her biri kendine özgü moleküler özelliklere sahip dört farklı alt tipe ayrılmıştır (Sturn vd., 2012; Verhaak vd., 2010).

Klasik alt tipteki gliomlar, genetik yapılarıyla dikkat çeker ve neredeyse tamamı epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) geninin amplifikasyonunu ve aşırı ekspresyonunu gösterir. Dahası, EGFR amplifikasyonu taşıyan gliomların %50'si, 2-7 ekzonlarından yoksun olan kesilmiş bir reseptör türü olan EGFRvIII'i de barındırır (Gan vd., 2009; Mukherjee vd., 2009; Verhaak vd., 2010; Ymer vd., 2011; Del Vecchio vd., 2013; Gan vd., 2013). Bu mutant reseptör, otoaktif bir şekilde disülfid bağlı homodimer olarak bulunur (Ymer vd., 2011) ve gliomların oluşum sürecinde erken bir olay olarak tanımlanmıştır (Del Vecchio vd., 2013).

EGFR, hücre dışında ligand bağlayıcı bir alan ve hücre içinde tirozin kinaz aktivitesine sahip bir alan içerir. Glioblastomlarda EGFR amplifikasyonu sık görülür ve bu tümörlerin %20-40'ında EGFR'nin vIII varyantı (EGFRvIII) rapor edilmiştir (Rivera vd., 2010; Weller M vd., 2010; Robertson vd., 2011). EGFRvIII, EGFR'den farklı olarak ekzon 2-7'nin delesyonuyla karakterize edilir ve ekstraselüler alanda 267 amino asit kaybına neden olur. Bu, gliomalara özgü bir mutasyon olarak tanımlanır (Rivera vd., 2010).

Laboratuvar alışmaları, glioma hücrelerinde EGFRvIII ekspresyonunun daha invaziv, anjiyojenik ve hızlı çoğalan bir fenotiple ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Gan vd., 2009). Bu fenotip, hücreleri EGFRvIII içermeyen glioma hücrelerine göre kemoterapötik ajanlara ve radyoterapiye karşı daha dirençli hale getirir (Nagane vd., 1998; Mukherjee vd., 2009). Bunun yanı sıra, EGFRvIII in vitro ortamda AKT, mitojenle aktive olan protein kinaz ve S6 gibi reseptör tirozin kinazların (RTK'lar) aşağı akım efektrlerinin fosforilasyonunu tetikleyebilir. Aynı zamanda, birlikte eksprese edilen diğer tekli tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKI'ler) antitümör etkilerini de engelleyebilir (Stommel vd., 2007).

U87MG glioma hücre hattını kullanan in vitro alışmalar, EGFRvIII'n hepatosit büyüme faktörü (HGF) reseptörü (MET), AXL, trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü- (PDGFR-), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 3 (VEGFR3) ve fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3 gibi anahtar reseptörleri transaktive ederek antitümör aktivitesini artırdığını göstermiştir (Huang vd., 2007; Pillay vd., 2009). Özellikle MET'in EGFRvIII tarafından transaktivasyonu, MET ligandı HGF'ye bağlanarak onu nötralize eden klinik aday antikör Rilotumumab'a karşı direnç oluşturur. Ancak, bu direnç EGFR'ye özgü tirozin kinaz inhibitörü (TKI) erlotinib ile hafifletilebilir (Akhavan vd., 2013). Bu bulgular, EGFRvIII aracılı reseptör tirozin kinaz (RTK) etkileşimlerinin glioma tedavi başarısı üzerindeki geniş etkilerini vurgular. EGFRvIII'n tirozin kinaz aktivitesi, RTK transaktivasyonu için kritik bir öneme sahiptir (Pillay vd., 2009). Ancak, bu transaktive RTK'ların in vivo tümör oluşumuna ne ölçüde katkıda bulunduğu ve transaktivasyonlarının altında yatan mekanizmalar hl net değildir.

Motesanib, VEGFR1, VEGFR2 ve VEGFR3' güçlü ve seçici bir şekilde inhibe ederken, PDGFR ve glial hücre büyümesiyle ilişkili reseptörler gibi anjiyojenezde rol oynayan diğer tirozin kinazları da hedef alır. Bu özellikleriyle motesanib, yeni bir sentetik bileşik olarak dikkat çeker (Collett, 1991; Dvorak, 2002). Klinik alışmalar, motesanibin endotelial hücre proliferasyonu ve migrasyonu gibi anjiyojenez süreçlerini bozarak solid tümörlerin büyümesini etkili bir şekilde engellediğini göstermiştir. Bu süreçler, VEGF yolu da dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından düzenlenir ve motesanib gibi VEGFR inhibitörleri, anjiyojenezi bozarak tümör büyümesini yavaşlatma potansiyeline sahiptir (Polverino vd., 2006).

Genel olarak, motesanib kanserle ilişkili endotel hücrelerini ve mikrodamarları hedef olarak antitümör etkiler göstermiştir. Daha da önemlisi, hayvan çalışmaları sırasında motesanibin iyi tolere edildiği ve tedavi süresince hayvanların genel sağlığı veya ağırlığında önemli bir değişiklik olmadığı görülmüştür.

COX-2'nin tümör dokularındaki ifadesinin prognozla yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (Agrez, 1996). Kolorektal kanser hücrelerinde COX-2 aktivitesinin inhibe edilmesinin intrahepatik tümör hücresi çoğalmasını ve karaciğer metastazı oranını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Smakman vd., 2005). Ayrıca, primer tümörden metastaza ilerlerken COX-2 ekspresyonunun arttığı ve proliferatif aktivitenin tümörün yeri, Dukes evrelemesi ve farklılaşma ile korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir (Zhang ve Sun, 2002).

Diklofenak, COX-1'e kıyasla COX-2 üzerinde daha güçlü inhibitör etkisi sayesinde analjezik, anti-enflamatuar ve antipiretik etkiler sunar. Bu etkiler, fenilasetik asit türevi özelliklerinden kaynaklanır (Altman vd., 2015).

Deneyisel çalışmalar, diklofenakın konsantrasyona bağlı bir şekilde tümör ksenograft büyümesini ve kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiğini göstermiştir (Mayorek ve ark., 2010; Smirnova ve ark., 2012). Diklofenakın antikanser etkilerini açıklamak için çeşitli mekanizmalar önerilmiştir ve bunların birçoğu celecoxib gibi diğer COX-2 inhibitörleriyle ortak mekanizmalardır (Pantziarka ve ark., 2016).

COX yolu, prostaglandinler (PG'ler), prostasiklinler ve tromboksanların arakidonik asit ve diğer yağ asitlerinden üretilmesinden sorumludur. Başlangıçta, COX enzimi, hızla biyolojik olarak aktif PGE₂'ye dönüşen PGH-2'nin dönüşümünü katalize eder (Harris ve ark., 2014). COX-1 genellikle çeşitli hücre zarlarında bulunan yapısal bir enzim olarak kabul edilirken, COX-2'nin sitokinler, büyüme faktörleri ve endotoksinler tarafından tetiklendiği bilinmektedir (Tolba ve ark., 2014).

COX-2 enzim sentezindeki artış, pro-inflamatuvar yanıtlar için evrensel bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa B'nin (NF- κ B) aktivasyonu ile başlar. Akut inflamasyon sırasında, endotel, epitel, stromal hücreler, monositler ve lenfositlerdeki COX-2 aktivitesi, PGE₂ üretimini bazal seviyenin 100 katına kadar artırabilir (Harris ve ark., 2014). Yükselmiş PGE₂ seviyeleri, tümör dostu bir mikroçevreye katkıda bulunan kronik inflamasyonla yakından ilişkilidir. Temel olarak, diklofenak (DCF) ve diğer COX enzim inhibitörleri, PGE₂ sentezini azaltarak çalışır ve

DCF'nin birçok antikanser etkisi, doğrudan veya dolaylı olarak PGE2 seviyelerindeki bu azalmaya bağlanır (Pantziarka ve ark., 2016).

DCF dahil olmak üzere çeşitli NSAİİ'lerin anti-proliferatif etkileri, ilk olarak 1994 yılında üç insan kolon kanseri hücre hattı (HT-29, SW480 ve DLD-1) üzerinde yapılan in vitro çalışmalarla değerlendirilmiştir. Bulgular, DCF'nin önemli bir anti-proliferatif aktivite sergilediğini ortaya koymuştur (Hixson ve ark., 1994). Daha sonra, topikal olarak uygulanan DCF'nin hyaluronan ile birlikte in vivo etkileri, kolon-26 adenokarsinom tümörleri ile implante edilen BALB/c fare modeli üzerinde araştırılmıştır. 6 mg/kg'lık topikal bir dozun, kontrol gruplarına kıyasla tümör oluşumunu geciktirdiği ve tümör büyümesini durdurduğu gözlemlenmiştir (Seed ve ark., 1997).

Ayrıca, diklofenak, onkolojide kanserle ilişkili ağrı tedavisinde umut vaat etmektedir. Deneysel çalışmalar, DCF'nin hücre canlılığını azaltma yeteneği nedeniyle bir kemoterapötik ajan olarak da kullanılabileceğini öne sürmektedir. Örneğin, bir çalışma, yüksek konsantrasyonlarda DCF'nin, oldukça agresif kolon kanseri hücrelerinde (HT-29, SW480 ve DLD-1) kontrol gruplarına kıyasla hücre canlılığı kaybını önemli ölçüde artırdığını göstermiştir (Arisan ve ark., 2018).

Motesanib, tümör gelişimi, büyümesi ve yayılmasına etki eden yollar aracılığıyla proliferasyon, angiogenez ve apoptoz üzerinde potansiyel etkiler göstermiş olsa da, beyin kanserindeki antitümör etkileri henüz incelenmemiştir. Bu tez çalışmasında Motesanib (VEGF-1, VEGF-2, VEGF-3 ve PDGF inhibitörü) ile diklofenak dietilamin tekli ve kombinasyonun U87MG, THP-1 ve insan umbilikal ven endotel (HUVEC) hücre hatları üzerindeki Motesanib ve diklofenak dietilamin kombinasyonlarının CDI hesaplamaları ile sinerjistik/antagonistik etkilerinin belirlenmesi, Motesanib'in U87MG glioblastoma hücrelerinde medyan inhibitör konsantrasyon (IC50) değerinin belirlenmesi, Motesanib'in migrasyon üzerindeki etkisinin belirlenmesi, Motesanib'in diklofenak dietilamin ile sinerjistik etki gözlemleyerek konsantrasyonların kombinasyonunun ko-kültür modellerinde antitümör, anti-inflamatuvar ve anti-anjiyojenik etkilerini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

2.1.1. Tanım

Hücreler belli bir program dahilinde büyüyüp gelişir ve nihayetinde de ölür. Yaşamın ilk yıllarında vücut hücrelerinin önemli bir kısmı yetişkinlik dönemine dek son derece büyük bir hız ile bölünmekte iken yetişkinlik sonrası dönemde ise ölen hücrelerin yerinin doldurulması yenileme amacıyla hücreler bölünür. Buna karşın kanser hücreleri herhangi bir neden olsun ya da olmasın kontrolsüz bir şekilde çoğalırlar. Programsız ve kontrolsüz hücre çoğalması çoğu kanser türünün temelini teşkil eder (Bayrak, 2010).

Gelişen dünyada en yaygın görülen hastalık kanserdir (Curigliano vd., 2020). 2020 yılında yaklaşık 20 milyon yeni kanser vakası tespit edilmiş ve bunların 9,9 milyonu ölümle sonuçlanmıştır (GLOBOCAN, 2020). Kanser, oluşum mekanizması açısından bireyler arasında çeşitlilik gösterdiği gibi, hücresel ve moleküler düzeyde de heterojenite ve çeşitlilik ile kendini göstermektedir (Tewary vd., 2017). Normalde metabolizmada hücreler belirli bir düzen dahilinde büyüyüp çoğalmakta olup doku ve organlar da görevlerini normal bir şekilde yerine getirmektedir. Buna karşın kanser durumunda, hücreler anormal şekil ve hızda büyümeye ve kontrolsüz şekilde çoğalmaya başlayarak, tümör oluşumuna neden olmaktadır (Smith vd., 2019). Çeşitli sağlık problemlerine neden olan kanserin hala etkili bir tedavi şekli bulunmamaktadır (Siegel vd., 2017). Günümüzde kardiyovasküler hastalıklardan sonra en fazla ölümle sonuçlanan sağlık sorunlarının temelinde kanser bulunmaktadır. Kanserin oluşma sürecine ve gelişimine çevresel faktörler ve kalıtsal etmenler neden olmaktadır (Yar, 2012; Babat, 2014).

Kanserin genetik bir hastalık olarak tanımlanması, kanserin tanısında, prognozunda ve tedaviye yönelik yaklaşımlarında yeniden gözden geçirilmeyi gerektiren yeni bir açılıma neden olmuştur. Bu yeni yaklaşımlar kanser biyolojisi ile ilgili çalışmaların hız kazanmasında etkili olmaktadır. Çoğu kanser tipi için, tanı kriterleri, prognozu ve tedaviyi doğrudan etkileyen pek çok genetik değişim tanımlanmıştır. Ayrıca kanserin çok evreli gelişiminde açıklanmayı bekleyen önemli birçok nokta bulunmaktadır (Ay vd., 2006).

2.1.2. Tarihçe

Kanseri ve çeşitli türlerini anlama yolculuğu, 17. yüzyılda başlamış ve bu alanda önemli adımlar atılmıştır. Giovanni Morgagni'nin otopsileri, onkolojiye erken dönemde yapılan önemli bir katkıydı, çünkü bu otopsiler ölümle sonuçlanan patolojik farkları ortaya koyarak gelecekteki kanser araştırmalarına zemin hazırladı (Hunt, 2000; Baykara, 2016).

19. yüzyılda, mikroskop teknolojisinin gelişimi, onkolojinin resmi bir çalışma alanı haline gelmesinde kilit bir rol oynamıştır. Hücre patolojisinin öncülerinden biri olan Rudolf Virchow, onkolojiyi modern patolojiyle birleştirerek kanser tedavisinin kapsamını genişletmiştir. Kanserin yalnızca tanısını koymaya odaklanmak yerine, cerrahi müdahaleleri dahil etme kavramını tanıtarak daha hassas tanıları konulmasını sağlamış ve ameliyatlarda sırasında alınan doku örnekleri sayesinde kanser ve tedavisi hakkında yeni bilgiler sunmuştur (Reese, 1998).

20. yüzyıl da kanser epidemiyolojisinde önemli atılımlar getirmiştir. 1713 yılında, ünlü İtalyan hekimi Bernardino Ramazzini, rahibelerde servikal ve meme kanserini karşılaştırırken kritik bir gözlemlerde bulunmuş ve yaşam tarzının kanser gelişimindeki hayati rolünü vurgulamıştır. Bu, hormonal faktörlerin—gebelik veya enfeksiyonlarla bağlantılı olanların—kansere nasıl katkıda bulunabileceği konusunda daha derin bir anlayışın kapılarını açmıştır. Bu dönemde, tümör dokusu çıkarılmadığı takdirde hastalığın hızla ilerleyeceği açık hale gelmiş ve tümörlerin çıkarılması için cerrahi tekniklerin geliştirilmesine yönelik motivasyon sağlamıştır. Kan transfüzyonu ve anestezinin keşfinden önce birçok cerrahi işlem yapılmış olsa da, anestezinin tanıtılması "cerrahi yüzyılın" başlangıcını müjdelemiştir (Felton, 1997).

2.2. Glioblastoma

Beyin tümörleri genel popülasyonda en sık görülen hastalıklar arasındadır. Bazı beyin tümörleri asemptomatik olup tesadüfen tespit edilirken, focal nörolojik semptomlar, nöbetler veya baş ağrıları ile tespit edilen türleri de vardır. En sık görülen beyin tümörleri sistemik kanserler, menenjiyomlar ve gliomaların, özellikle de glioblastomaların intrakranyal metastazlarıdır. Merkezi sinir sistemi metastazları nöroks boyunca herhangi bir yerde meydana gelebilir ve bu nedenle hastalığın tanı ve tedavisinde nöroşirürji, radyasyon onkolojisi ve tıbbi onkoloji ile karmaşık multidisipliner koordinasyon gerektirir. Menenjiyomlar genellikle iyi huylu tümörlerdir

ve sıklıkla radyasyon terapisi ve kemoterapiyle birlikte cerrahi müdahaleyle tedavi edilirler. Bunlar, gliomatöz olmayan primer beyin tümörlerinin en yaygın türüdür ve beyin tümörlerinin %20'sini oluşturur. Beyin tümörlerinin yaklaşık %10'unu oluşturan Schwannomlar ikinci en sık görülen türdür. Spesifik tümör tipleri genellikle belirli yaş gruplarında karakteristik olarak gözlenir. Medulloblastoma genellikle çocuklarda, glioblastoma ise yaşlılarda görülür. Malign gliomalar, primer beyin tümörlerinin en yaygın ve invaziv türüdür. Cinsiyete özel istatistikler primer beyin tümörlerinin erkeklerde daha sık görüldüğünü (%55) göstermektedir (Dolecek vd., 2012; McFaline-Figueroa ve Lee, 2018).

Astrositik glial hücrelerden kaynaklanan en yaygın beyin tümörü olan glioblastom, ilk olarak 1865 yılında Alman patolog Rudolf Virchow tarafından tanımlanmıştır (DeAngelis vd., 2011).. Klinik ve cerrahi bakımdaki gelişmelere rağmen, glioblastom hızlı bir şekilde ilerlemeye devam etmekte, ölümle sonuçlanmakta ve kötü bir prognoza sahiptir (Ohgaki vd., 2004).

Glioblastoma multiforme (GBM) yetişkinlerde en sık görülen primer beyin tümörüdür ve malign primer beyin ve MSS tümörlerinin %45,2'sini oluşturur. GBM, medyan sağkalım süresi 15 ay olan tedavi edilemez bir hastalık olmaya devam etmektedir. Hastaların yalnızca %5,5'i tanıdan beş yıl sonra hayatta kalabilmiştir. GBM'ler, farklı yaşlardaki hastaları etkileyen ve sonuçlarda farklılıklar gösteren farklı genetik yollarla gelişen birincil ve ikincil alt tiplerden oluşmaktadır.

Primer GBM'ler GBM'lerin %80'ini oluşturur ve ortalama yaşı 62 yıl olan yaşlı hastalarda ortaya çıkarken, sekonder GBM'ler ortalama yaşı 45 yıl olan genç hastalarda düşük dereceli astrositom veya oligodendrogliomdan kaynaklanır. İkincil GBM'ler genellikle ön lobda yerleşir, daha az nekroz derecesine sahiptir ve birincil GBM'lere göre daha iyi bir prognoza sahiptir.

Primer ve sekonder glioblastom olmak üzere iki farklı türü vardır. Sekonder glioblastomlar orta yaşlı hastalarda düşük dereceli (WHO evre II) veya anaplastik astrositomdan (WHO evre III) ilerleyerek daha yavaş gelişirken, primer glioblastomlar öncül lezyonlar olmadan, kısa bir klinik öyküden hemen sonra ve tipik olarak yaşlı hastalarda hızla ortaya çıkar (Ohgaki vd., 2004; Filippini vd., 2008).

GBM çocuklarda oldukça nadir görülür ve tipik olarak ileri yaş gruplarında teşhis edilir (Ostrom vd., 2013). Gupta ve Sarin'e (2002) göre, medyan sağkalım süresi 6-9 ay olan

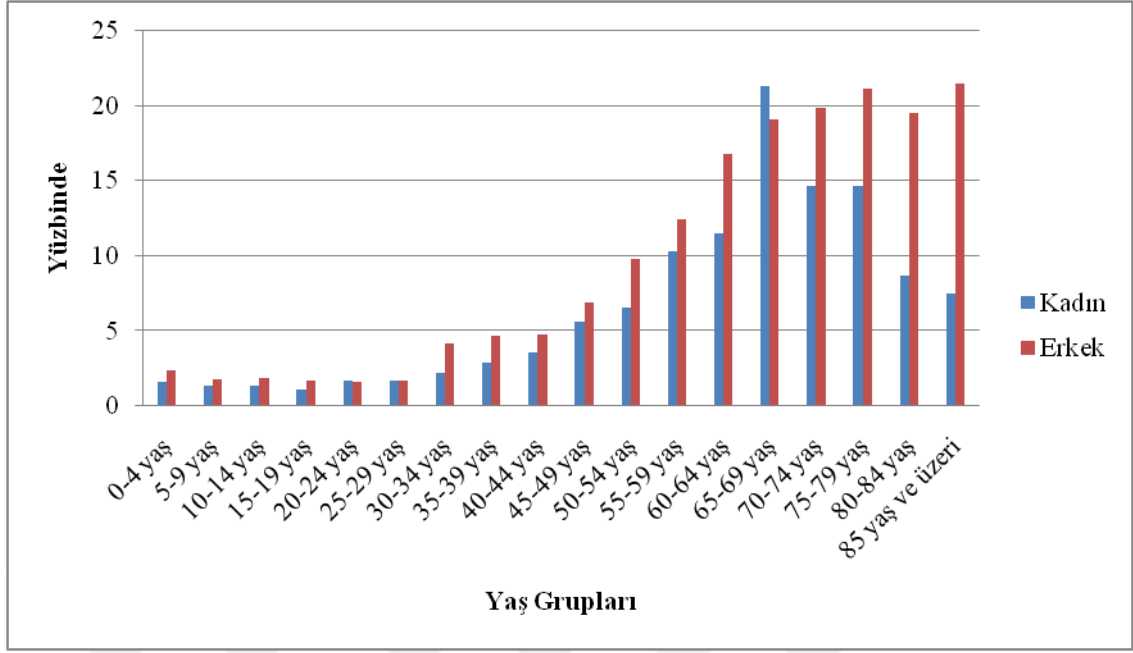
yüksek dereceli gliomlu genç hastalar olumlu prognoza sahip olarak kabul edilirken, medyan sağkalım süresi 12-24 ay olan daha yaşlı ve daha az başarılı hastalar kötü prognoza sahip olarak kabul edilmektedir.

Hastalık özellikle 70'li yaşlarda zirve yapar ve 80 yaşından sonra azalır. Hansen ve arkadaşları (2018) GBM hastalarının %83'ünün 50 yaşın üzerinde olduğunu bildirmiştir. Cheo ve arkadaşları (2017) ile Gosh ve arkadaşları (2017) hastaların tipik olarak 60'lı yaşlarda olduğunu bildirmiştir. Li ve arkadaşları (2018) hastaların %47,9'unun 65 yaşın üzerinde olduğunu bildirmiştir.

Dünyada en yüksek GBM insidansı ABD'de görülmektedir. Ostrom ve arkadaşlarına (2015) göre, bu sıklığın 100.000 kişide 3,2 olması ve özellikle yaşlı hastalarda (75 ila 84 yaşındakiler) 100.000 kişide maksimum 15,24'e ulaşması beklenmektedir. Raporlara göre, GBM beyaz ırkta siyalara göre daha yaygındır ve Avrupalı Amerikalılarda Afrikalı Amerikalılara göre 2,5 kat daha yaygındır (Thakkar vd., 2014; Song vd., 2009).

T.C. Sağlık Bakanlığı'nın 2015 verileri (Şekil 2.1), her iki cinsiyette de GBM insidansının erken yetişkinlik döneminde artmaya başladığını göstermektedir. Kadınlar için 65 yaşında zirve yapıp yaşla birlikte azalırken, erkekler için yaşa bağlı olarak artmakta ve hiç durmamaktadır. Erkeklerde görülme sıklığı kadınlara göre daha yüksektir (Özduman vd., 2019).

Tüm merkezi sinir sistemi tümörlerinin %14,5'ini ve malign merkezi sinir sistemi tümörlerinin %48,6'sını oluşturan en agresif malignitelerden biri olan GBM'li hastalarda tümör en sık supratentorial bölgede (frontal, temporal parietal ve oksipital loblar) görülürken (Grochans vd., 2022) omurilik ve beyincikte ise nadiren görülmektedir (Engelhard vd., 2010; Adams vd., 2013)



Şekil 2. 1. TC sağlık bakanlığı 2015 verilerine göre yaşa özel beyin ve sinir sistemi kanserleri (T.C. Sağlık Bakanlığı HSGM, 2015)

2.2.1. Epidemiyoloji

2013 CBTRUS (Central Brain Tumour Registry of the United States) raporuna göre, GBM'nin yaşa göre düzeltilmiş yıllık ortalama insidans oranı (IR) 3,19/100.000 nüfustur. Bu, malign beyin ve MSS tümörleri arasında en yüksek insidans oranıdır. GBM öncelikle medyan yaşı 64 olan yetişkinlerde teşhis edilir. Çocuklarda çok nadir görülür. İnsidans yaşla birlikte artar, 75-84 yaşlarında pik yapar ve 85 yaşından sonra düşer. Amerika Birleşik Devletleri'nde artan yaşlanan nüfus göz önüne alındığında vaka sayısının artması beklenmektedir.

GBM'ler erkeklerde daha fazla bildirilmektedir; erkeklerde görülme oranı kadınlardan %1,57 daha fazladır (Ostrom vd., 2013). Primer GBM'lerin sıklığı erkeklerde daha fazladır ve sekonder kadınlarda daha yaygındır (Ohgaki vd., 2004). GBM insidansı beyazlarda daha fazladır ve bunu siyahlar takip eder. GBM'ler yaygın olarak supratentorial bölgede görülür, ancak çok nadiren serebellum ve omurilikte bulunur.

Araştırmalar, glioblastoma multiforme (GBM) hastalarında vücut kitle indeksi ve obezite ile hastalık veya ölüm riski arasında bir ilişki olmadığını göstermiştir (Helseth vd., 1989; Jones vd., 2010; Wiedmann vd., 2017). Genç yaşlardaki yüksek VKİ (>30) değerlerinin ileri yaşlarda GBM görülme sıklığıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Moore vd., 2009; Little vd., 2013).

Uzun boylu olmak GBM için bir başka risk faktörüdür çünkü genler, sinyal yolları ve ilişkili hormonlar - özellikle büyüme hormonu (GH) ve insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF) - kanser gelişimine katkıda bulunur (Tripaldi vd., 2013; Perry vd., 2013; Watts vd., 2019; Boguszewski vd., 2019). Konu üzerine gerçekleştirilen çalışmalarda erkeklerde ve kadınlarda uzun boylu olmanın GBM riskinde artışa neden olduğu (Helseth vd., 1989; Wiedmann vd., 2017, Cote vd., 2018) saptanmış olmakla beraber bu riskin erkeklerde daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Jones vd., 2010).

2.2.2. Etiyoloji

2.2.2.1. Çevresel faktörler

Radyasyona maruz kalmanın beyin tümörü büyümesiyle bağlantısı açıktır. Radyasyon DNA'ya zarar verebilir. Çalışmalar atom bombasından kurtulanalarda (Preston vd., 2002), kafa derisi enfeksiyonu için düşük radyasyon alan kişilerde (Ron vd., 1988), hipofiz bezi büyümeleri için düşük radyasyon alan hastalarda (Minniti vd., 2005) ve çocukluk kanserleri için yüksek radyasyon alan çocuklarda (Neglia vd., 2006) daha fazla beyin tümörü olduğunu göstermektedir. Radyasyona maruz kalınan yaştan daha genç olması glioma beyin tümörü riskini daha fazla artırmaktadır. Ayrıca, yakın zamanda yapılan bir inceleme, radyo dalgalarının da insan beyin lobu gliomlarına neden olduğunu göstermektedir (Carlberg ve Hardell, 2017). Egzama, astım veya solunum yolu alerjisi öyküsü olan hastalarda gliom gelişme riskinin azaldığı keşfedilmiştir. Bu ilişkinin altında hangi mekanizmanın yattığı bilinmemektedir (Amirian vd., 2016). Bazı teorilere göre, egzama ve astım öyküsü glioma büyümesini önleyebilir. Kauçuk üretimi, petrol üretimi, vinil klorür, pestisitler, ormancılık işleri ve temizlik hizmetleri gibi mesleklerde kimyasal kanserojenlere maruz kalmanın yanı sıra pasif sigaraya maruziyet gibi birçok farklı faktör de öne sürülmüş ancak henüz kanıtlanmamıştır (Wrensch vd., 2002). İlginç bir şekilde, artan sosyoekonomik durum glioma riskini de artırmaktadır (Demers vd., 1991). 10 yıldan uzun süredir cep telefonu kullanımını inceleyen bir meta-analizde ipsilateral glioma riskinde hafif bir artış görülmüştür (Khurana vd., 2009). Nörofibromatozis, tüberoskleroz, Turcot sendromu ve Li-Fraumeni sendromu gibi bazı genetik durumlar glioblastom gelişme riskinin daha yüksek olmasıyla ilişkilidir. Bu koşullar genellikle DNA uyumsuzluk onarım enzimlerinde kusurlar içerir ve glioblastomlar kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanserli hastalarda da gözlenmiştir (Adamson vd., 2009).

2.2.2.2. Genetik faktörler

Hastalık modelleri üzerine yapılan çalışmalar, beyin tümörü vakalarının %25'inde genetiğin bir faktör olduğunu tahmin etmektedir. İki'den fazla üyesinde beyin tümörü olan aileler vakaların %5-10'unu oluşturmaktadır. Bu ailelerin 5'te 1'i (tüm beyin tümörlerinin %1'i) hastalığın aktarıldığına dair net bir model göstermektedir. Bununla birlikte, en yaygın beyin tümörü olan GBM'nin genel oranı her 100.000 kişide sadece 5'tir. Hastalığın kalıtsal olduğu aileler için risk 10.000'de 1 olsa bile, bu hala nadirdir. Bu nedenle, aynı ailede birden fazla kişinin beyin tümörü geliştirmesi nadir bir olaydır. Bazı ailelerde beyin tümörleri diğer kalıtsal sağlık koşullarıyla bağlantılıdır. Gliomun görüldüğü sendromlar ve bozukluğu saptandığı genler aşağıdaki gibidir:

- Nörofibromatozis Tip 1 (NF1)
- Nörofibromatozis Tip 2 (NF2)
- Lynch sendromu (MSH2, MLH1, MSH6, PMS2, EPCAM)
- Li/Fraumeni sendromu (TP53)(Tümör protein p53) p53, 17p kromozomunda yer alan, iyi araştırılmış tümör baskılayıcı gendir. P53'ün inaktivasyonu, gliomada en sık mutasyona uğrayan tümör baskılayıcılardan biridir ve derece II ve III gliomada ~%50, primerde %25-30 ve sekonder GMB'de %60-70'e karşılık gelmektedir. (England vd., 2013). Bununla birlikte, p53, en yaygın ve ölümcül yetişkin beyin malignitesi olan glioblastoma (GBM) vakalarının çoğunda mutasyona uğramış halde kalır (Brennan vd., 2013). Bir çalışmada, p53 geninin baculovirüs aracılı iletiminin bir histon deasetilaz inhibitörü olan sodyum bütirat ile kombinasyonunun, glioma hücrelerinin büyümesini belirgin şekilde azalttığı ve glioma taşıyan hayvanların hayatta kalma oranını artırdığı gösterilmiştir. (Guo ve ark., 2011).
- Turcot sendromu (APC, MLH1, PMS2)
- Cowden sendromu (PTEN)
- Tuberoz Skleroz (TSC1, TSC2)

Bunların yanı sıra BRCA2, ATM, APC, DMBT1, MSH2, MSH6, MLH1, NF1, NF2, NBN, CDKN2A, PMS2, TP53, PTEN, TSC1 ve TSC2 genlerinde meydana gelebilecek olan mutasyonların sendromik ailesel gliomlara neden olabildiği bildirilmiştir (Melin, 2011).

2.2.2.3. Alerji hikâyesi

Epidemiyolojik kanıtlar, henüz tanımlanmamış bir mekanizma aracılığıyla, atopik vücut ve solunum alerjileri, astım ve egzama dahil olmak üzere alerji öyküsünün GBM riskini azalttığını göstermektedir (Amirian vd., 2016).

2.2.3. Patofizyoloji

Malign hücreler mutasyonlar nedeniyle anormal proliferasyon, büyüme ve anjiyojeneze sahiptir (Olar ve Aldape, 2014). GBM'nin birçok genetik ve epigenetik mutasyona sahip olduğu bulunmuştur. Klinik seyir boyunca tümör davranışını ve tedavi direncini anlamak için mutasyonların tanımlanması ve sınıflandırılması önemlidir. GBM kök hücrelerindeki anahtar mutasyonlara ek olarak farklı tetikleyici mutasyonların varlığı nedeniyle glioblastoma multiforme, nöral kök hücre öncüllerinden kaynaklanan birincil tümörler ve astrositler gibi olgun nöral hücrelerdeki mutasyonlardan kaynaklanan ikincil tümörler olarak sınıflandırılır. Genetik bilgidaki değişiklikler, genlerin sağlıklı beyin hücrelerindeki fizyolojik seviyelerine kıyasla ekspresyonuna ve baskılanmasına neden olarak hem hücresel hem de hücre dışı matris değişikliklerine yol açar ve çok sayıda biyokimyasal formu sonuçlanır. Bu nedenle, genotipik çeşitliliğin boyutu nedeniyle multiforme adı verilmiştir (Stoyanov vd., 2018).

2.2.4. Histopatoloji

GBM atipik hücreler, nükleer hiperkromazi, artmış mitotik figürler, anjiyojenez ve nekrotik alanlar gibi malign tümörlerin tipik özelliklerine sahiptir. GBM yüksek vaskülariteye sahiptir (Linkous ve Yazlovitskaya, 2011). Yeni oluşan damarların, normalde beyin endotel hücrelerinde bulunmayan çoklu Weibel-Palade cisimcikleri içerebileceği de bildirilmiştir. Damarlar endotel hasarına ve proliferasyona yol açan trombüsler içerebilir ve yüksek dereceli gliomaların histolojik özelliklerinden biri, bu neovaskülarizasyon sıklıkla glioblastoma multiforme (GBM) için tanısal bir kriter olan karmaşık glomeruloid yapıların oluşumuyla ilişkilidir. Elektron mikroskop çalışmaları, malign gliomalardaki küçük kan damarlarının morfolojisinin, bunların kaynaklandığı normal beyin mikrodamarlarından önemli ölçüde farklı olduğunu göstermiştir (Hirano vd., 1975; Long, 1970; Nyström, 1960; Torack, 1961). Bu anormal damarları kaplayan endotel hücrelerinde hiperplazi, Weibel-Palade cisimciklerinin sayısında artış (Hirano, 1974) ve interendotelyal bağlantılarda GBM'de kan-beyin bariyeri defektinde ve artmış damar geçirgenliğinde önemli bir rol oynayabilecek fokal distansiyonlar görülür

(Coomber vd., 1987).

İki nekrotik bölge modeli gözlenir; biri merkezde yetersiz kan akımı ile sonuçlanan büyük bir nekrotik alan, diğeri ise psödopalisading ile çevrili çok sayıda küçük odaktır. Birincisi tipik olarak primer glioblastomda görülürken, ikincisi hem primer hem de sekonder çeşitlilikte görülür (Urbańska vd., 2014).

DSÖ sınıflandırması GBM'yi histopatoloji ve moleküler paternlere göre kategorize eder. Histopatolojiye göre, astrositomlar glial fibriler asidik protein (GFAP) içerir. Ekspresyon kaybı malignitenin arttığını gösterir ve farklılaşmamış tümör hücrelerini belirtir. Moleküler patern, immünohistokimya (IHC) ile tespit edilen IDH-mutant ve IDH-wild tipini içerir.

Tümörler morfolojik olarak WHO tarafından grade I-IV olarak sınıflandırılır. Derece I benign tümörleri; derece II nispeten benign tümörleri; derece III düşük dereceli malign tümörleri ve derece IV agresif malign tümörleri temsil eder. Derece IV tümörler genellikle 6-12 aylık bir medyan sağkalım süresine sahiptir. Glioblastoma multiforme derece IV olarak sınıflandırılır.

2.2.5. Gliomların Moleküler Patogenezi ve Histolojisi

Frosch ve arkadaşlarına (2010) göre, gliomlar anaplazi, yüksek mitotik aktivite seviyeleri, hücrel pleomorfizm, nükleer atipi ve mikrovasküler proliferasyon ile nekroz gibi çeşitli ayırt edici histolojik özellikler sergilemektedir. Verhaak ve arkadaşları (2010) gen ekspresyonlarına dayanarak dört tür yüksek dereceli gliom tanımlamıştır: Bunlar: proneural, nöral, klasik ve mezenkimal gliomlardır. (Van Meir EG.,2010) Şekil 2.2 gen ekspresyonlarına göre glial tümörlerin alt tiplerini göstermektedir. Glioblastomda yaygın bir mutasyon, klasik alt tipin %100'ünü etkileyen kromozom 10'un delesyonu ile kromozom 7 amplifikasyonudur. Yüksek düzey EGFR amplifikasyonu klasik alt tipin %97'sinde ve seyrek olarak diğer alt tiplerde bildirilmiştir (Verhaak vd., 2010). Düşük NF1 ekspresyonu ve NF1 genini içeren 17q11.2 üzerindeki bir bölgenin lokalize homozigot delesyonu mezenkimal alt tipi karakterize eder.

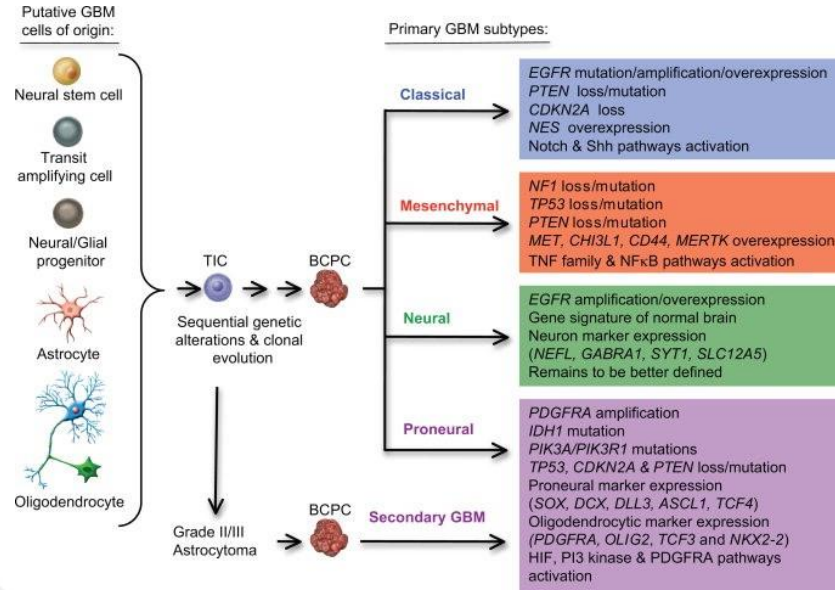
Düşük NF1 ekspresyonu ve 17q11.2'de NF1 genini kapsayan bir bölgenin lokalize homozigot delesyonu mezenkimal alt tipin özellikleridir. Mezenkimal alt tip, her ikisi de , yolunu kesen yedi yaygın Protein tirozin fosfotaz ve tensin homoloğu (PTEN) ve

NF1 mutasyonundan altısıyla ilişkilendirilmiştir (Verhaak vd., 2010). Proneural alt tip çoğu tümör baskılayıcı protein 53 (TP53) mutasyonu, izositrat dehidrogenaz (IDH1) değişiklikleri ve platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGFRA) ile ilişkilendirilmiştir.

Sitoplazmadaki izositrat dehidrogenaz (IDH) enzimleri, TCA döngüsünde izositratın alfa-ketoglutarata geri dönüşümsüz oksidatif dekarboksilasyonunu katalize ederek kritik bir rol oynar. Bu süreç, döngü için önemlidir çünkü ilk NADH molekülünü üretir ve hücreyi reaktif oksijen türlerinden korumaya yardımcı olur. Ayrıca, CO₂ serbest bırakır, bu da TCA döngüsündeki hız sınırlayıcı adımlardan biri olmasını sağlar. Enzim, düşük enerji seviyelerini belirten kalsiyum ve ADP tarafından alosterik olarak aktive edilir ve hücrenin enerji depoları dolu olduğunda ATP ve NADH artışıyla inhibe edilir (Devlin, 2006; Geisbrecht vd., 1999).

IDH1 genindeki mutasyonlar sekonder glioblastomlarda yaygın olarak görülür (%80'in üzerinde) ancak primer glioblastomlarda daha az sıklıktadır (Yan vd., 2012; Kloosterhof vd., 2010). Mutant IDH enzimleri alfa-ketoglutaratı bir onkometabolit olan 2-hidroksiglutarata (2-HG) dönüştürür. Bu durum gliomlarda gözlenen yüksek 2-HG seviyelerini açıklamaktadır (Dang vd., 2009). 2-HG'deki artış ve alfa-KG'deki azalma hücrel farklılaşmayı engeller (Lu C vd., 2012). Ayrıca, mutant IDH enzimleri hipermetilasyon yoluyla epigenetik değişikliklere neden olarak bazı genleri susturur (Laffaire vd., 2011). Sonuç olarak, alfa-ketoglutarat ve NADPH seviyeleri düşerek gerekli hücrel süreçleri bozar ve hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesine yol açar (Xu vd., 2004).

Watanabe ve arkadaşları (1997) glioblastomun proneural alt tipinin genç yaş, PDGFRA genindeki mutasyonlar ve IDH1 ve TP53'teki değişikliklerle ilişkili olduğunu ve bunların hepsinin ikincil glioblastomlarla bağlantılı olduğunu bulmuştur. Verhaak ve arkadaşlarına (2010) göre, en iyi bilinen ikincil glioblastomlar proneural olarak kategorize edilir. Oligodendrogliomlardaki benzer özellikler, bunların progenitör veya nöral kök hücrelerden kaynaklanabileceğini ve potansiyel olarak nöral glioblastomlara yol açabileceğini düşündürmektedir (Verhaak vd., 2010).



Şekil 2. 2. Glial tümörlerin gen ekspresyon alt tipleri, Glioblastomanın farklı alt tiplerinin patogenezinde gözlenen sıralı genetik değişiklikler

Normal beyindeki bazı hücreler genetik değişikliklere uğrar ve bu da tümör başlatan hücrelerin (TIC'ler) popülasyonuna yol açar; bunlar daha sonra genetik ve epigenetik değişiklikleri biriktirip beyin kanserini yayan hücelere (BCPC) dönüşebilir. Son hücreler glioblastoma oluşumundan sorumludur. EGFR, Epidermal büyüme faktörü reseptörü; GBM, glioblastoma multiforme; HIF, hipoksi ile indüklenebilir faktör; IDH, izositrat dehidrojenaz; PDGFRA, platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü-A; PI3 kinaz, fosfatidilinositol-3 kinaz; PTEN, fosfataz ve tensin homologue; TNF, tümör nekroz faktörü (Van Meir, 2010).

Glioblastoma, insanlarda en sık görülen ve en agresif beyin tümörü türüdür. Yoğun moleküler analizler, DNA hasarı ve onarımı, apoptoz, hücre göçü, anjiyogenez ve hücre döngüsünde yer alan çeşitli düzensiz genetik yolları ortaya çıkarmıştır. DNA hasarı tespit edilirse hücre döngüsü ayrıca kontrol noktalarında ve p53 gibi hücre döngüsü inhibitörleri tarafından durdurulabilir. Bu bölümde glioblastomda genetik değişikliklerden kaynaklanan potansiyel yeni hedeflere odaklanılacaktır. Glioblastoma vakalarının çoğunluğu, daha az kötü huylu bir öncü lezyonun majör klinik veya histolojik kanıtı olmaksızın hızla büyüyen primer beyin tümörleridir. Bu tümörler çoğunlukla yaşlıları etkiler ve genetik olarak kromozom10q üzerinde tümör baskılayıcısı heterozigosite kaybı“Loss of heterozygosity” (LOH),epidermal büyüme faktörü reseptörü(EGFR) amplifikasyonu, p16INK4A(NK4 cdk inhibitörleri ailesiprototip üyesidir) delesyonu ve PTEN(fosfataz ve tensin homoloğu) mutasyonları ile karakterize edilir (Tablo 2.1) (Ohgaki ve Kleihues, 2007; Huang vd., 2007; Nagarajan ve Costello, 2009). PTEN, kromozom 10q23.3 bölgesinde bulunan ve beyin tümörlerinde sıklıkla kaybolan ya da düşük seviyelerde ifade edilen bir tümör baskılayıcı gendir (Li vd., 1943). PTEN, hücre proliferasyonu, yapışma, invazyon, apoptoz ve DNA hasarını onarma gibi hayati işlevlerde önemli bir rol oynar (Ming vd.,

2012; Ortega-Molina, 2013; Koul, 2008). Bu genin işlevinin bozulması, tümörlerin gelişmesine ve yayılmasına katkıda bulunabilir, bu nedenle PTEN, kanser tedavisinde önemli bir hedef olarak kabul edilmektedir.

PTEN kromozomun 10q23 bölgesinde yer alan, fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfatı [PIP3] fosfatidilinositol 4,5-bisfosfata [PIP2] dönüştürerek lipid fosfataz görevi görür (Maehama, 1998). PTEN'in bu lipid fosfataz aktivitesi, aşağı yöndeki onkogenik AKT ve mTOR sinyal kaskadlarının aktivasyonunu baskılar ve bunun doğal bir sonucu olarak hücre sağkalımı, hücre büyümesi ve çoğalmasının düzenlenmesinin bozulmasına sebep olmaktadır (Song, 2012) (Şekil 2.2).

Sekonder glioblastom tümörleri, düşük dereceli diffüz astrositom veya anaplastik astrositomdan progresyon yoluyla gelişir ve daha genç hastalarda belirgindir (Khasraw ve Lassman, 2007). Tümör baskılayıcı gen TP53'ün bozulması birçok insan malignitesinin ilerlemesinde rol oynarken, TP53 mutasyonu olan yetişkin glioblastoma hastaları, TP53 mutasyonu olmayanlara göre daha ciddi sonuçlara (örn. daha kısa sağkalım) sahip olabilir (Khasraw ve Lassman, 2007). Ayrıca, TP53 mutasyonlarının, ancak p53 ekspresyonunun değil, hastalığın daha agresif bir formu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çalışmalar ayrıca TP53 mutasyonlu glioblastomun erkeklere kıyasla kadınlarda daha sık görüldüğünü ve daha genç hastalarda ortaya çıkabildiğini bildirmiştir (Zawlik vd., 2009). Buna ek olarak, bazı çalışmalar TP53 mutasyonlarının her yaş grubundaki hastalarda ortaya çıkabileceğini, EGFR amplifikasyonunun ise tercihen yaşlı hastalarda meydana geldiğini göstermektedir. Dolayısıyla, hastalığın başlangıcında birden fazla gen rol oynamakta ve glioblastomun ilerlemesinde farklı yaş ve cinsiyet gruplarında değişkenlik meydana gelmektedir. Sekonder glioblastom hastalarının medyan sağkalım süresi 7,8 ay olarak bildirilmiştir ve bu süre primer glioblastom hastalarınınkinden (4,7 ay) önemli ölçüde daha uzundur. Bununla birlikte, yaş ve hastalık ilerlemesinin dikkatli bir şekilde analiz edilmesinden sonra, primer ve sekonder glioblastomlu hastalarda sağkalım açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Glioblastomun ilerlemesi sırasında, hastalık şiddetini ve hasta sağkalımını değiştirebilecek ek mutasyonlar ve genetik değişiklikler birikir.

Tablo 2. 1. Glioblastomda bildirilen gen değişikliklerine ve mutasyon sıklığına genel bakış (Ohgaki ve Kleihues, 2007; Huang vd., 2007; Nagarajan ve Costello, 2009)

Genler	Değişiklikler	(%)
LOH 10q	Kayıp	50–70
EGFR	Amplifikasyon	40–60
P16ink4a	Delesyon	31
TP53	Mutasyon	50–60
PTEN	Mutasyon	60
MDM2	Polimorfizm	40–60
MGMT	Hipermetilasyon	50–60
IDH1	Mutasyon	40–50
CDK4	Mutasyon	20–30
PDGFRA	Amplifikasyon	20–30

Primer ve sekonder glioblastomlar, promoter metilasyon paternlerine ve RNA ve protein seviyelerindeki ekspresyon profillerine bağlı olarak da önemli ölçüde farklılık gösterebilir. Hem primer hem de sekonder glioblastomlarda en sık Kromozom 10q üzerinde heterozigosite kaybı LOH gösterilmiştir (Ohgaki ve Kleihues, 2007; Huang vd., 2007; Nagarajan ve Costello, 2009). Çalışmalar, TP53 mutasyonlarının yolakta erken tespit edildiğini ve sık genetik değişikliklerin sekonder glioblastoma yol açabileceğini göstermektedir (Huang vd., 2007; Comincini vd., 2009; Santosh vd., 2010). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada primer glioblastomlu 77 Japon hasta analiz edilmiş ve bu hastalarda %22 TP53 mutasyonu, %21 PTEN mutasyonu, %32 EGFR amplifikasyonu, %42 p16INK4a homozigot delesyonu ve %69 kromozom 10q üzerinde LOH bulunmuştur (Fukushima vd., 2006). Bu genetik değişikliklerin popülasyon düzeyindeki sıklıkları Avrupa'da bildirilenlere benzerdir. Bu çalışma, Avrupa ülkelerine kıyasla Japonya'daki glioblastoma hastalarında EGFR amplifikasyonu ile p16INK4a delesyonu arasında pozitif bir ilişki ve TP53mutasyonları ile p16INK4a delesyonu arasında ters bir ilişki olduğunu kaydetmiştir. INK4A tarafından başlatılan hücre döngüsü durdurma yollarının rolü belirlenmiştir. Bu bağlamda, p16INK4A ve p14ARF, retinoblastoma (RB) ve p53'ün aktivitesini kontrol ederek RB'nin G1 fazında hücre döngüsünü durdurmasına yardımcı olur. Ayrıca, E2F transkripsiyon faktör ailesi hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve DNA replikasyonunun kontrol edilmesinde kritik rol oynayan bir protein grubudur. E2F faktörleri, üzerlerindeki etkileri aracılığıyla hücre döngüsünün S fazına geçişini düzenler. Bunun yanı sıra, p53'ün G1 ve G2 fazlarında

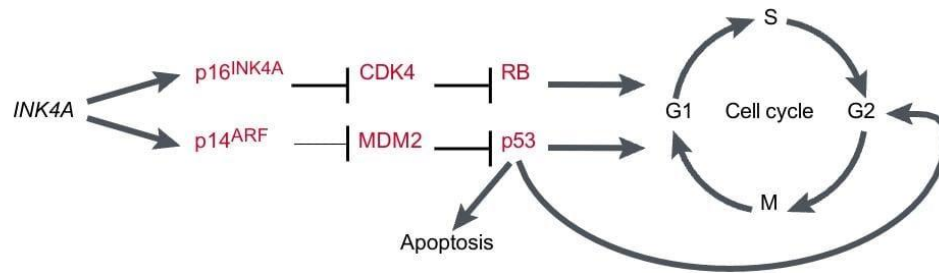
hücre döngüsünü durdurmaya neden olabileceği ve bu sürecin apoptoza yol açabileceği de ortaya konmuştur.

Şekil 2.3'te INK4A geninden kaynaklanan iki farklı yol gösterilmektedir:

1. p16INK4A Yolu: p16INK4A, CDK4 (Siklin-bağımlı kinaz 4) ile etkileşerek onun aktivitesini engeller. Bu engelleme, RB (Retinoblastoma protein) üzerindeki fosforilasyonu durdurur. RB'nin aktif (fosforile olmamış) hali, hücre döngüsünü G1 fazında durdurur ve hücre bölünmesini engeller.

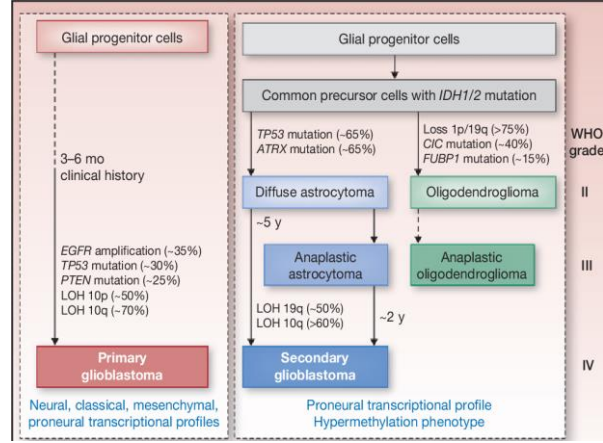
2. p14ARF Yolu: p14ARF, MDM2 proteinini inhibe eder. MDM2'nin inhibisyonu, p53'ün stabilitesini ve aktivitesini artırır. Aktifleşen p53, hücre döngüsünü durdurarak apoptozu (programlı hücre ölümü) başlatır.

Bu mekanizmalar, hücrelerin kontrolsüz bölünmesini engellemek ve kanser gibi hastalıkların önlenmesi için kritik öneme sahiptir. INK4A genindeki mutasyonlar ya da bu yolların bozulması, tümör gelişimine yol açabilir.



Şekil 2. 3. INK4A tarafından başlatılan hücre döngüsü durdurma yolları (Holland, 2001)

Japonya'daki glioblastomda kodon 787 CAG/CAA (Gln/Gln) polimorfizmlerinin alel frekansları Avrupa'dakilerden önemli ölçüde farklı. Sonuç olarak bu çalışma, farklı genetik geçmişlere ve EGFR genindeki polimorfizmlere rağmen Kafkasyalılar ve Asyalılardaki genetik değişikliklerde benzer bir moleküler temel gözlemlemiştir. Glioblastomdaki bu genetik değişiklikler, çeşitli antitümör terapötiklerin geliştirilmesi için yeni potansiyel hedefler de sunabilir. Birincil ve ikincil glioblastomalara yol açan genetik yollara ilişkin mevcut konsept Şekil 2.4'te özetlenmiştir.



Şekil 2. 4. Birincil/De Novo ve ikincil glioblastomalara giden genetik yollar (Ohgak, 2013).

İnsan glioblastomunun tümörigenezi, p53/MDM2/p14ARF ve EGFR/PTEN/Akt/mTOR gibi önemli moleküler yolların bozulmasıyla (Tablo 2.1) diğer birçok genetik anormallik tarafından yönlendirilebilir (Huang vd., 2007; Comincini vd., 2009; Santosh vd., 2010; Umetani ve Hoon, 2004). TP53/MDM2/p14ARF yolağında, TP53 mutasyonu ikincil glioblastom gelişiminde çok önemli bir rol oynamaktadır. TP53 mutasyonlarının aynı zamanda öncül düşük dereceli diffüz astrositom ve anaplastik astrositomun üçte ikisinde saptanabilen ilk genetik değişiklik olduğuna inanılmaktadır. TP53 mutasyonları primer glioblastomda da görülür, ancak daha düşük sıklıktadır. Çalışmalar, CpG bölgelerinde (sitozin-fosfat-guanin bölgeleri; yani DNA dizisinde sık olarak sitozinin hemen ardından guaninin geldiği yerler); özellikle 248 ve 273 numaralı sıcak nokta kodonlarındanükleotit G/C'den A/T'ye mutasyonların, ikincil glioblastoma giden yolda malign dönüşümle doğrudan ilişkili erken bir olay olduğunu göstermektedir. Primer glioblastomdaki daha az spesifik TP53mutasyon paterni, en azından kısmen, tümör gelişimi sırasında artan genomik instabiliteye bağlı ikincil olayları oluşturabilir. P53/MDM2 yolağı, MDM2 amplifikasyonunun hastalığın kötü prognozunda rol oynadığı glioblastomda da rol oynamaktadır (Zawlik vd., 2009). p53 ve MDM2'deki değişikliklerin anaplastik astrositom veya glioblastomlu hastaların sağkalımı ile ilişkisi de tartışmalıdır.MDM2, nükleolusta yer alan 491 aminoasit kalıntılı bir fosfoproteindir (Sun vd., 1998), Normalde hücre döngüsünde G1 durdurulmasını indükler ve ayrıca tümör baskılayıcı p53 ile birleşir ve onu etkisiz hale getirir(Ahmed vd., 2018), p53'ün transkripsiyonel aktivitesini inhibe eder ve nükleer eksportunu ve bozulmasını stimüle eder (Vogelstein, 2000). Glioblastomların %10'unda TP53 mutasyonu olmaksızın MDM2 amplifikasyonu gösterilmiştir (Reifenberger vd., 1997). Ayrıca, p53

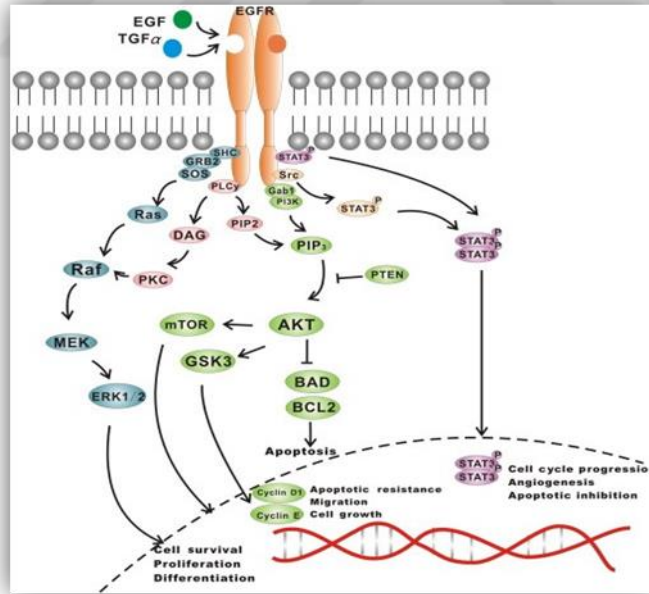
mutantlarının bir alt kümesi, glioblastomda mikroglia veya monosit inflamasyonunu çektiği ve hastalarda daha kısa sağkalım ile korele olduğu bildirilen gain-of-function (GOF) mutantları olarak sınıflandırılabilir (Ham vd., 2019).

p16INK4a/p14ARF/p15INK4b tümör baskılayıcı proteinler lokusunun homozigot delesyonunun glioblastomda en sık görülen genetik değişiklik olduğu düşünülmektedir (Khasraw ve Lassman, 2010). Yakın zamanda yapılan iki çalışma, başka bir INK4 ailesi üyesi olan p18INK4c'nin delesyonu ve mutasyonunun glioblastom patogenezi yönlendirebileceğini göstermiştir. p14ARF geni insanlarda ağırlıklı olarak nükleolusta ve kromozom 9p21 üzerinde bulunur. p14ARF'nin hipermetilasyonu, astrositom progresyonunun biyolojik davranış ve klinik sonuç açısından farklılık gösterebilecek farklı moleküler yolları oluşturabilir. Glioblastomda p14ARF ekspresyon kaybı sıklıkla gözlenmiştir (%76) ve bu tipik olarak p14ARF geninin homozigot delesyonu veya promotor metilasyonu ile ilişkilidir. Primer glioblastoma kıyasla sekonder glioblastomada p14ARF promotor metilasyonunun daha sık olduğu gösterilmiş, ancak glioblastoma alt tipleri arasında p14ARF değişikliklerinin genel sıklığında önemli bir fark gözlenmemiştir. Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2 (CDKN2A) geninin p14/p19ARF ürünü de hem p53/TP53 varlığında hem de yokluğunda tümör baskılayıcı aktivite gösterir. Genetik değişiklikler, p53/MDM2/p14ARF veya Rb/CDK4/p16INK4a tümör baskılayıcı yollarında meydana gelen yüksek dereceli yetişkin astrositomlarında da sıklıkla görülmektedir (Huang vd., 2007; Comincini vd., 2009; Santosh vd., 2010). p16INK4a'nın S fazını inhibe ederek hücre döngüsü ilerlemesinin düzenlenmesine katkıda bulunduğu iyi bilinmektedir. Retinoblastom (RB) geni, tümör baskılayıcı retinoblastoma proteinini (Rb) kodlar ve CDK4/siklin D1 kompleksi RB proteinini fosforile eder (Sherr vd., 1999). Bu fosforilasyon olayları Rb aracılı transkripsiyonel baskıyı bozar ve S fazına ilerlemeyi kolaylaştırır. Cdk4/6'nın aktivitesi, p15INK4b, p16INK4a, p18INK4c ve p19INK4d dahil olmak üzere INK4 ailesi proteinleri tarafından bastırılır. Genel olarak GBM tümörlerinin yaklaşık %78'inde p16INK4a-Cdk4-Rb yolunda defektlere vardır (Gonzalez-Moreno vd., 2010; Serrano, 1997). Glioblastomlarda p16 delesyonu ve RB değişiklikleri sıklıkla birlikte görülür. Bu yoldaki genlerin inaktivasyonu hem primer hem de sekonder glioblastomlarda yaygın olarak görülür ve vakaların yaklaşık %40-50'sini etkiler (Biernat vd., 1997).

Bu yolda, EGFR'yi kodlayan genin amplifikasyonu glioblastomda yaygın olarak görülür ve PI3K, Akt ve mTOR dahil olmak üzere aşağı akım kinazların aktivasyonuna yol açar. Reseptör tirozin kinazların (ErbB'ler) epidermal büyüme faktörü ailesi (EGFR), hücre çoğalmasının, hayatta kalmasının, farklılaşmasının ve göçünün düzenlenmesinde önemli roller oynar (Bertotti vd., 2009). ERBB1 ve HER1 olarak da bilinen EGFR, bir transmembran tirozin kinaz reseptörüdür (RTK) ve hücre sinyal yollarının önemli bir bileşenidir. Ligandlarla (EGF ve TGF- α) bağlanma, EGFR'de konformasyonel değişikliklere ve diğer HER ailesi üyeleriyle homodimerizasyon veya heterodimerizasyona yol açar. Daha sonra sitoplazmik tirozin kinaz (TK) alanının, aşağı yönde sinyalleşmeyi tetikleyen adaptör proteinlerin (örn., SHC ve GRB-2) yardımıyla otofosforilasyonu gerçekleşir. Temel yollar şunlardır: (1) RAS/RAF/MEK, (2) PI3K/AKT ve (3) JAK/STAT yolları mitozu uyarır, hücre proliferasyonuna ve apoptozun inhibisyonuna yol açar ve bu yollar normal hücre büyümesinde çok önemlidir (Şekil 2.7) (Ciardiello vd., 2008). EGFR amplifikasyonu primer glioblastomun yaklaşık %40'ında ortaya çıkabilirken, sekonder glioblastomda nadiren tespit edilir. EGFR'nin aşırı ekspresyonunun da sekonder glioblastoma (yaklaşık %10) kıyasla primer glioblastomanın yaklaşık %60'ında yaygın olduğu düşünülmektedir. Bazı çalışmalarda genç glioblastom hastalarında EGFR amplifikasyonunun çok az olduğu ya da hiç olmadığı bildirilmiştir; bu da pediatrik glioblastomda EGFR amplifikasyonunun olmadığını ya da çok nadir olduğunu düşündürmektedir. EGFR amplifikasyonu ayrıca mouse double minute 2 homolog (MDM2) ve cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) amplifikasyonları ve INK4a promoter metilasyonu olan vakaların daha yüksek bir yüzdesi ile ilişkilidir (Umetani ve Hoon, 2004; Palanichamy vd., 2007; Wiedemeyer, 2010). EGFR amplifikasyonu bağımsız olarak veya TP53 mutasyonu ile eş zamanlı olarak ortaya çıkabilir ancak hasta sağkalımı ile korelasyon göstermeyebilir. Primer glioblastomdaki genetik profillerin ve moleküler alt tiplerin anlaşılması, glioblastoma karşı hedefe yönelik ilaçların geliştirilmesine katkıda bulunabilir. Çalışmalar ayrıca EGFR amplikonlarının sıklıkla mutasyona uğradığını göstermektedir; Ekzon 2 ile 7'nin delesyonu ile EGFR varyant 3 (EGFRvIII) glioblastomda en sık görülen tiptir (Huang vd., 2007; Comincini vd., 2009; Santosh vd., 2010). Konstitütif olarak aktif EGFRvIII, PI3K/Akt yolağının aktivasyonu yoluyla p27'nin aşağı regülasyonu ile kısmen hücre proliferasyonunu artırabilir. EGFR ayrıca EGF/transforme edici büyüme faktörü beta'nın (TGF- β) hücre dışı alanına bağlanmasıyla aktive olur ve PI3K'nın hücre

membranına alınmasına neden olur (Huang vd., 2007; Comincini vd., 2009; Santosh vd., 2010).

PI3K, Akt ve mTOR gibi aşağı akış efektör moleküllerini aktive eden PIP3'ü fosforile eder. Bu olaylar hücre proliferasyonuna ve apoptozu bloke ederek tümör hücresi sağkalımının artmasına neden olabilir. Glioblastoma tümörleri sıklıkla EGFR aktivasyonu ve PTEN tümör baskılayıcı kaybı gösterir (Huang vd., 2007; Comincini vd., 2009; Santosh vd., 2010). Ancak bu iki genetik faktörün beyin astroglial hücrelerini dönüştürmek için birlikte hareket edip etmediği açık değildir. Spesifik inhibitörlerin tasarlanmasındaki engellerden biri, glioblastoma hücrelerinin sıklıkla 10q23.3 üzerindeki PTEN (fosfataz ve tensin homolog) tümör baskılayıcı geninde mutasyonlar taşımasıdır. PTEN geninin glioblastoma tümörlerinin %20-40'ında mutasyona uğradığı gösterilmiştir. PTEN'in tümör baskılayıcı özellikleri, PI3K'ya bağlı Akt sinyal aktivasyonu üzerindeki inhibitör etkisiyle de yakından ilişkilidir. Glioblastoma hastalarında bu yolağın aktivasyonu ile ilişkili moleküler olayların incelenmesi, PI3K yolağını bloke edecek inhibitörlerin geliştirilmesine yardımcı olabilir.



Şekil 2. 7. EGFR'nin hücre içi sinyal ileti yolağı (Ciardiello vd., 2008).

Sitoplazmik tirozin kinaz alanının otofosforilasyonu gerçekleşerek ve adaptör proteinlerin (örn., SHC ve GRB-2) yardımıyla aşağı yönde sinyalleme tetiklenir. Başlıca yollar şunları içerir: (1) RAS/RAF/MEK, (2) PI3K/AKT ve (3) JAK/STAT yolları.

p16INK4a, p14ARF, RB1, TIMP -3 ve MGMT genlerinin promoter metilasyonu da hem primer hem de sekonder glioblastomlarda analiz edilmiştir ve sekonder glioblastom

primer glioblastomdan daha yüksek bir promoter metilasyon sıklığı göstermiştir (2,6 - 9). MGMT, DNA'daki guaninin O6-pozisyonundan promutajenik alkil gruplarını spesifik olarak kaldıran bir onarım proteindir. MGMT hücreleri alkilleyici ajanların indüklediği malignitelere karşı korur ve aktivitesi ile kemirgenlerde alkilleyici ajanların indüklediği dokuya özgü tümörigenez arasında ters bir korelasyon olduğu bildirilmiştir. O6-alkilguanin eklentilerinin tümör hücreleri tarafından onarılması, alkilleyici kemoterapötik ajanların sitotoksitesini azalttığı için ilaç direncine dahil edilmiştir. Promotör CpG adalarının metilasyonunun neden olduğu MGMT ekspresyon kaybı, sekonder glioblastomun %75'inde, primer glioblastomdan (%36) önemli ölçüde daha sık tespit edilmiştir. Primer ve sekonder glioblastom arasındaki MGMT metilasyon sıklığı farkı klinik olarak önemlidir, metillenmiş MGMT promotörü içeren glioblastomlu hastaların adjuvan temozolomid tedavisinden önemli ölçüde daha fazla fayda sağladığı gösterilmiştir.

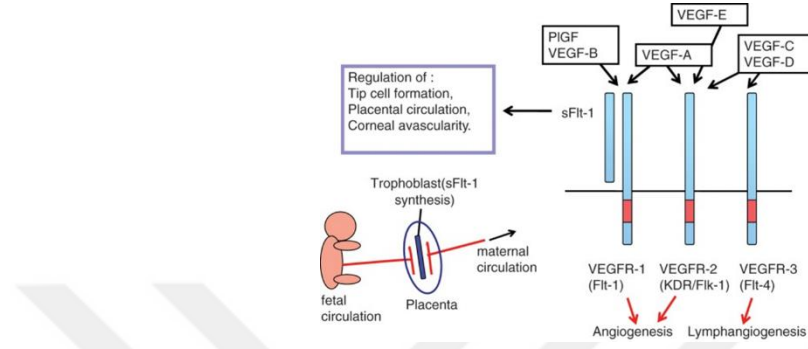
Çalışmalar, primer ve sekonder glioblastomlarda önemli ölçüde daha yüksek düzeyde ifade edilen çoklu genlerin VEGF, fms-ilişkili tirozin kinaz 1(sFlt-1) ve IGFBP2'yi içerdiğini göstermektedir (Santosh vd., 2010). VEGF'ler için birçok indükleyici vardır. Örneğin; sitokinler (özellikle IL-8), hormonlar, hipoksiye bağlı faktörler (HIFler), fonksiyonel p53 kaybı ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) aşırı ekspresyonu (Banerjee vd., 2007). VEGF ve IL8'in glioma hücrelerinde direkt olarak korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Mavrou vd.,2016).

VEGF, özellikle vasküler endotel üzerinde anjiyojenik, mitojenik ve vasküler geçirgenliği artırıcı etkileriyle bilinen 45 kDa ağırlığında çok işlevli bir glikoproteindir. VEGF, tümör gelişiminde endotel hücre çoğalmasını ve hayatta kalmayı teşvik ederek, neovaskülarizasyonu uyararak, intratümöral basıncı artırarak ve konağın bağışıklık tepkisini baskılayarak çok önemli bir rol oynar (Tobelem, 2007). VEGF endotel hücrelerini aktive ederek anjiyogenezi tetikler, bu da malign hücrelere oksijen ve besin tedarikini artırarak büyümelerini ve hayatta kalmalarını destekler (Grimm vd., 2009; Hanahan vd., 1996). Anormal VEGF işlevi, ateroskleroz ve hipertiroidizm gibi enflamatuar hastalıklarla da bağlantılıdır.

VEGF-VEGFR sistemi tanımı:

Kanserde anti-anjiyojenik tedavi, önemli bir hedef olarak kabul edilmektedir. VEGF ailesi, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plasenta büyüme faktörü

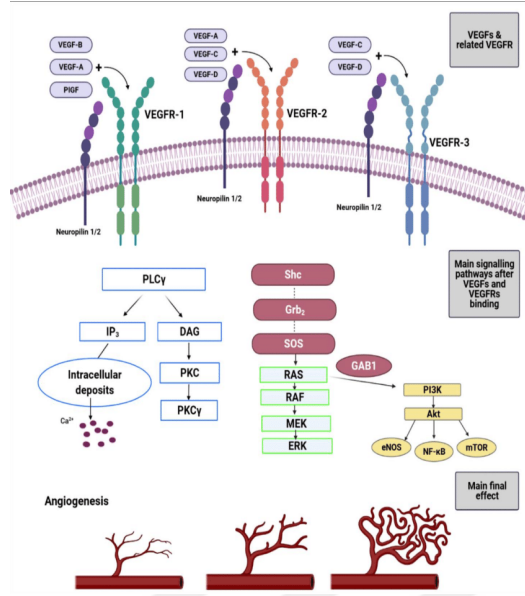
(PlGF) olmak üzere beş izoformdan oluşur. Bunlar arasında en önemli faktör olarak kabul edilen VEGF-A, genellikle sadece "VEGF" olarak adlandırılmakta ve reseptörleri VEGFR-1 ve VEGFR-2, tümör anjiyogenezi de dahil olmak üzere hem fizyolojik hem de patolojik anjiyogeneizde kritik roller üstlenmektedir (Ellis vd., 2008; Olsson vd., 2006).



Şekil 2. 8. VEGF sistemi ve reseptörleri (Ellis vd., 2008; Olsson vd., 2006)

VEGFR-1 ve VEGF-2, anjiyogenin yanı sıra vaskülogenezde de önemli bir rol oynar. Ayrıca VEGFR-1'in çözünür bir formu olan sFlt-1, trofoblastlar gibi çeşitli hücrelerde eksprese edilir ve anjiyogeniteyi olumsuz yönde düzenler

VEGF, 8 korunmuş sistein ile karakterize edilen ve bir homodimer yapısı olarak işlev gören PDGF süpergen ailesine aittir. VEGF-A, VEGFR-1 (Flt-1) ve VEGFR-2 (KDR/Flk1) olmak üzere 2 reseptörü aktive ederek anjiyogenezi ve vasküler geçirgenliği düzenler. Öte yandan, VEGF-C/VEGF-D ve onların reseptörü VEGFR-3 (Flt-4) esas olarak lenfanjiyogenezi düzenler. VEGF-VEGFR sistemi kanserde anti-anjiyogenik tedavi için önemli bir hedeftir ve ayrıca nöronal dejenerasyon ve iskemik hastalıkların tedavisinde pro-anjiyogenik tedavi için çekici bir sistemdir.(Ferrara N vd., 2003).



Şekil 2. 9. VEGF'ler ve ilgili VEGFR'ler, ilişkili ana sinyal yolları (Ferrara vd., 2003)

Anjiyojenez, yani kan damarı yapılarının oluşumu ve bakımı, dokuların fizyolojik fonksiyonları için elzemdir ve kanser ve iltihaplanma gibi hastalıkların ilerlemesi için önemlidir (RisauW. 1997; Hanahan D vd.,1996). Son yıllarda, VEGF-VEGFR'ler, ephrin-Eph reseptörleri, anjiyopoietin-Tie ve Delta-Notch sistemi gibi çeşitli sinyal moleküllerinin anjiyojenezde önemli roller oynadığı tanımlanmıştır. Bunlar arasında, vasküler endotelial büyüme faktörleri (VEGF'ler) ve reseptörler (VEGFR'ler) hem vaskülojenezi, erken embriyogenez sırasında öncü hücrelerden kan damarlarının gelişimini ve daha sonraki bir aşamada önceden var olan damarlardan kan damarlarının oluşumu olan anjiyojenezi düzenler. VEGF-A ve reseptörleri VEGFR-1 ve VEGFR-2, tümör anjiyojenezi dahil olmak üzere fizyolojik ve patolojik anjiyojenezde önemli roller oynar. VEGFR-1, hücre dışı bölgede yedi immünoglobulin (Ig) benzeri alana ve bir tirozin kinaz alanı içeren hücre içi bölgeye sahip tipik bir tirozin kinaz reseptörüdür. Esas olarak inflamasyon oluşumunun ilk adımlarında görev alır ve başlıca vasküler endotel hücreleri tarafından ifade edilir (Shibuya, 2006; Markovic-Mueller vd., 2017).

VEGFR-1'in tirozin kinaz aktivitesi VEGFR-2'ye göre daha sınırlıdır, ancak VEGF-A VEGFR-1'e VEGFR-2'den daha yüksek bir afinite ile bağlanır (Fischer, vd., 2008; Waltenberger vd., 1994). Ayrıca, hücre hatlarında hem VEGFR-1 hem de VEGFR-2'nin ifade edilmesinin, yalnızca VEGFR-1'in ifadesine kıyasla fosfolipaz Cγ [PLCγ] sinyal yolu aktivasyonunu önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir (Huang vd., 2001). Ayrıca VEGFR-1, VEGFR-2 ile heterodimerizasyon potansiyeline sahiptir. VEGFR-1 ve

VEGFR-2 heterodimerizasyonu VEGF/PGF gibi diğer ligand dimerleri tarafından uyarılabilir ve bu da VEGF aracılı neovaskülarizasyonu artırabilir (Autiero, M.vd.,2003). VEGFR-2 neredeyse sadece endotel üzerinde bulunan hücrelerin endotel hücre göçünü, büyümesini, farklılaşmasını, hücre sağkalımını, damar genişlemesini ve geçirgenliğini düzenlediği için tümör anjiyogenez gelişiminde ana reseptördür. Çalışmalar VEGFR-2 aktivitesine fosfolipaz C γ (PLC γ) ve protein kinaz C (PKC) sinyal yollarının aracılık ettiğini ortaya koymuştur (Zhong vd., 2007; Lampugnani vd., 2006). VEGFR-2 içinde maksimum reseptör kinaz aktivitesi için gerekli olan Tyr1054 ve Tyr1059 tirozin kalıntıları ile en az dört oto-fosforilasyon alanının bulunduğu belirlenmiştir (Bruce vd., 2011). Ayrıca, Takahashi ve arkadaşları Tyr1175'in PLC γ /PKC/MAPK yolağının aktive edilmesinde önemli bir role sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Bu sinyal yolu endotel hücrelerinin proliferasyonunda hayati bir rol oynar (Takahashi vd.,2001). Holmqvist ve arkadaşları, daptör protein Shb'nin VEGFR-2 (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü-2) ile etkileşim kurduğunu ve bu bağlanmanın, VEGF (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü) aracılı PI3K (Fosfatidilinositol 3-kinaz) aktivitesi için kritik olduğunu ortaya koymuştur (Holmqvist vd., 2004). Bu bulgular, Shb-VEGFR-2 etkileşiminin, VEGF'nin anjiyogenez (yeni kan damarlarının oluşumu) ve hücre hareketlilik üzerindeki etkilerinde kilit bir rol oynadığını göstermektedir. Vasküler endotelyal büyüme faktörü A, her ikisi de esas olarak vasküler endotelyal hücre reseptörü-2 aracılığıyla işlev gören pro- ve anti-anjiyogenik ailelerde gruplandırılmış çoklu izoformlar olarak oluşturulan anjiyogenezin ana düzenleyicisidir (Harper vd., 2008). Vasküler endotelyal büyüme faktörü A üretiminin, iyi huylu nevüslerde düşük olduğu ve displastik nevüsten melanomaya aşamalı olarak arttığı bildirilmiştir (Einspahr vd., 2007). Vasküler endotelyal büyüme faktörü A üretiminin, iyi huylu nevüslerde düşük olduğu ve displastik nevüsten melanomaya aşamalı olarak arttığı bildirilmiştir(Einspahr vd., 2007). İyi huylu nevüsleri, primer ve metastatik melanomaları içeren yakın tarihli bir doku mikroyarray çalışmasında, VEGFA, VEGFR-1 ve -2'nin malign tümörlerde yukarı regüle olduğu bulunurken, metastazlarda VEGFR-2 pozitifliğinin primer tümörlere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (Mehnert vd., 2010) ve VEGFR-2, akciğer kanseri, pankreas kanseri ve meme kanseri dahil olmak üzere birçok tümörde metastaz ve invazyon ile ilişkili olan VEGF ile etkileşime giren reseptörlerden biridir (Mercurio vd., 2005; Chen vd., 2009; Yang vd., 2006).

Öte yandan, anti-anjiyogenik VEGFA165b, metastatik melanomlarda aşağı regüle edilir ve metastatik yayılmalarını tahmin ediyor gibi görünmektedir (Pritchard-Jones vd., 2007). VEGF-C/D ve onların reseptörü VEGFR-3 homodimer veya heterodimer yapma potansiyeline sahiptir, erken embriyogenezde anjiyogenezi düzenleyebilir, ancak çoğunlukla lenfanjiyogeninin kritik düzenleyicileri olarak işlev görür (Ferrara vd., 2003; Alitalo vd., 2002). VEGFR-3'ün tümör büyümesi, hayatta kalması ve göçündeki rolü için p42/p44 MAPK sinyal kaskadının protein kinaz C'ye bağlı aktivasyonu yoluyla hareket ettiği belirtilmektedir (Mäkinen vd., 2001). Ayrıca, PKC, PI3K ve PLC γ içinde diğer birçok yolak VEGFR-3 ekseninden etkilenmektedir (Olsson, 2006). VEGFR-3, diğer VEGFR üyeleri gibi, akciğer (Donnem, 2010), meme (Valtola, vd., 1999), servikal (Van Trappen vd., 2003), prostat (Jennbacken vd., 2005) ve kolorektal (Zhu vd., 2016) kanserler gibi çeşitli tümör hücre hatlarında patolojik olarak ifade edilmektedir.

VEGF-A, pro-anjiyogenik aktivite, vasküler geçirgenlik aktivitesi ve makrofaj soyunda ve endotel hücrelerinde hücre göçünün uyarılması dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Son zamanlarda, bir anti-VEGF-A nötralize edici antikor ve multikinaz inhibitörleri gibi anti-VEGF-VEGFR ilaçları geliştirilmiş ve büyük katı tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Hurwitz vd., 2004; Sandler vd., 2006) Bu ilaçların klinik etkinliği iyi değerlendirilmiştir; ancak hiçbirisi kanser hastası için tam bir tedavi sağlamamaktadır. Bazı tümörlerdeki inatçılığın moleküler temeli ve bu ilaçlara direncin kazanılması, daha etkili anti-anjiyogenik tedaviler geliştirmek için kapsamlı bir şekilde araştırılmalıdır. Öte yandan VEGF'ler, çeşitli dokuların fizyolojik seviyelerde korunması ve iskemik hastalıkların üstesinden gelmek için yeni kan damarlarının oluşumu için pro-anjiyogenik potansiyele sahiptir. VEGF ailesi üyelerinin pro-anjiyogenik tıpta kullanımı, olası yan etkilerle birlikte klinik uygulamalar için daha ayrıntılı olarak karakterize edilmelidir.

VEGFR'ler, ligand bağlanması için bir hücre dışı alan, bir transmembran alan ve bir tirozin kinaz alanı da içeren sitoplazmik Alan taşıyan tipik tirozin kinaz reseptörleridir (TKR'ler) (Shibuya vd., 1995). VEGF'lerin bu reseptörlere bağlanmasından hemen sonra meydana gelen ana olaylar reseptör dimerizasyonu, kinaz aktivasyonu ve otofosforilasyondur (Clauss, 2000; Mac Gabhann, 1926).

Tablo 2. 2. *Vasküler endotelial büyüme faktör reseptörleri (Shibuya vd., 1995; Donnem, 2010)*

Reseptör	Etki
VEGFR-1	Gelişimsel (embriyojenik) anjiogenezi uyarır
VEGFR-2	Proliferasyon, migrasyon ,sağkalım ve anjiogenez
VEGFR-3	Lenfanjiogenezi başlatır

VEGFR-1: *Vasküler Endotelial Büyüme Faktör Reseptörü-1*; VEGFR-2: *Vasküler Endotelial Growth Faktör Reseptörü-2*; VEGFR-3: *Vasküler Endotelial Growth Faktör Reseptörü-3*.

EGFR, MDM2 ve MMP-9'un aktif formları primer glioblastomda sekonder glioblastomdan daha sık eksprese edilir (Comincini vd., 2009; Santosh vd., 2010). Aktif MMP-9 ekspresyonu, primer glioblastom için de tipik olan EGFRvIII ekspresyonu ile güçlü bir korelasyon gösterir. Bir apoptoz inhibitörü olan Survivin de primer glioblastomların %83'ünde sıklıkla eksprese edilirken sekonder glioblastomların %46'sında eksprese edilmektedir (Mellai vd., 2008). Achaete-scute homolog 1 (ASCL1) grade II diffüz astrositomların %86'sında ve sekonder glioblastomların %88'inde aşırı eksprese edilirken, primer glioblastomların %67'sinde normal beyin seviyelerine benzer veya daha az eksprese edilmiştir. ASCL1 upregülasyonuna, Notch1'in transkripsiyonel bir hedefi olan Hes1'in indüklenmemiş seviyeleri ve ASCL1'in Hes1 aracılı baskılanmasının dominant-negatif bir inhibitörü olan Hes6'nın artan seviyeleri ile görüldüğü gibi Notch sinyalinin inhibisyonu eşlik etmiştir (Fan vd., 2010). Yeni bir proteomik yaklaşım, glioblastoma alt tipleri arasında farklı şekilde ifade edilen ek proteinler tanımlamıştır. Glioblastomlu hastaların prognozu en azından kısmen yaş ve farklı genetik değişiklikler arasındaki karmaşık bir etkileşimle belirlenebilir. IGFBP2'nin aşırı ekspresyonu yakın zamanda ileri evre glioblastomda en sık görülen değişiklik olarak bulunmuştur (Santosh vd., 2010). IGFBP2, artmış hücre proliferasyonu ve invazyonu gibi ileri evre tümörlerin fenotiplerinin belirlenmesinde çok önemlidir. IDH1 enzimi, sitozol ve peroksizomlarda, IDH2 enzimi ise mitokondride bulunur. Her iki enzim de izositratın a-ketoglutarata oksidatif dekarboksilasyonunu ve karbondioksit (CO₂) üretimini katalizler. Metabolizma sürecinde bu enzimler, birçok dokuda yüksek yoğunlukta bulunur ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH+H) kaynağı olarak görev yapar. Ayrıca glukoz, yağ asidi ve glutamin metabolizmalarında da önemli roller üstlenir. NADPH+H molekülü, hücresel biyosentez reaksiyonları ve indirgeyici ekivalan molekül olarak kullanımı sayesinde, hücrenin antioksidan savunmalarında büyük rol oynar.

Ancak IDH enzimindeki mutasyonlar, enzimin neomorfik aktiviteye sahip olmasına yol açarak, normalde α -ketoglutaratın (α -KG) ürün olarak üretilmesi yerine, onu substrat olarak kullanmasına ve NADPH+H üretiminin aksine tüketilmesine neden olur. Bu değişim, hücresel düzeyde birçok biyokimyasal yolu etkiler ve kanser gelişimine yol açabilir. Başta gliomalar olmak üzere, lösemi, lenfoma, kolanjiokarsinom, kondrosarkom ve pankreas tümörlerinde de IDH mutasyonlarına rastlanmıştır (Reitman ve Yan, 2010). Özellikle IDH1 mutasyonları, genç glioblastom hastalarında daha sık görülmektedir (Bleeker vd., 2010). IDH1 mutasyonlarının tanımlanması, ikincil glioblastomun bir biyomarkeri olarak klinik açıdan önemli bir değer taşır. Son çalışmalar, mitokondriyal IDH2 inhibisyonunun bazı kemoterapötik ajanlara karşı tümör duyarlılığını artırdığını göstermiştir. Bu bulgular, glioblastom tümörleri için yeni gen tabanlı tanı, prognostik ve terapötik stratejilerin geliştirilmesine yönelik güçlü bir temel sunmaktadır.

2.2.6. Glioblastoma ve tümör mikroçevresi

Glioblastoma (GBM) tümör mikroçevresi (TME), yalnızca kanser hücrelerini değil, aynı zamanda yerleşik beyin hücreleri, bağışıklık hücreleri ve ilik kaynaklı bağışıklık hücreleri gibi geçici olarak tümörle etkileşime giren hücreleri içeren son derece karmaşık ve heterojen bir yapıya sahiptir. Bu mikroçevre, hücreler arası temas, hücresel metabolik ürünler, pH ve oksijen seviyeleri gibi kimyasal faktörlerdeki değişikliklerden etkilenir ve dinamik bir yapı sergiler (Sharma P vd., 2023). TMC, hem hücresel hem de hücresel olmayan bileşenlerden oluşan heterojen bir yapıya sahiptir ve tümörün ilerlemesi için kritik bir ortam sağlar. TMC kanser hücrelerinin sürekli büyümesini destekleyen büyüme faktörleri ve sinyaller üretir, apoptoz (programlanmış hücre ölümü) gibi doğal ölüm süreçlerinden korur, yeni kan damarlarının oluşumu, tümörlere oksijen ve besin sağlama, büyüme ve metastazı teşvik etme, TMC, bağışıklık sisteminin kanser hücrelerini tanımasını ve yok etmesini engelleyen mekanizmaları destekleme, düşük oksijen seviyeleri (hipoksi) ve kronik inflamasyon, tümör progresyonunu hızlandırma, immünoterapilerin etkinliğini azaltma ve tümörlerin ilaç direnci geliştirmesine neden olmaktadır (Baş Topcu, 2022).

Tümör mikroçevresi (TME), kanserin ilerlemesinde ve tedaviye direnç geliştirmesinde merkezi bir role sahiptir (Prager BC vd., 2020). TME, hem hücresel ; endotel Hücreleri,

nöronlar astrositler, oligodendrositler, mikrogliya, yerleşik immün hücreler, tümörle ilişkili makrofajlar gibi hem de hücre dışı bileşenlerden oluşan dinamik bir sistemdir ve bu bileşenlerin her biri, kanser hücrelerinin hayatta kalmasını, büyümesini ve yayılmasını desteklemek için farklı işlevlere sahiptir(Sharma P vd., 2023).

TMÇ'nin hücresel bileşenleri

Tümör Mikroçevresi (TMÇ), tümörün büyümesi, ilerlemesi, invazyonu ve metastazını destekleyen karmaşık bir yapıdır. TMÇ'nin hücresel bileşenleri endotel hücreleri, nöronlar ve glial hücreler, tümör ilişkili makrofaj(TAM) ve T lenfositler , (CD8+, CD4+, Treg) B lenfosit ve doğal öldürücü (NK) hücreler gibi, myeloid türevli baskılayıcı hücreler, dendritik hücreler (DC), tümör bağlantılı nötrofiller, mast hücreleri), glioma kök hücreleri, kanserle ilişkili fibroblastlar, endotel hücreler, perisitler, adipositler, lenfotik endotelyal hücreler, ekstraselüler matriks ve ekstraselüler veziküllerden (eksozomlar, ektozomlar, apoptotik cisimcikler ve büyük onkozolar) meydana gelmektedir(Martinez-Lage M vd., 2019).

TMÇ'nin hücresel olmayan bileşenleri

TMÇ'nin hücresel olmayan bileşenleri ile hücresel bileşenler arasındaki etkileşimler, tümör metastazını yönlendiren temel mekanizmalardan biridir ve sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri, hücreler arası iletişimi sağlaması, ve matriks metalloproteazların (MMP) proteolitik enzimlerin üretimini artırarak tümör büyümesini ve anjiyogenezini teşvik etmektedir (Patel vd., 2018). Kanser hücreleri invazyon yapabilmek için fibronektin ve laminin gibi birçok protein içeren bazal membran (BM) ve ECM kollojenini matriks metalloproteinaz (MMP) adı verilen proteolitik enzimler aracılığıyla degregasyona uğratmaktadır. MMP'ler temel olarak matriksin degregasyon sürecinde, hücresel migrasyonu artmasında büyüme faktörlerinin/sitokinlerin düzenlenmesinde, apoptoz ve neovaskülarizasyonda işlev görmektedir (Azevedo vd., 2020).

Hücresel olmayan TME'deki interlökinler, tümör nekroz faktör ailesi, interferonlar ve transforme edici büyüme faktörü β (TGF β) protein ailesi gibi çeşitli görevlere sahip sitokinler büyümeyi destekleyen bir faktör olarak tümör hücrelerine doğrudan etki ederek veya dolaylı olarak inflamatuvar hücre tiplerini uyarak tümör oluşumunu etkileyebilmektedir (Patel H vd., 2018).

Kapsamlı araştırmalar, kanser hücreleri ve tümör infiltr hücrelerinden salınan IL-1, IL-

6 ve IL-8 gibi sitokinlerin, Tümör mikroçevresi (TME)'nin gelişiminde ve tümör hücrelerinin invazyon, proliferasyon ve epitel-mezenkimal geçiş (EMT) süreçlerinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bu sitokinler, TME'nin şekillenmesine ve kanser hücrelerinin daha agresif hale gelmesine yardımcı olabildiğini (Tsai MJ vd., 2014) MMP ekspresyonunu artırmak suretiyle damar oluşumunu ve invazyon süreçlerini artırarak tümör gelişimine katkıda bulunduğunu göstermektedir (Xu vd., 2014).

2.2.7. Tümör ilişkili makrofajlar ve inflamasyon

Cerrahi rezeksiyonla elde edilen glioma dokusu incelendiğinde, kanser hücrelerinden sonra en bol bulunan hücre tipinin tümörle ilişkili makrofajlar (TAM) olduğu bulunmuştur (Ghosh Anirban, 2010; Graeber vd., 2002; Watters vd., 2005). TAM'ler yüksek derecede heterojendir ve sitokinler, kemokinler, biyolojik olarak aktif lipidler ve ekstraselüler matris bileşenlerinden oluşan karmaşık bir ağ aracılığıyla iletişim kurarlar. Bu hücreler, iletişim ve etkileşim yoluyla çevrelerini şekillendirir, çeşitli pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar yanıtları etkiler (Giering vd., 2017).

Glioma mikroçevresinde hücrelerin %30-50'sini oluşturan mikrogliya ve periferik makrofajlar (GAM), tümör üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir. Tümör derecesiyle pozitif, hasta sağkalımıyla ters orantılıdır (Rossi vd., 1987; Hambardzumyan vd., 2015). Bu inflamatuvar hücrelerin tümör mikroçevresindeki varlığı, düzenlenmemiş inflamasyona ve immünosupresif bir etkiye yol açar, bu da kanser ile inflamasyon arasındaki derin bağlantıyı destekler (Colotta vd., 2009).

İnflamasyona karşı fagositik ve sitotoksik özelliklere sahip olan GAM'ler, tümör büyümesini, immün baskılamayı ve anjiyogenezi teşvik eden inflamatuvar moleküller (IL-1, IL-6, TGF- β , Epidermal Growth Factor (EGF), Prostaglandin E2 (PGE2)) üretir (Nakano vd., 2008; Mostofa vd., 2017). İnflamasyon, kanserin güçlü bir tetikleyicisi ve ayırt edici özelliği olarak yaygın olarak tanınmaktadır (Colotta vd., 2009). Gliomada, inflamasyon, dört ana aşamada gerçekleşen karmaşık bir süreçtir. İlk aşama, immün hücrelerin tümör bölgesine çekilmesi ve infiltrasyonunu içerir. İkinci aşama, küçük moleküllerin salınımı ve komşu hücrelerdeki reseptörlerin aktive edilmesiyle, tümör hücreleri ve birçok immün hücre arasında karmaşık bir sinyal iletimine yol açar. Üçüncü aşama, tümör hücrelerinin proliferasyon, transkripsiyonel düzenleme, göç ve farklılaşma gibi yanıtlarını içerir. Dördüncü aşama, immün kaçış, yeni damar oluşumu

ve doku yeniden şekillenışı ile yönlendirilir ve tümör progresyonuna yol açar.

GAM'lerin aktive edilmesi, tümör büyümesini, anjiyojenezi ve immün baskılamayı teşvik eden sitokinler, büyüme faktörleri ve diğer inflamatuvar mediyatörlerin salınımına yol açar (Phillip vd., 2023). Gliomadaki bu etkileri yöneten ana madde, tümör mikroçevresinde aşırı ekspresyon gösteren PGE2 ve onun biyosentetik enzimidir, COX-2 (Qiu vd., 2017; Ching vd., 2020).

2.2.7.1. Siklooksijenaz (COX) ve prostaglandin E2 (PGE2)

Siklooksijenaz 1 ve 2 (COX-1/2), aynı zamanda Prostaglandin G/H Sentaz 1/2 (PTGS1/2) olarak da bilinir, araşidonik asidin (AA) prostaglandin G2'ye (PGG2) ve ardından PGH2'ye dönüşümünde kilit enzimlerdir ve PGH2, Prostaglandin E Sentaz (PGES) etkisiyle beş biyolojik olarak aktif lipid olan prostanoidlerin (PGE2, PGI2, PGD2, PGF2 α ve Trombozankin A2 (TXA2)) öncüsü olarak görev yapar (Qiu vd., 2017; Colquhoun, 2017).

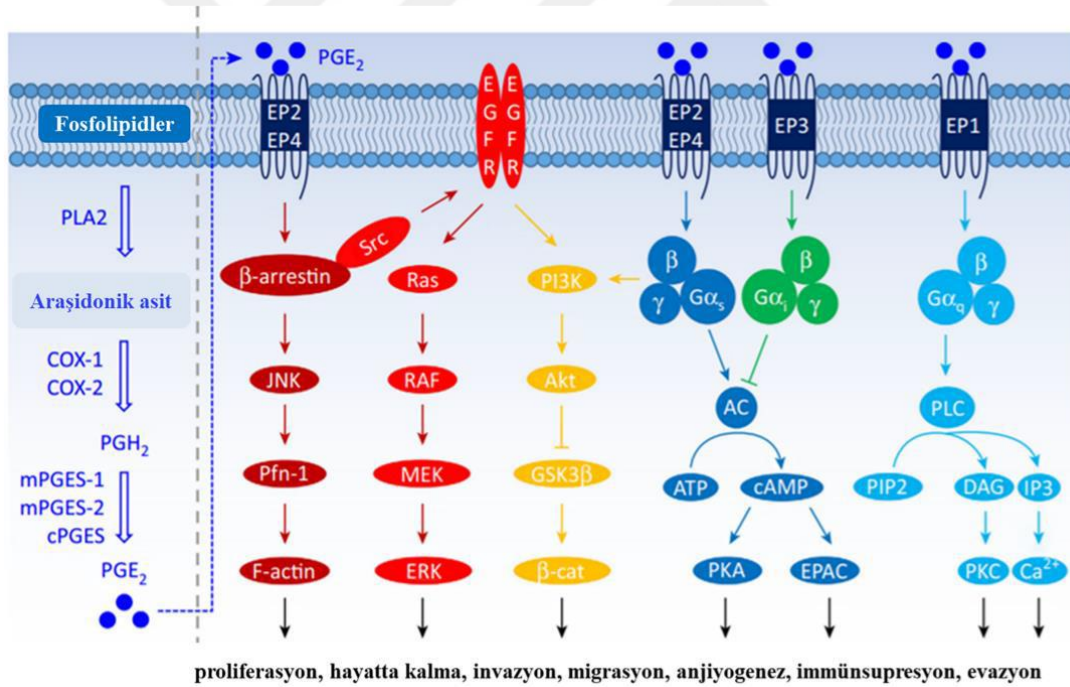
COX-1, çoğu dokuda sürekli olarak ekspresyon gösterirken, COX-2 genellikle normal koşullarda düşük seviyelerde ifade edilir ancak sitokinler, büyüme faktörleri ve çeşitli tümör promotorleri gibi patolojik ve inflamatuvar uyarılarla hızla indüklenir (Qiu vd., 2017; Wang ve Dubois, 2006). COX aktivitesinin indüklenmesi ve COX ürünlerinin aşırı üretimi, ateş, akut ağrı, lokal doku hasarı ve artrit gibi klasik inflamatuvar durumlara katkıda bulunur. Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar (NSAID'ler), bu durumları tedavi etmek için COX enzimlerini hedef alır (Hinz vd., 2002).

COX-2'nin baskın ürünü olan PGE2, meme (Chen ve Smith, 2011), kolorektal (Sheng vd., 2020), akciğer (Harris, 2009) ve merkezi sinir sistemi (CNS) kanserleri (Qiu, 2017) gibi katı tümörlerin progresyonunda önemli bir rol oynar. 66 glioma hastası örneği üzerinde yapılan bir çalışmada, GBM tümör örneklerinin %71'inde %50'den fazla COX-2 pozitif hücre bulunduğu (Shono, 2001), ve bu oran cerrahi rezeksiyon sonrası önemli ölçüde azaldığı (Loh, 2002) bulunmuştur.

PGE2, G-protein ile bağlı EP reseptör ailesinin (EP1-4) üyelerine bağlanarak etkilerini gösterir ve böylece hücre içi sinyal yollarını aktive eder. Gq ile bağlı EP-1 reseptörünün aktive edilmesi, fosfolipaz C aktivasyonunu tetikler, bu da hücre içi Ca²⁺ seviyelerini artırır ve protein kinaz C (PKC) aktivitesini başlatır. Gi ile bağlı EP-3 reseptörü, adenilat siklaz/cAMP sinyallemeini inhibe ederken, Gs ile bağlı EP-2 ve EP-4

reseptörleri, protein kinaz A (PKA) aktivasyonunu mediyatör olarak görev yapar (Şekil 2.10). PGE₂'nin EP2 ve EP4'ü aktive etmesi, β -Arrestin ve proto-onkogen tirozin-protein kinaz (c-Src) aktivasyonuna yol açar, bu da EGFR'yi transaktivite eder ve hücre içi PI3K-AKT, RAS/RAF/MAPK ve JNK sinyal yollarını tetikler. Bu yollar hücre proliferasyonu, göçü ve farklılaşmasını teşvik eder (Chun vd., 2010; Yun vd., 2011; Jiang ve Dingledine, 2013; Oliver vd., 2016).

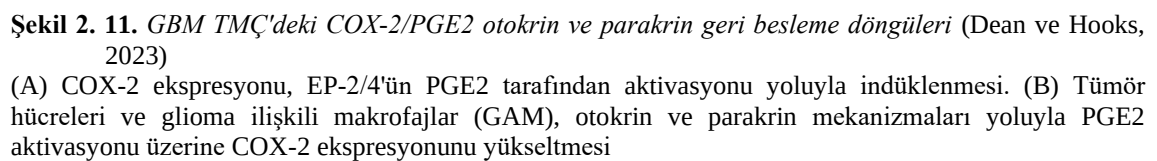
NF- κ B, COX-2'nin ekspresyonunu artırarak glioblastomanın agresifliğine katkıda bulunur, aynı zamanda tümörün invazyonu ve metastazıyla ilişkilidir. Sp1/Sp3 ise COX-2'nin transkripsiyonunu destekleyerek hücre proliferasyonunu ve metastatik potansiyeli artırır (Annabi, 2009; Xu vd., 2007). Birçok moleküler sinyal yolunu aktive ederek, PGE₂, glioblastoma hücrelerinin hayatta kalmasına, proliferasyonuna, göçüne, invazyonuna, anjiyogenezine ve immün baskılamasına katkıda bulunur (Jiang vd., 2017).



Şekil 2. 10. EP Reseptörleri aracılığıyla PGE₂ sinyallemesinin gliomagenездеki rolü (Jiang vd., 2017)

PGE₂'nin COX-2 üretimi ve ekspresyonunun düzenlenmesinde çeşitli geri besleme mekanizmaları bulunmaktadır. PGE₂, EP2 ve EP4 reseptörlerini uyardığında, CREB'in nükleer translokasyonunu tetikler. CREB, daha sonra COX-2 promotörüne bağlanarak COX-2 ekspresyonunu artırır, bu da PGE₂ üretiminin artmasına yol açar (Şekil 2.11A). Bu, makrofajlar, mikroglia ve tümör hücrelerinde autokrin ve parakrin sinyalizasyon

GBM (glioblastoma multiforme) geleneksel tedavilere karşı direnç geliştirdikçe, farklı tedavi hedefleri ve yaklaşımlarının keşfi gerekmektedir. COX-2'nin kanser progresyonundaki çok yönlü ve kritik rolü, bunun GBM tedavisi için potansiyel bir hedef olabileceğini düşündürmektedir. COX-2'nin NSAID'ler tarafından inhibe edilmesi, hastaların hayatta kalma sürelerini uzattığı gösterilen yaygın bir kanser tedavisidir (Esbona vd., 2022).



2.2.8. Glioblastomada apoptozun düzenlenmesi

Apoptoz, ya da programlı hücre ölümü, vücudumuzun dengesini korumaya yardımcı olan hayati bir süreçtir. Artık gereksiz olan ya da hasar görmüş hücreleri yönetmenin vücudun bir yolu gibidir. Apoptoz sırasında hücre zarının bütünlüğü korunur, bu da çevredeki dokuların zararlı inflamasyonla karşılaşmasını engeller. Ancak bazı durumlarda, örneğin kanser gibi, apoptoz süreci düzgün bir şekilde çalışmaz ve bu da kontrolsüz hücre büyümesine yol açabilir.

Apoptozu tetikleyen iki ana yolak vardır (Elledge, 1996):

Dışsal Apoptoz Yolak: Bu yolak, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri—Fas, DR4/5, ve TNFR1 gibi—dışarıdan gelen belirli moleküllerle bağlandığında başlar. Bu, kaspaz adı verilen enzimlerin bir dizi adımıyla aktif hale gelmesini tetikler; önce kaspaz-8/10, ardından kaspaz-6, kaspaz-3 ve kaspaz-7. Bu zincir reaksiyon, hücrenin ölümüne yol açan önemli hücresel yapıların, örneğin DNA'nın parçalanmasına neden olur.

İçsel Apoptoz Yolak (Mitokondriyal Yolak): Bu yolak, DNA hasarı, oksidatif stres ya da büyüme faktörlerinin azalması gibi durumlarla tetiklenir. Bu sinyaller alındığında, Bcl-2 protein ailesinden Bax gibi belirli proteinler şekil değiştirir ve mitokondrinin dış zarına yerleşir. Bu hareket, mitokondrinin geçirgenliğini artırır ve sitokrom c'nin salınımına yol açar. Sitoplazmada sitokrom c, kaspaz-9'u aktive eder, bu da diğer kaspazların aktivasyonunu tetikler ve sonunda hücre küçülmesi ile apoptoz gerçekleşir.

Bu yolaklar arızalandığında veya bozulduğunda, glioblastoma multiforme (GBM) gibi hastalıkların gelişimine katkıda bulunabilirler.

Bax ve Bim Pro-apoptotik Proteinleri: Bax ve Bim, Bcl-2 ailesine ait olan ve apoptozun tetiklenmesinde önemli rol oynayan proteinlerdir. Normalde hücrenin sitoplazmasında bulunan bu proteinler, hücre ölümü sinyalini aldığında mitokondri zarına yerleşirler. Bax, mitokondri zarındaki kanal ve porları açarak sitokrom c ve diğer apoptotik proteinlerin salınımına neden olur. Bu durum, kaspazların aktive olmasına ve dolayısıyla apoptozun gerçekleşmesine yol açar. Bim ise, ölüm reseptörlerinde bir anormallik olduğunda aktif hale gelir ve Bax ile benzer bir şekilde apoptozu tetikler (Igney ve Krammer, 2002).

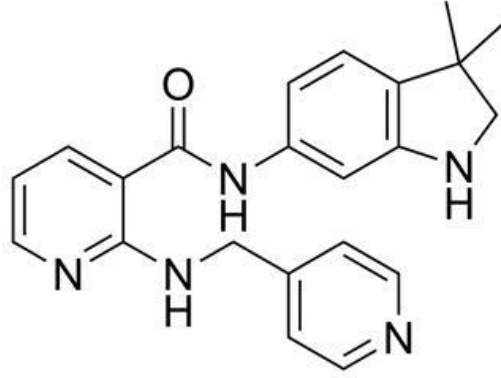
Bax ve Bim'in aktivitesi, p53 transkripsiyon faktörü gibi bir dizi faktör tarafından düzenlenir. p53 normalde Bax ve Bim'in apoptozda etkin bir şekilde rol oynamasını

sağlar. Ayrıca, p53 mitokondri zarının geçirgenliğini artırarak apoptoz sürecini kolaylaştırır (Vousden, 2005).

2.3. Motesanib

2.3.1. Kimyasal yapısı

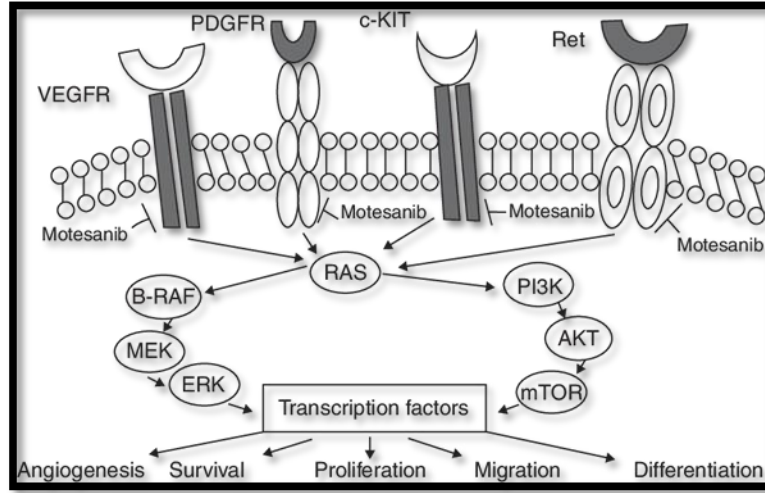
Motesanib (AMG 706), yeni nesil bir nikotinamid türevi ve küçük moleküllü bir tirozin kinaz inhibitörüdür (TKI). Bu bileşik, VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3 gibi tüm vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörlerini, trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörünü (PDGFR) ve kök hücre faktör reseptörü (KIT/CD117) etkili bir şekilde inhibe eder. Kimyasal yapısı ise N-(2,3-dihidro-3,3-dimetil-1H-indol-6-il)-2-[(4-



piridinilmetil)amino]-3-piridinkarboksamid olarak tanımlanmıştır (Raghav vd., 2011).

Şekil 2. 12. Motesanib'in kimyasal yapısı (Polverino vd., 2006)

Yeni bir nikotinamid türevi olan motesanib (AMG-706), (C₂₂H₂₃N₅O), çeşitli kanser türlerinde monoterapi olarak veya kemoterapi ile kombinasyon halinde araştırılan umut verici bir anti-anjiyogenik çok hedefli tirozin kinaz inhibitörüdür (TKI) (Rijavec vd., 2014). Preklinik modellerde vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 1 (VEGFR1/Flt1), VEGFR2/kinaz alanı reseptörü/Flk-1, VEGFR3/Flt4, trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) ve stem cell factor (c-kit)reseptörlerinin güçlü, oral olarak biyoyararlanabilen bir inhibitörü olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.13-2.14) (Polverino vd., 2006).

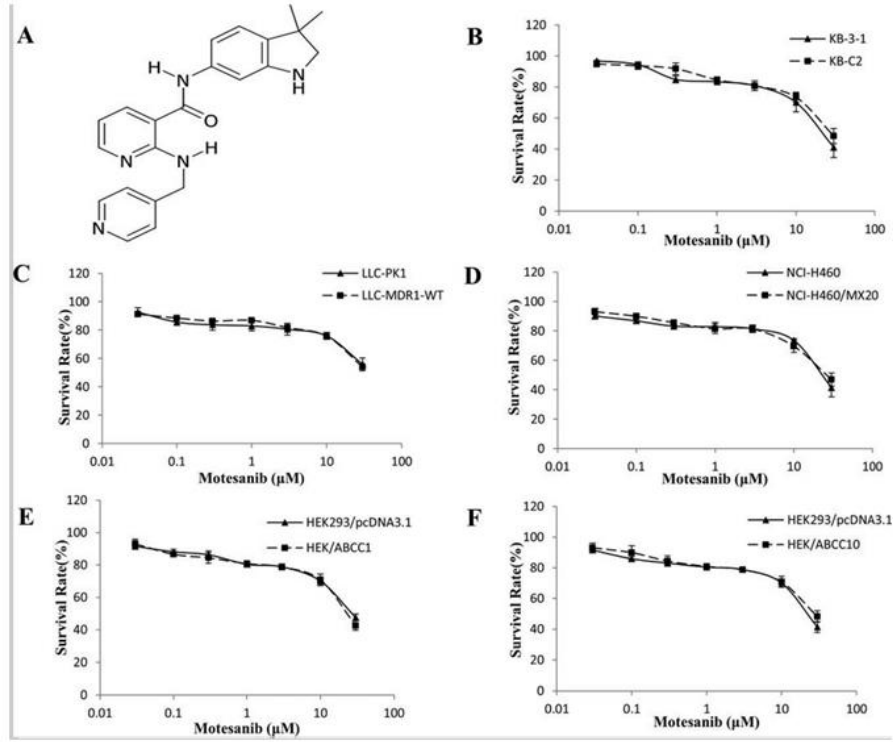


Şekil 2. 13. Motesanib'in etki mekanizması (Polverino vd., 2006)

2.3.2. Motesanib'in etki mekanizması

Bu yeni ajan VEGFR1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR (trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü), c-Kit (kök hücre faktörü reseptörü), Ret'i, ERK: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz; MEK: Mitojenle aktive edilen ERK aktive edici kinaz; mTOR: Rapamisinin memeli hedefi ve PI3K: Fosfatidilinositol 3-Kinazı inhibe eder. Klinik öncesi çalışmalarda motesanib, insan meme karsinomu (Coxon vd., 2009), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, medüller tiroid kanseri ve epidermoid ve kolon karsinomunun ksenograft modellerinde önemli tümör gerilemesine neden olmuştur (Coxon vd., 2012). Medüller tiroid kanserinde, motesanib'in, ağırlıklı olarak anjiyojenezin inhibisyonu yoluyla ve muhtemelen tümör hücrelerinde eksprese edilen VEGFR2 ve Ret'in doğrudan inhibisyonu yoluyla tiroid tümörü ksenograft büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu veriler, anjiyojenez yollarının ve özellikle VEGF yolunun hedeflenmesinin, medullar tiroid kanseri tedavisinde yeni bir terapötik yaklaşımı temsil edebileceğini düşündürmektedir (Coxon vd., 2012). Yapılan bir çalışmada 46 metastatik meme kanseri hastasında dosetaksel veya paklitaksel ile kombine edilen motesanib dozajını bulmak ve ayrıca farmakokinetik, tolerabilite ve güvenliği değerlendirmek için bir faz I çalışması yürütmüştür. Birincil ve ikincil sonlanım noktaları sırasıyla doz sınırlayıcı toksisiteler ve advers olay insidansıydı. Motesanib'in taksan bazlı kemoterapilere (paklitaksel veya dosetaksel) eklenmesinin, günde bir kez oral yolla alınan 125 mg doza kadar tolerans gösterdiğini gözlemlenmiştir (Martin vd., 2011). Motesanib molekülünün yarı ömrü yaklaşık 6-7 saat olup, bu süre,

diğer VEGFR inhibitörleri ile karşılaştırıldığında daha kısadır.(Rosen LS vd., 2007).Motesanib günümüzde ileri gastrointestinal stromal tümör (GIST), fallop tüpü kanseri, yumurtalık kanseri, tiroid kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC) için Faz II ve Faz III klinik çalışmalar altındadır (www.clinicaltrials.gov). Örneğin, imatinibe dirençli GIST hastalarının çalışmasında, motesanib tedavisi kabul edilebilir tolerabilite ve stabil hastalık ve kalıcı stabil hastalık elde eden hastaların oranında görüldüğü gibi mütevazı tümör kontrolü göstermiştir (Benjamin vd., 2011). Ayrıca motesanib, ilerlemiş veya metastatik diferansiye tiroid kanseri olan hastalarda kısmi yanıtları indükleyebilir. Bununla birlikte, tiroid kanserinde anjiyojenezi inhibe eden motesanib tedavisinin daha geniş bir uygulanabilirliğinin daha ileri çalışmalarla ortaya konması gerekmektedir (Sherman vd., 2008). Motesanib tedavisinin en yaygın yan etkileri diyare, yorgunluk, hipotiroidizm, hipertansiyon ve anoreksidir (Schlumberger vd., 2009). VEGF inhibisyonunun hipertansiyona neden olduğu görülmektedir (Rugo vd., 2005; Sakamoto, 2004). Büyük ihtimalle nitrik oksit üretimini inhibe ederek vazokonstriksiyona yol açmaktadır. Faz III MONET1 çalışmasının analizi, motesanibin karboplatin/paklitaksel ile kombine edilmesinin, nonskuamöz küçük hücre dışı akciğer karsinomudur KHDAK'li Asyalı hastaların bir alt kümesinde, tek başına kemoterapi ile karşılaştırıldığında genel sağkalımı (OS), progresyonsuz sağkalımı (PFS) ve objektif yanıt oranını (ORR) iyileştirebileceğini göstermiştir (Kubota vd., 2014). Önemli olarak, ATP-binding cassette taşıyıcı ailesi B üyesi 1 ABCB1'in aşırı ekspresyonu GIST, NSCLC, fallop tüpü, yumurtalık ve tiroid kanseri gibi çeşitli kanserler ile ilişkilendirilmiştir. Motesanibin, diğer TKI'lerde olduğu gibi ilaç bağlama bölgelerine bağlanarak ABC taşıyıcılarının işlevini inhibe edebileceği düşünülebilir (Shukla vd., 2012). Bu durum, motesanibin ABCB1, ABCG2, ABCC1 ve ABCC10'un aşırı ekspresyonu ile ilişkili olan multi-drug resistance (MDR)'yi tersine çevirip çeviremeyeceğini belirleme çabalarımızı tetiklemiştir.

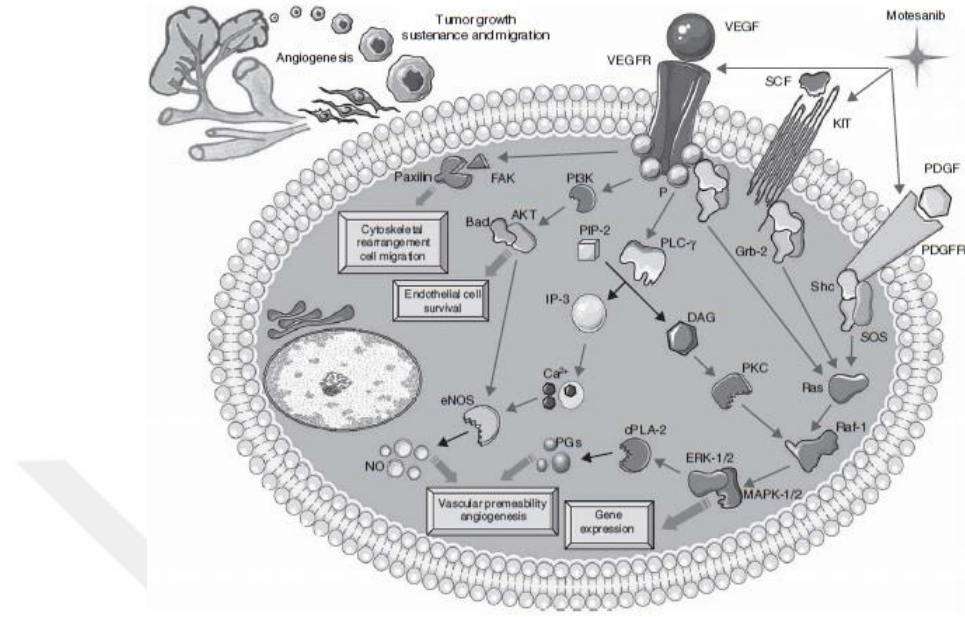


Şekil 2. 14. Motesanibin kimyasal yapısı ve tek başına motesanib ile muamele edilen hücre hatlarının konsantrasyon-cevap eğrileri (Shukla vd., 2012)

(A) Motesanibin (AMG706) kimyasal yapısı. (B) Tek başına motesanib ile tedavi edilen KB-3-1 (insan epidermoid karsinom hücre hattı) ve KB-C2 hücre hatlarının konsantrasyon-cevap eğrileri. (C) Tek başına motesanib ile tedavi edilen LLC-PK1 ve LLC-MDR1-WT hücre hatlarının konsantrasyon-yanıt eğrileri. (D) Tek başına motesanib ile tedavi edilen NCI-H460 ve NCI-H460/MX20 hücre hatlarının konsantrasyon-yanıt eğrileri. (E) Tek başına motesanib ile tedavi edilen HEK293/pcDNA3.1 ve HEK/ABCC1 hücre hatlarının konsantrasyon-cevap eğrileri. (F) Tek başına motesanib ile muamele edilen HEK293/pcDNA3.1 ve HEK/ABCC10 hücre hatlarının konsantrasyon-yanıt eğrileri. Her hücre hattı 72 saat boyunca farklı motesanib konsantrasyonları ile inkübe edilmiştir. Hücre sağkalım oranı "Materyaller ve yöntemler" bölümünde açıklandığı gibi MTT testi ile belirlenmiştir. Hata çubuklarını içeren noktalar ortalama $\pm$ SD'yi temsil etmektedir. Yukarıdaki her şekil, her biri üç kopya halinde yapılan üç bağımsız deneyin temsilcisidir

Şekil 2.15'de motesanib tarafından hedeflenen bazı mekanizmalar görülmektedir. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ve VEGFR (VEGF Reseptörü): Bu sinyal molekülleri, anjiyogenez (yeni kan damarlarının oluşumu) süreçlerini başlatır. VEGF'nin bağlanmasıyla hücre içi sinyal yolları aktive olur. PI3K/AKT yolu: Endotel hücre hayatta kalma mekanizmalarını kontrol eder. PLC- γ (Fosfolipaz C-gamma) ve DAG/IP3 yolu: Hücre içi kalsiyum artışı ve protein kinaz C (PKC) aktivasyonu ile vasküler geçirgenlik ve gen ekspresyonu etkilenir. MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase): Gen ekspresyonunu ve hücre hareketliliğini düzenler. Paxilin/FAK: Hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ve migrasyonunda görev alır. Şekil ayrıca PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) ve SCF (Stem Cell Factor) gibi diğer büyüme faktörleri ve ilgili reseptörlerini göstererek tümör büyümesi, migrasyon ve damar oluşum süreçlerini

betimlemektedir.



Şekil 2. 15. Motesanib tarafından hedeflenen mekanizmalar arasında VEGF, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve KIT bulunmaktadır (Shukla vd., 2012)

AKT: v-akt murin timoma viral onkogen homolog 1 (protein kinaz B); Bad: Bcl-2 ilişkili ölüm promotörü; cPLA-2: Sitoplazmik fosfolipaz A2; DAG: Diasil gliserol; ERK: Hücre dışı sinyal düzenlenmiş kinaz; FAK: Fokal adezyon kinaz; Grb-2: Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2; IP-3: İnositil trifosfat; KIT: Kök hücre faktör reseptörü; MAPK: Mitogen aktive protein kinaz; P: Fosforilasyon; Paxilin: Sinyal iletim adaptör proteini; PDGFR: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü; PG'ler: Prostaglandinler; PLC-g: Fosfolipaz C; Raf-1: Hızla hızlanan fibrosarkom; Ras: Sıçan sarkom proteini; SCF: Kök hücre faktörü; Shc: Src homologisi içeren protein; Src homologisi içeren protein; VRAP: VEGFR ilişkili protein.

2.3.3. Farmakokinetik

En güçlü proanjiyojenik maddelerden biri, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ailesine ait sitokinlerdir. VEGF ailesi sitokinleri, kinaz domen reseptörüne (aynı zamanda vasküler endotelial büyüme faktörü reseptör-2 veya fetal karaciğer kinaz-1 olarak da bilinir) ve diğer benzer tirozin kinaz reseptörlerine bağlanarak aktive olur ve endotelial hücrelerde uyarıcı bir yanıt oluşturarak yeni damar oluşumunu teşvik eder. Ayrıca, trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) ve/veya hücrel kök hücre faktörü reseptörü (c-kit) gibi reseptörler, katı tümör hücrelerinde ifade edilir ve gastrointestinal stromal tümör, küçük hücreli akciğer kanseri, gliomlar, kronik miyelomonositik lösemi, mastositoz ve yumuşak doku sarkomları gibi çeşitli tümör türlerinin patobiyolojisinde rol oynar. VEGF reseptörlerini, PDGFR'yi ve/veya c-kit'i hedef alan inhibitörler, anjiyojenezi engelleyerek veya kanser hücrelerinin hayatta

kalma ve büyüme için bağımlı olduğu otokrin döngüleri bozarak tümör büyümesini potansiyel olarak durdurabilir (Gosselin vd., 2015).

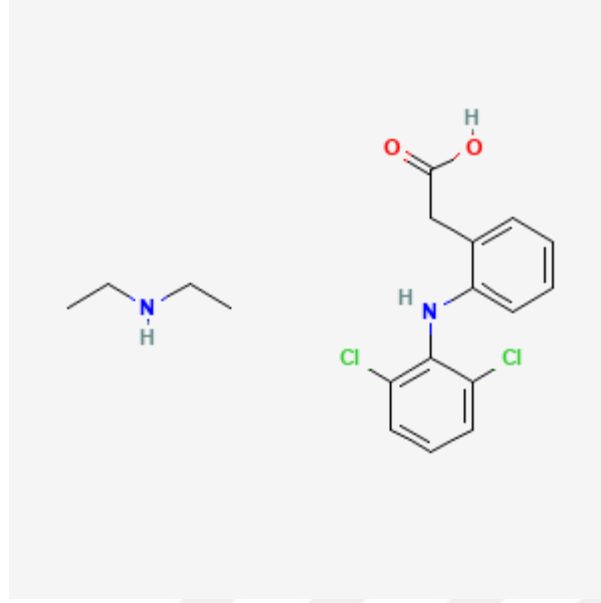
Motesanib, bilinen tüm VEGF ve PDGF reseptörlerini ve c-kit'i seçici bir şekilde inhibe ederek anti-anjiyojenik ve antitümör etkiler gösteren güçlü bir oral multikinaz inhibitörü olarak prelinik çalışmalarda tanımlanmış küçük bir organik moleküldür. Hem klinik öncesi hem de klinik çalışmalarda kabul edilebilir bir güvenlik profiline sahip olduğu gösterilmiştir ve farmakokinetik profili, insanlarda günlük oral dozlamaya uygun görünmektedir (Gosselin vd., 2015).

2.4. Diklofenak Dietilamin

Diğer birçok tıbbi uygulamanın yanı sıra, 2-{2-[(2,6-dikloroanilino)fenil]asetik asit türevleri olarak da bilinen diklofenak (DCF), özellikle iskelet ve kas ağrısı olmak üzere akut ve kronik ağrıyı tedavi etmek için kullanılan kısa yarı ömürlü 6 saatten kısadır, seçici olmayan bir NSAID'dir (Kant Lomesh vd., 2019).

Diklorofenak, resmi olarak prostaglandin-endoperoksit sentaz (PTGS) olarak bilinen COX enzimlerini inhibe ettiği için anti-enflamatuar bir etkiye sahiptir. Bununla birlikte, bu ilaç COX-2'yi COX-1'den daha güçlü bir şekilde baskılar ve analjezik, anti-enflamatuar ve antipiretik etkileri olan bir fenilasetik asit yapısına sahiptir (Altman vd., 2015). Deneylerden elde edilen raporlara göre, diklofenak tümör ksenograft büyümesi ve kanser hücresi proliferasyonu üzerinde konsantrasyona bağlı inhibitör etkiye sahiptir (Mayorek vd., 2010; Smirnova vd., 2012). Ayrıca, bir sıçan kolon kanseri modelinde, kemopreventif bir ajan olarak işlev gördüğü gösterilmiştir (Rana vd., 2012).

Diklofenak dietilamin, steroid olmayan bir anti-enflamatuar ilaçtır (NSAID). Ciltte ağrı ve enflamasyona (kızarıklık ve şişme) neden olan belirli kimyasal habercilerin salınımını engelleyerek çalışır.



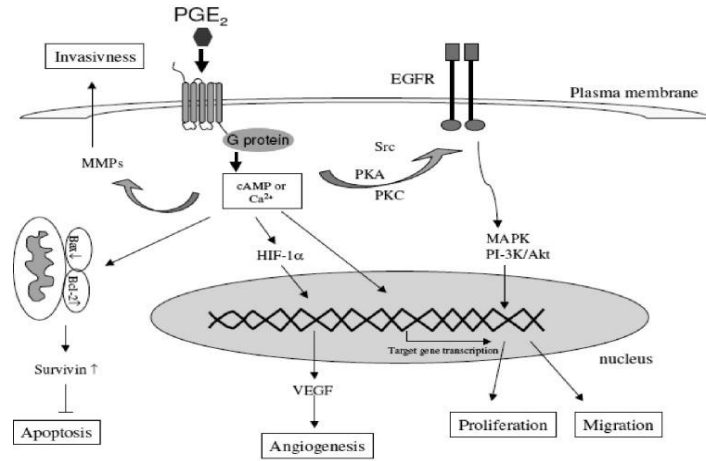
Şekil 2. 16. Diklofenak dietilamin'in kimyasal yapısı (Kant Lomesh vd., 2019)

2.4.1. Diklofenak dietilamin'in etki mekanizması

Güçlü ve seçici olmayan bir anti-enflamatuar ajan olan diklofenak dietilamin, CHO hücrelerinde insan COX-1 ve COX-2 için sırasıyla 4 ve 1,3 nM ve küçükbaş COX-1 ve COX-2 için 5,1 ve 0,84 μ M IC₅₀'lere sahip bir COX inhibitörü olarak işlev görür. Diklofenak dietilamin, kaspaz kaskadının aktivasyonu yoluyla nöral kök hücrelerin (NSC'ler) apoptozunu indükler (Pantziarka vd., 2016). Diklofenak bir fenilasetik asit türevi ve non-steroid anti-inflamatuvar ilaçtır (NSAID). NSAID etiketi, prostaglandinlerin (PG'ler) üretilmesinden sorumlu enzim olan siklooksijenaz (COX)-1 ve -2'yi inhibe eder, biyoaktif moleküllerin sentezinde hız sınırlayıcı enzimdir. Membran tarafından salınan araşidonik asidi ara ürün prostaglandin G₂'ye (PGG₂) ve ardından hidroperoksidad aktivitesi ile prostaglandin H₂'ye (PGH₂) dönüştürür. PG'ler enflamasyona ve ağrı sinyaline katkıda bulunur. Diklofenak, diğer NSAİİ'ler gibi, çeşitli nedenlerden kaynaklanan akut ve kronik ağrı ve enflamasyon için genellikle ilk basamak tedavi olarak kullanılır. Diklofenak, fenilbutazon, mefenamik asit ve indometasin yapılarına dayanan rasyonel ilaç tasarımının bir ürünüdür (Sallmann, 1986). Ayrıca, kanser hücrelerinin sağlıklı bir şekilde büyümesi için yeni kan damarlarına ihtiyaçları vardır. COX-2'nin aşırı aktivitesi, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) gibi anjiyogenezle ilişkili proteinlerin üretimini artırabilir. Bu da tümörlerin daha fazla oksijen ve besin almasını sağlayarak, tümörlerin daha hızlı büyümesine yol açabilir, COX-2'nin aşırı ekspresyonu, PGE₂'nin üretimini artırarak

hücre proliferasyonunu, invazyonu ve metastazı destekler. PGE2, kanserin bağışıklık yanıtlarından kaçmasına da yardımcı olabilir (Meade vd.,1999). COX-2'nin aşırı ekspresyonu, kolon, serviks, akciğer, prostat ve meme kanseri gibi birçok kanser türünde kötü prognozla ilişkilidir (Masunaga vd., 2000; Soslow vd., 2000; Okami vd., 1999; Lim vd., 2000; Achiwa vd., 1999; Half vd., 2002; Yoshimura vd., 2000). Kanser hastalarında yaygın olarak görülen trombositoz (trombosit sayısındaki artış), kötü prognozla ilişkilendirilmekte, Trombositler, tümör hücrelerini doğal öldürücü (NK) hücrelerden koruyarak, bağışıklık sisteminin bu hücrelere saldırmasını engeller (Gay vd., 2011; Digkila ve Voutsadaki, 2014; Rachidi vd., 2014; Kim vd., 2014). Diklofenak, esas olarak COX-2 enzime yüksek afinitesi ile bilinse de, COX-1 enzimini de inhibe ederek önemli bir antitrombotik etki oluşturur (Van Hecken vd., 2000; Bajaj vd., 2004). Bu mekanizma, trombosit kaynaklı proanjiyogenik ve kanser destekleyici etkileri baskılamaya katkıda bulunur. COX-2 (siklooksijenaz-2), beyin tümörlerinde önemli bir biyomarker ve potansiyel tedavi hedefi olarak öne çıkmaktadır. Beyin tümörlerinin çoğunda, özellikle malign gliomlar ve diğer malign beyin tümörleri, COX-2'nin aşırı ekspresyonu gözlemlenmiştir. Bu durum, tümörlerin agresif özelliklerini ve kötü prognozlarını destekleyebilir, siklooksijenaz-2 (COX-2) ve beyindeki ana ürünü olan prostaglandin E2'nin (PGE2), GBM'nin gelişimi ve ilerlemesinde rol oynadığı düşünülmektedir (Qiu vd., 2016). Beyin tümörleri arasında astrositom, glioblastom, menenjiyom, medulloblastom, kraniyofarenjiyom, oligodendrogliom, ependimom ve nörinom gibi pek çok tümör türü yüksek düzeyde COX-2 ekspresyonu sergiler (Patti, 2002; Joki, 2000). COX-2 enzimi, tümör hücrelerinde inflamasyonu artırarak ve apoptotik mekanizmaları baskılayarak kanserin ilerlemesine katkıda bulunur. Çoğu insan malign gliom hücre hattında yapısal olarak yüksek COX-2 seviyelerinin görülmesi, gliom ve diğer beyin tümörlerinde COX-2'nin tümör progresyonunda önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Lalier, 2007). Kötü huylu beyin tümörlerinde COX-2'nin indüksiyonu, prostaglandin E2 (PGE2) seviyelerindeki artışla ilişkilidir, Bu nedenle, gliomlar gibi kötü huylu beyin tümörlerinde COX-2 ekspresyonu, diğer değişkenlerden bağımsız olarak kötü sağkalım oranları ve tümör agresifliğinin güçlü bir belirleyicisi olarak öne sürülmektedir. Prostaglandin E2 (PGE2), tümör mikroçevresinde önemli bir molekül olarak bilinir ve prostanoid E reseptörleri (EP1 - EP4) aracılığıyla vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) üretimini yukarı düzenleyerek anjiyogenez artırabilir. Bu mekanizma, tümör büyümesi ve metastaz için

kritik bir rol oynar (Ben-Av vd., 1995). PGE2, β -katenin sinyal yolunu aktive ederek kolorektal kanser gibi çeşitli kanser türlerinde tümör büyümesini destekler (Castellone, 2005) ve DCF'nin bunu in vivo olarak inhibe edebildiği bilinmektedir (Kaur vd., 2010). COX-2/PGE2 ekseninin immünsupresyon üzerindeki etkileri, kanser tedavisinde önemli bir hedef olarak öne çıkmaktadır. Bu mekanizmaların inhibisyonu, bağışıklık sisteminin kanser hücrelerini tanıma ve yok etme kapasitesini artırarak, tümör progresyonunu ve metastazı engelleyebilir (Obermajer vd., 2011; Johnson vd., 2014; Baratelli vd., 2010). PGE2'nin varlığı, lenfositlerin mitojenlere (ör. T hücre aktivatörleri) karşı verdiği proliferatif yanıtı baskılar. Bu durum, bağışıklık yanıtını daha da zayıflatır (Wasserman vd., 1989; Blomgren vd., 1990). PGE2, immünsupresif T-regülatör hücrelerin (T-reg) sayısını artırır (Kalinski, 2012; Baratelli vd., 2005, 2010; Cho vd., 2005). T-reg hücreleri, bağışıklık yanıtlarını baskılayarak tümörlerin bağışıklık sisteminden kaçışına katkı sağlar ve Antijen sunucu hücrelerin (APC) ve dendritik hücrelerin (DC) olgunlaşması ve aktivasyonu PGE2 tarafından inhibe edilir (Sombroek vd., 2002; Shiraishi vd., 2008). Selektif olmayan COX inhibitörleri, PGE2'yi azaltarak: T-reg hücre popülasyonlarını ve aktivitesini düşürür, Tümörle ilişkili immünsupresyonu tersine çevirir (Yaqub vd., 2008; Lee vd., 2009; Lönnroth vd., 2008; Ogawa vd., 2014; Chirasani vd., 2013). Diklofenak gibi NSAİ'ler DNA parçalanmasını tetikleyebilir ve bu süreç kaspaz bağımlı bir yolak üzerinden ilerleyebilir (Johnsen vd., 2004). Rana ve arkadaşlarının 2015'teki araştırmasına göre, NSAİ'lerin hücre sinyalizasyonunda önemli bir rol oynayan AKT/PI3K yolunu inhibe edebileceği gösterilmiştir. Bu durum hücre büyümesini ve hayatta kalmayı olumsuz etkileyebilir (Rana vd., 2015). NSAİ'ler reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücre içindeki seviyesini artırabilir. ROS artışı oksidatif stres yoluyla hücre hasara neden olabilir, Kaspaz-9 ve kaspaz-3 gibi pro-apoptotik proteinlerin aktivasyonunun yanı sıra, hücre içi ölüm süreçleri Bcl-2/Bax oranındaki azalma ve sitokrom c'nin mitokondriden salınımı ile ilişkilendirilmiştir (Albano vd., 2013). ROS'un artan üretimini, MAPK kaskadı, COX-2/PGE2 üretimi ve TPA'nın (12-O-tetradekanoilphorbol-13-asetat) tümör promotörü MMP-9 (matriks metalloproteinaz-9) gen aktivasyonu gibi yollar aracılığıyla, malign transformasyon ve tümör ilerlemesinde kritik katkıları olduğu belirtilmektedir (Chiu vd., 2010). Bu mekanizmalar, NSAİ'lerin sadece antiinflamatuvar etkilerle sınırlı kalmadığını, aynı zamanda hücresel düzeyde programlanmış hücre ölümü (apoptoz) süreçlerini de etkilediğini göstermektedir.



Şekil 2. 17. COX-2 türevi prostaglandinlerin karsinogenezde rol aldığı farklı mekanizma (Zarghi ve Arfaei, 2011).

COX-2, karsinogenezin farklı aşamalarında yer alan birçok süreci etkiler. Bunlar arasında ksenobiyotik metabolizması, hücre proliferasyonu, anjiyojenez, apoptoz, immün fonksiyon ve tümör invazivliği yer almaktadır (Şekil 2.17).

Diklofenak, in vitro ve in vivo farklı kanser modellerinde Myc gen ekspresyonunu baskılamaktadır. Myc, hücre büyümesi ve metabolizmasında önemli rol oynayan bir proto-onkogen olarak bilinir. Bu nedenle, Myc'nin ekspresyonunun azalması tümör hücrelerinin metabolik aktivitelerini ve proliferasyon yeteneklerini olumsuz etkileyebilir. COX inhibitörü etkisinden, Myc üzerindeki etkileriyle bağlantılı olarak glukoz metabolizmasını aşağı yönde düzenlediği (downregüle ettiği) gösterilmiştir. Bu durum, tümör hücrelerinin enerji üretimi ve hayatta kalmaları için ihtiyaç duyduğu glukoz kullanımını sınırlayabilir. Myc gen ekspresyonu üzerindeki etkilerden bağımsız olarak, cox inhibitörü hücrelerde laktat seviyelerinde artışa neden olmaktadır. Laktat artışı, hücresel metabolizmadaki yeniden yapılanmaların bir işareti olabilir ve proliferasyon hızının azalmasına sebep olabilmektedir (Chirasani vd., 2013; Gottfried vd., 2013; Leidgens vd., 2015).

Malign gliomlar, büyümeleri sırasında tipik olarak artan bir kan kaynağına ihtiyaç duyar ve bu durum anjiyojenez süreciyle sağlanır. Bu özellikleri nedeniyle, GBM gibi oldukça vasküler tümörlerde antianjiyojenik tedavi stratejileri umut verici bir seçenek olarak görülmüştür (Lu-Emerson, 2015). COX-2 aşırı ekspresyonunun, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) üretimindeki artış ve yüksek mikrodamar yoğunluğu (MVD) ile güçlü bir şekilde korele olduğu bulunmuştur. COX-2'nin bu mekanizmalardaki rolü, glioblastoma tedavisinde hedeflenebilecek potansiyel bir yolak olarak

değerlendirilmektedir ve anjiyogenezle ilişkili prognoz üzerindeki etkisi dikkate alınmalıdır(Hara vd., 2004). Yüksek COX-2 seviyeleri, artan inflamasyon, tümör büyümesi ve invazyonu gibi süreçleri destekleyerek hastalık progresyonuna katkıda bulunur (Shono, 2001). Fenil halkasının orto pozisyonuna iki klor grubunun eklenmesi, halkayı maksimum torsiyonda kilitler ve bu da artan potens ile ilişkili görünmektedir. NSAİİ ile indüklenen gastrik ülserleri önlemek için sıklıkla misoprostol ile kullanılır. Diklofenak ilk olarak Temmuz 1988'de FDA tarafından Novartis (daha önce Ciba-Geigy) tarafından pazarlanan Voltaren ticari adı altında onaylanmıştır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Malzemeler

Hücre kültür flaskı (25 cm² -75 cm² 'lik) (TPP, Almanya);

kriyotüp (2 mL) (TRP, İsviçre);

Kültür plakası (6 ve 96 kuyucuklu) (TRP, İsviçre); Thoma lamı,

Çeşitli cam malzemeler,

Steril enjektör (20 mL),

Filtre (0,22 µM milipor) (TRPAlmanya);

Mikropipet ucu (silikonlu 10, 200, 1000 µL) (Eppendorf);

Santrifüj tüpleri (15, 50 mL) (TPP, Almanya);

Şarjlı pipet (Isolab, Almanya);

Tek kullanımlık dereceli pipet (5-10-25mL) (HBG, Almanya);

12 kanallı otomatik pipet (Eppendorf, Kanada).

Penisilin/Streptomisin (Gibco, Amerika Birleşik Devletleri)

6 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakası TPP, İsviçre,

Dimetilsülfoksit (DMSO) Sigma–Aldrich, Almanya

Fetal Bovine Serum (FBS) Sigma–Aldrich, Almanya

Tripan mavisi Roche, Almanya,

Kryotüp (2mL) Greiner Bio-One, ABD

Hücre kazıyıcı Greiner Bio-One, ABD

Phosphate Buffer Saline (PBS) Invitrogen, Almanya

Lipopolisakkarit (LPS) Sigma–Aldrich, Almanya

Annexin V and PI Apoptosis Kit Biotium

MEM (Minimum Essential Medium) Sigma–Aldrich, Almanya

Diklofenak dietilamin Sigma–Aldrich, Almanya

FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit

PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit

PE Anti-Human IL-6 Antibody Invitrogen, Almanya

PE Anti-Human IL-10 Antibody Invitrogen, Almanya

PE Anti-Human IL-1 β Antibody Invitrogen, Almanya

PE Anti-human TNF- α Antibody Beckman Coulter

Anti-Hu IL-8 Antibody Invitrogen, Almanya

COX2 Monoclonal Antibody eBioscience™ Invitrogen, Almanya

DCFDAcellular ROS detection assay Abcam'dan

JC-1 detection assay Biosciences

3.2. Kullanılan Cihazlar

Graphpad Prism10, Cedex (Innovatis), xCELLigence (Roche), ABD, RTCA DP Roche, Almanya, inverted mikroskop (Leica), su banyosu (Nuve), yüksek devirli santrifüj (Eppendorf), Vorteks (Daihan, Güney Kore), kuru hava sterilizatörü (Nüve, FN 500), otoklav (Alp), derin dondurucu buzdolabı (Altus), CO2 inkübatörü (Thermo Scientific), steril kabin (Heal Force), sıvı azot kabı, otomatik pipetler, hassas terazi (Ohaus, İsviçre)

3.3. Kullanılan Malzemelerin Steril Edilmesi

Çalışmalarda kullanılacak cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180°C'de 2 saat, sıvı solüsyonlar ise otoklavda 121°C'de, 1.5 atm/Hg'de 20 dakika steril edilmiştir.

3.4. Deneylerde Kullanılan U87MG, THP-1 ve HUVEC Hücrelerinin Kültür Ortamında Çoğaltılması ve Sayımı

Çalışmamızda kullanılan hücreler, American Tissue Culture Collection (ATCC) koleksiyonundan temin edilmiş ve Farmakoloji Hücre Kültürü stoklarından alınmıştır. Deneylerimizde kullanılan hücre hatları arasında U87MG insan glioblastoma hücreleri (ATCC kodu: HTB-14), THP-1 insan monosit hücreleri (ATCC kodu: TIB-202) ve HUVEC insan kordon damar endotelial hücreleri (ATCC kodu: PCS-100-013) yer almaktadır.

Hücreler kültür koleksiyonundan alındığında donmuş haldeydi. Donmuş hücreleri çözmek için, hücreler hızla 37°C’de bir su banyosuna yerleştirildi ve krio tüpüne su girmemesi sağlandı. Tamamen çözündükten sonra hücreler, uygun bir kültür ortamı ile temiz bir şişeye transfer edildi. Hücreler, 1250 RPM hızında 15 dakika santrifüj edilerek ayrıldı. Süpernatant atıldıktan sonra kalan hücreler, taze kültür ortamı ile yeniden süspansiyon haline getirildi. Pipetleme işleminin ardından hücreler bir şişeye aktarılacak üzere alındı ve 37°C’de, %95 bağıl nemde bir inkübatörde çoğalmaları için kültürlendi.

Kültür şişesindeki hücre yoğunluğu yaklaşık %70’e ulaştığında, hücreler daha fazla büyüme sağlamak için paslanarak sonraki deneylerde kullanılmak üzere hazır hale getirildi.

U87MG hücreleri için MEM (Minimum Essential Medium) kullanıldı, bu ortam %10 FBS (fetal inek serumu), %1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin ve %1 sodyum pirüvat ile beslenmiştir. THP-1 hücreleri için RPMI-1640 ortamı, %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %0.37 merkaptotanol eklenerek kullanıldı. HUVEC hücreleri, F-12 Kaighn’s Modified Medium ile %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin içerir ve 1:50 oranında endotelial hücre büyüme faktörü (ECGF) eklenmiştir. Bu hücreler, inkübatörlerde %95 bağıl nem, %5 CO₂ ve 37°C’de kültürlendiler.

Hücreler her gün ışık mikroskobu altında incelendi. Şişedeki hücre yoğunluğu %70-80’e ulaştığında, daha fazla büyüme ve çoğalma sağlanarak deneylerde kullanılmak üzere paslanmıştır.

İnsan monosit hücreleri (THP-1) (ATCC kodu: TIB-202™); %5 CO₂, 37°C’de, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin – streptomisin (100 U / ml penisilin ve 100 mg/ml streptomisin) içeren RPMI-1640 kültür ortamında çoğaltıldı (Iverson vd 2018; Kim vd., 2016). 1980’de Tsuchiya ve arkadaşları tarafından geliştirilen THP-1 hücre hattı keşfedildikleri günden itibaren monosit ve makrofajların fonksiyonlarının araştırılmasında, antiinflamatuvar etkilerin değerlendirilmesinde en sık kullanılan hücrelerden olmuştur. Yapılan çalışmalar THP-1 hücrelerinin morfolojik ve farklılaşma özellikleri bakımından primer monosit ve makrofajlara benzediğini göstermiştir. Dolayısıyla bu hücreler hattı sadece monosit ve makrofaj benzeri hücrelerin immün yanıt çalışmalarında kullanılmaktadır (Chanput vd., 2014).

HUVEC İnsan umbilikal ven endotel hücreleri, göbek kordonundaki damarların

endotelyumundan türetilen hücrelerdir. Endotel hücrelerinin fonksiyon ve patolojisinin incelenmesi için bir laboratvar model sistemi olarak kullanılırlar. Düşükmaliyetleri ve normal doğumdan sonra çıkarılan göbek kordonlarından basit tekniklerle izole edilmeleri nedeniyle kullanılırlar. HUVEC ler ilk olarak 1970 lerde jaffe ve diğerleri tarafından in vitro olarak izole edilmiş ve kültürlenmiştir. HUVEC bir laboratvar ortamında kolaylıkla çoğalabilmektedirler. Çalışmamızda kullanılan hücreler yaklaşık 36 saatte bir çiftlenir. HUVEC (İnsan Kordon Damar Endotelyal Hücreleri), insan kordonundan alınan endotelyal hücrelerden türetilmiş hücre hatlarıdır. HUVEC'ler, damar biyolojisi ile ilgili olmaları ve endotelyal hücre davranışlarını in vitro modelleyebilme yetenekleri nedeniyle endotelyal hücre fonksiyonlarını incelemek ve tanımlamak için yaygın olarak kullanılır (Park vd., 2006; Jimenez vd., 2013; Pope ve Tschopp, 2007).

HUVEC hücreleri (ATCC kodu;CRL-1730TM),%95 bağılı nem 37°C'de %5CO₂ li gaz ortamında %10 FBS,% L-glutamin,%sodyum pirüvat ve 1:50 endotel hücre büyüme faktörü(ECGF) içeren F-12 Kaighn's modifiye medyum ile kültüre edilmiştir (Yine vd 2019; Yazır ve Dalçık, 2012; Kim vd., 2016).

Flasklarda çoğalan U87MG ve HUVEC hücreleri adheren hücre olmaları nedeniyle besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile yıkanmış, 1 mL 1X tripsin ilave edilmiş ve 3 dakika inkübatörde bekletilerek hücrelerin yapıştıkları flasktan kalkmaları sağlanmıştır. Kültür ortamı falkona alınarak 1250 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve pellet 1 mL taze besiyerinde süspanse edilmiştir. THP-1 hücreleri süspanse hücreler olmaları sebebi ile flasktan direk santrifüj tüpüne alınarak süpernatant atılmış ve pellet 1 mL besiyerinde süspanse edilmiştir. Hücrelerin homojen dağılımı sağlanacak şekilde karıştırılıp hücre sayım cihazında (Cedex, Roche) sayımları yapılmıştır (Karakuş, 2016). Hücrelerin sayımı için, 10 µL tripan mavisi ve 10 µL hücre çözeltisi karışımı sağlanarak ölü hücrelerin maviye boyanması sağlanmış, 10 µL boya-hücre karışımından alınarak hücre sayım cihazında (Cedex, Roche) sayılmıştır. Canlı hücre sayısı belirlenerek, deneysel yöntemle göre belirlenen hücre sayısında plakalara hücre ekimi yapılmıştır.

3.5. Kullanılan Kimyasal Maddelerin Hazırlanması

Diklofenak dietilamin: DMSO içinde çözülerek Ana stok 200mM konsantrasyonda hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok, aliquatlanarak -20°C'de saklanmış, stok

solüsyondan, kültür medyumunda çeşitli dilisyon işlemleri yapılarak, gerekli deney konsantrasyonları yeniden yapılmıştır.

Motesanib: DMSO ile çözülerek 20mM ana stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok, alikuatlanarak -20°C'de saklanmış, stok solüsyondan, kültür medyumunda farklı dilisyonlar yapılarak, gerekli deney konsantrasyonları taze olarak hazırlanmıştır

Lipopolisakkarit (LPS): Liyofilize halde bulunan LPS (L4005-100MG, Sigma) steril distile su içinde çözülerek 5 µg/mL konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. LPS'den hazırlanan ana stok, alikuatlanarak -20°C'de saklanmıştır.

3.6. MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

Sitotoksiste, canlı hücelere toksik olan maddelerin hücre canlılığını ve proliferasyonunu ne kadar etkilediğini ifade eder. En yaygın kullanılan sitotoksiste testlerinden biri, kolorimetrik MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2)-2,5-difenil-tetrazolyum bromür) testidir. 1983 yılında Mosmann tarafından geliştirilen bu yöntem, hücre canlılık testleri için "altın standart" olarak kabul edilmektedir. MTT, sarı renkli bir formazan tuzudur. Hücreler proliferasyon geçirdiğinde, artan mitokondriyal dehidrogenaz enzimi aktivitesi nedeniyle MTT'yi çözünebilir mor formazan kristallerine dönüştürürler. Bu kristaller, dimetil sülfoksit (DMSO) veya izopropil alkolde çözünür. Eğer hücre metabolizması aktifse, mitokondrilerde daha fazla enzim bulunur ve bu, tetrazolyum tuzunun daha fazla indirgenmesine neden olur. Daha fazla formazan oluşan kuyularda daha koyu mor bir renk gözlemlenirken, daha açık tonlar daha az formazan oluşumunu gösterir. Solvent eklenmesinin ardından, renk skalasına dayalı ölçümler yapılır ve bu, formazan kristallerinin yoğunluğuyla ilişkilidir. Ölü hücrelerde formazan kristalleri oluşmaz, çünkü indirgeme işlemi yalnızca mitokondriyal redüktaz enzimleri mevcut olduğunda gerçekleşir, bu nedenle formazan miktarı, canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır.

Bu süreçte, sarı renkli tetrazolyum boyası olan MTT, hücrelerdeki mitokondriyal NADH veya NADPH bağımlı oksidoredüktaz enzimleri tarafından indirgenerek mor, çözünmeyen formazan kristalleri oluşturur. Aktif oksidoredüktaz enzimlerinin seviyesi, hücrel metabolik aktiviteyi yansıtır. Formazan DMSO içinde çözüldükten sonra, 570 nm'de absorbans ölçülür. Hücre canlılığı, spektrofotometrik olarak belirlenir; kontrol hücrelerinin (tedavi uygulanmayan) canlılığı %100 olarak kabul edilir ve tedavi edilen hücrelerin canlılığı, kontrol hücrelerine göre yüzde olarak hesaplanır (Erkekoğlu vd.,

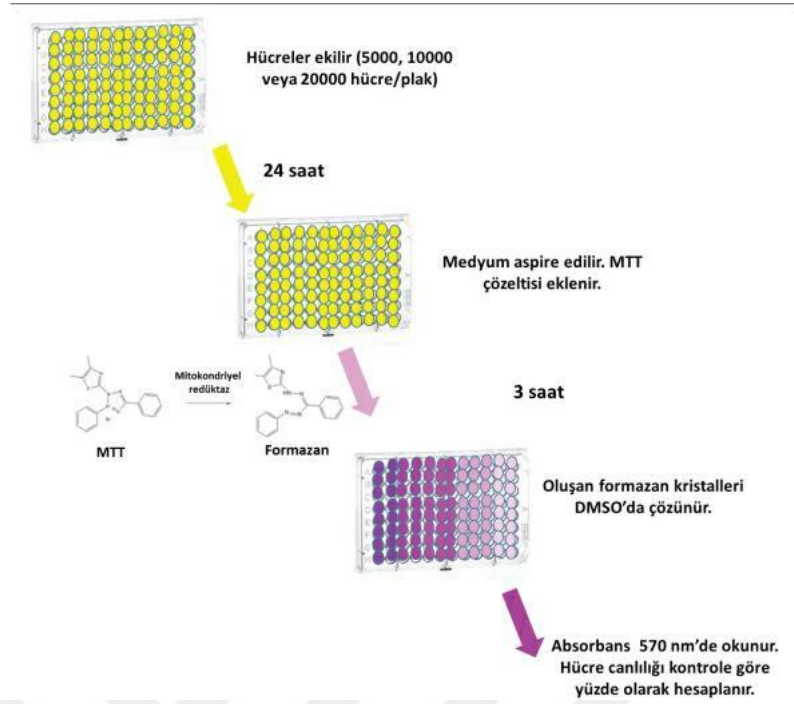
2021; Kalkan vd., 2016; Kısmalı ve Sel, 2012; Salman, 2018).

Sonuçlar, yüksek hassasiyetle çok kuyulu tarama spektrofotometresi kullanılarak okunabilir. Kolorimetrik ölçümün başlıca avantajları hız, doğruluk ve radyoizotopların bulunmamasıdır (Mosmann, 1983).

Çalışmamızda, MTT yöntemi, Motesanib, Diklofenak dietilamin ve bu maddelerin kombinasyonlarının U87MG, THP-1 ve HUVEC hücre hatları üzerinde sitotoksik etkileri olup olmadığını incelemek için uygulanmıştır. Bu amaçla, hücreler 96 kuyulu plakalara, her kuyuda 5000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler, Motesanib (40 µM, 20 µM, 10 µM), Diklofenak dietilamin (200 µM, 100 µM, 50 µM) ve bu maddelerin kombinasyonları ile tedavi edilerek 48 saat inkübe edilmiştir. Kontrol grubu, %0.2 DMSO içeren kültür medyası ile tedavi edilmiştir.

İnkübasyon süresinin sonunda, hücrelerden ortam çıkarılmıştır (THP-1 hücreleri için santrifüj kullanılmıştır) ve her kuyuda hücrenin kendi ortamında hazırlanmış 5 mg/ml MTT çözeltisinden 10 µL eklenmiştir. Plakalar 3 saat inkübe edilmiştir, ardından formazan kristalleri DMSO içinde çözündürülmüş ve absorbans 570 nm'de ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri, hücrelerin metabolik aktivitesine karşılık gelir ve canlı hücre sayısı ile ilişkilidir. Kontrol kuyularının ortalama absorbans değerleri %100 olarak kabul edilerek, uygulanan maddelerin konsantrasyonları hesaplanmış ve hücre canlılık formülüne dayalı olarak yüzde olarak ifade edilmiştir. Deneyler, bağımsız olarak üçlü tekrarlarla yapılmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Örneğin absorbans değeri}}{\text{Kontrolün absorbans değeri}} \times 100$$



Şekil 3. 1. MTT'nin yapılışı (Erkekoğlu vd., 2021)

3.7. Motesanib, Diklofenak Dietilamin ve Kombinasyonlarının U87MG, HUVEC ve THP-1 Hücreleri Üzerinde Sinerjistik, Additif ve Antagonistik Etkilerinin Değerlendirilmesi

İlaç Etkileşim Katsayısının (CDI) Hesaplanması:

İlaç etkileşim katsayısı (CDI), sinerji, additiflik ve antagonizm analizleri için kullanılmaktadır. CDI, aşağıdaki şekilde hesaplanır:

$$CDI = XY/X+Y$$

Burada:

- X ve Y, sırasıyla tek başına Motesanib ve Diklofenak Dietilamin'in belirli konsantrasyonlarındaki hücre canlılık yüzdeleri ifade eder.
- XY, Motesanib ve Diklofenak Dietilamin'in kombine uygulamalarındaki hücre canlılık yüzdesidir.

CDI değerinin yorumlanması:

- **CDI < 1:** Sinerji
- **CDI < 0.7:** Güçlü sinerji
- **CDI = 1:** Additif etki
- **CDI > 1:** Antagonizm (Lopez-Acevedo vd., 2014)

Deneysel Prosedür:

1. Konsantrasyonların Hazırlanması:

- Motesanib'in konsantrasyonları: 40 μ M, 20 μ M, 10 μ M
- Diklofenak Dietilamin'in konsantrasyonları: 200 μ M, 100 μ M ve 50 μ M

2. Uygulama Prosedürü:

- U87MG, HUVEC ve THP-1 hücre hatlarına Motesanib ve Diklofenak Dietilamin tek başına ve kombinasyon halinde uygulanmıştır.
- Her iki ilaç kombinasyonları için, 48. saatte MTT assay kullanılarak hücre canlılık yüzdeleri ölçülmüştür.

3. CDI Hesaplaması ve Etkilerin Değerlendirilmesi:

- Elde edilen hücre canlılık yüzdeleri kullanılarak CDI hesaplanmış ve ilaç etkileşimlerinin sinerjistik, additif veya antagonistik etkileri belirlenmiştir (Zhao vd., 2014; Hao vd., 2008).

3.8. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA-DP) İle U87MG Hücrelerinde Motesanib'in Anti-Proliferatif Etkilerinin Belirlenmesi

MTT yöntemi ile sitotoksik etkisi değerlendirilmiş olan motesanibin, U87MG hücreleri üzerinde 40-20-10 μ M konsantrasyonlarının anti-proliferatif etkileri gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde (RTCA-DP) çalışılmış ve IC50 değeri belirleme çalışmaları yapılmıştır. RTCA-DP sistemi, elektriksel empedans ölçümü ile hücre canlılığını tespit ederek gerçek zamanlı veriler oluşturur. E-plakadan sistem tarafından alınan değerler, literatürde kabul edilen birimsiz 'cell index (CI)' (hücre indeksi) değeri olarak hesaplanır. Bu değer, hücreler E-plakanın tabanını kaplayıp çoğaldıkça verilen elektriksel yanıtla paralel olarak artmaktadır (Limame vd., 2012; Özkay vd., 2016).

xCELLigence sistemi, Roche Applied Science ve ACEA Biosciences tarafından sağlanan talimatlara uygun olarak kullanılmıştır (Roche Applied Science ve ACEA Biosciences, 2008). Sistem, dört ana bileşenden oluşur: RTCA analizörü, RTCA DP istasyonu, yazılımı bulunan RTCA bilgisayar ve tek kullanımlık E-plate 16. E-plate 16, standart 96 kuyucuklu plakalardan farklı olarak, her kuyucukta alt kısmında bulunan birleşik altın hücre sensör dizileri ile hücrelerin izlenmesine olanak tanır. Sensör elektrotları, elektrotların üzerindeki hücre değişimlerini izleme ve tespit etme özelliğine sahiptir. RTCA ölçümleri sırasında elektrotlara yaklaşık 20 mV voltaj uygulanmaktadır (RMS). Hücrelerin yokluğunda, hücre kültürü ortamının iyon içeriği empedans sağlar.

Hücrelerin varlığında, elektrotlara bağlı hücreler empedans artışına neden olur. Elektrotlar üzerindeki hücre sayısı arttıkça empedans değeri de artar. RTCA yazılımı, ortalama değerler, maksimum ve minimum değerler, standart sapma (SD), konsantrasyonun yarı etkisi (EC50), konsantrasyonun yarı maksimum inhibisyonu (IC50), hücre indeksi (CI) ve grafiklerle ilgili parametrelerin elde edilmesini sağlar (Roche Applied Science ve ACEA Biosciences, 2008; Kaya vd., 2016).

Hücreler yeterince çoğaldığında, canlılığının belirlenmesi için Cedex cihazında hücreler sayılmıştır. Çalışmada kullanılacak E-plakalara önce 100 µl besiyeri eklenmiş ve cihazda ilk okuma alındıktan sonra E-plakalar cihazdan çıkarılıp 100 µl besiyeri üzerine 100 µl içinde 10.000/kuyucuk hücre ekilmiştir. 30 dakika steril kabinde bekletilen plakalar daha sonra cihaza yerleştirilmiş ve saatte 1 ölçüm alacak şekilde cihaz programlandıktan sonra deney başlatılmıştır. U87MG hücreleri belirli bir hücre indeks değerine ulaşınca cihaz durdurulmuş ve hücre-besiyeri karışımından 100 µl çekilip atılmıştır. Hazırlanan motesanib konsantrasyonları (40, 20, 10 µM) E-plaka kuyucuklarına 100 µl medyum içinde uygulanmış (2x konsantrasyon olarak) ve program kaldığı yerden devam ettirilmiştir. RTCA-DP ile elde edilen hücre indeks değerlerine göre motesanibin IC50 değeri RTCA-DP Software 1.2.1 programı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.9. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA-DP) ile HUVEC Hücrelerinde Motesanib'in Hücre Migrasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

Migrasyon çalışması için de CIM plaka kullanılmaktadır. CIM plaka, migrasyon yeteneği olan hücrelere geçiş olanağı sağlayan iki odacıklı bir düzendir. Üst odacığın tabanı mikro gözenekli bir membran yapısındadır. Hücreler üst odacığa serum içermeyen besiyeri içerisinde ekilirler. Alt odacıkta serumlu besiyeri yer almaktadır ve hücrelerin membranı geçerek serumlu besiyerine ulaşmaları hedeflenmektedir. Migrasyonu hızlı olan hücreler daha çok alt odacığa geçerek çoğalırlar ve geçiş sırasında cihaz tarafından sinyal alınır. Migrasyona uğramayan hücreler ise üst odacıkta kalırlar ve sinyal alımı olmaz (Şekil 3.2). Migrasyon çalışması için CIM plakanın alt odacığına 160 µl serumlu medyum eklenmiş ve üst odacık ile alt odacık birleştirilmiştir. Daha sonra üst odacıklara 20 µl serumsuz medyum eklenmiş ve CIM plaka 1 saatliğine 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 1 saatlik inkübasyondan sonra cihazdan ilk ölçümler alınmış ve her kuyuya 100 µl serumsuz besiyeri içerisinde 2×10^4 hücre/kuyu olacak

şekilde HUVEC hücreleri ekilmiştir. Hücrelerin üzerine belirli kuyucuklara olacak şekilde motesanib konsantrasyonları (40, 20, 10 μ M) uygulanmıştır. Uygulama sonrasında CIM plaka cihaza yerleştirilmiş ve 72 saat boyunca her 10 dakikada bir ölçüm alacak şekilde programlanarak analiz başlatılmıştır. Cihazda elde edilen hücre indeksi değerlerine göre, RTCA DP cihazından alınan migrasyon analizi grafiği çizilmiştir.



Şekil 3. 2. İnvazyon ve migrasyon çalışmalarında kullanılan 16 kuyucuklu CIM plaka (<https://www.ols-bio.com/xcelligence-r-rtca-esight>)

3.10. HUVEC Hücrelerinde Motesanib'in Migrasyona Etkilerinin Morfolojik Değerlendirilmesi

Nöroinflamasyon ortamında HUVEC hücre migrasyonunu, görsel olarak da belirlemek amacıyla The Oris™ Cell Migration ölçüm kiti kullanılarak çalışılmıştır. Kit içerisinde, hücre ekimi yapılırken 96'lık kuyucukların hepsinde aynı orta noktanın boş kalabilmesini sağlayan Oris™ Cell Seeding Stoppers ile birlikte gelen özel bir plaka bulunmaktadır. Ekim yapıp stopperlar yine kitin içerisinde yer alan Oris™ Stopper Tool isimli özel bir tarak ile çıkarıldıktan sonra, her kuyucuk hücrelerin göç edebileceği eşit bir alana sahip olmaktadır. Boş alana göç eden hücrelere göre migrasyon analizi yapılır. HUVEC hücreleri flasktan kaldırılmış ve Cedex XS cihazı ile hücre sayımı yapılmıştır. Hücreler %1 FBS içeren farklılaşma besiyeri içerisinde her kuyucukta 5×10^4 hücre/mL olacak şekilde 100 μ l besiyeri içinde 96'lık özel plakaya stopperın kenarından ekilmiştir. Yaklaşık 24 saat boyunca hücrelerin plaka tabanına yapışması beklendikten sonra stopperlar Oris™ Stopper Tool yardımıyla dikkatlice plakadan çıkarıldı. Besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve Kontrol (%0.2 DMSO), motesanib (20, 40 μ M) ve Diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombinasyon konsantrasyonlarının (20+200; 40+200 μ M) HUVEC hücrelerine, LPS ile 6 saat uyarılmış THP-1 hücrelerin

medyumu içinde uygun kuyucuklara dağıtıldı. Daha sonra plaka 48 saatlik inkübasyona bırakıldı ve süre sonunda kuyuların fotoğraf çekimleri. Gruplara ait fotoğraf görüntüleri bulgular kısmında verilmiştir.

3.11. Apoptotik Ve Antiinflamatuvar Etkinin Belirlenmesi İçin U87MG-THP-1 Kokültür Modelinin Oluşturulması

Nöroinflamasyon modeli oluşturularak Apoptotik ve Antiinflamatuvar etkilerin araştırılması için U87MG-THP-1 monosit kokültür modeli ile çalışılmıştır.

Ko-kültür çalışmalarında 2 hücrenin aynı ortamda yaşayabilmesi için alt ve üst odacıkları birbirinden ayıran 0.4 µm çapta gözenekleri bulunan bir zar içeren özel ko-kültür plakaları kullanılmıştır. Alt odacığa U87MG hücreleri ve üst odacığa THP-1 monosit hücreleri belirli sayılarda ekimi yapılarak ko-kültür modeli oluşturulmuştur. Deneyler 24 kuyucuklu ko-kültür plakası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneylerde paralelliğin sağlanması için; her deneyde alt odacığa ekilmiş olan U87MG hücre sayısının 5 katı miktarda THP-1 hücresi üst odacığa ekilmiştir.

U87MG hücreleri, 24 kuyucuklu plakaya besiyeri ortamında hücre 2×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler %5 CO₂, 37°C’de inkübatörde kültüre edilmiştir 24 saat inkübasyona bırakılarak zemine tutunmaları sağlanmıştır. Aynı bir şekilde insert (üst kuyucuk) plakaya THP-1 hücre sayısı 10^6 olarak ekilmiş ve 2 uL LPS ile inflamasyon için hücreler uyarılmış ve 6 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra plakadaki U87MG hücrelerine Motesanib (20, 40 µM) ve Diklofenak dietilamin (200µM) ve kombinasyon konsantrasyonları (20+200; 40+200 µM) uygulanmıştır. Daha sonra THP-1 içeren üst plaka, U87MG hücrelerini içeren alt plaka ile birleştirilerek ko-kültür ortamı elde edilmiş ve ko-kültür plakası 48 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

Deney grupları aşağıdaki gibi oluşturulmuştur.

- ✓ Kontrol grubu: U87
- ✓ Kontrol grubu: U87 + THP-1 (LPS)
- ✓ U87MG + 200DF + THP-1 (LPS)
- ✓ U87MG + 20M + THP-1 (LPS)
- ✓ U87MG + 40M + THP-1 (LPS)
- ✓ U87MG + 20M + 200D + THP-1 (LPS)

- ✓ U87MG + 40M + 200D + THP-1 (LPS)
- ✓ THP-1 (LPS)

Lipopolisakkaritler (LPS'ler) Gram-negatif bakterilerin hücre duvarının karakteristik bileşenleridir. Çalışmamızda liyofilize hale bulunan LPS (Katolog No: L4391, Sigma) Steril PCR grade su ile çözülerek 500 µg/mL konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok, aliquatlanarak -20°C'de saklanmıştır. Stok solüsyondan, kültür medyumunda çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak, gerekli deney konsantrasyonları taze olarak hazırlanmıştır.

LPS çözeltisi için, 1 ml çözeltide 100 ng LPS kullanılmıştır. Her kuyucuk başına 2 µl LPS kullanılmış ve 6 saat inkübasyon süresine bırakılmıştır. Ko-kültür plakları bu şekilde hazırlanmıştır.

İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, her kuyucuktan alınan besiyeri madde ile birlikte flakonlara boşaltılmış ve yapışan hücreler kaldırılmıştır. Ardından santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası, üstteki sıvı uzaklaştırılmış ve 500 µl PBS eklenerek hücreler tekrar santrifüj edilmiştir. Elde edilen örnekler kit protokollerine göre çalışılarak, hücre akış sitometri cihazı kullanılarak ölçümler yapılmıştır.

3.12. Akış Sitometride Annexin V-PI Yöntemi İle Apoptotik Etkinin Belirlenmesi

Flow sitometre lazer kaynaklı florometre ile parçacık ışık yayılımı analizi bileşiminden oluşur. Flow sitometrede farklı moleküller, hücreler ve parçacıklar, düşük ve dik açılı ışık yayılımı kullanılarak büyüklük ve şekil olarak ayrılabilir. Bu hücreler, moleküller veya parçacıklar özel floresan işaretleyicilerle veya boya işaretli antikorlarla işaretlenebilir. Flow sitometri yardımıyla, floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozun belirlenmesi açısından kullanışlıdır (Güleş ve Eren, 2008).

Floresan mikroskopi çalışmaları, hücre kültürü çalışmasında kullanıldığında, canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanır. Bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozla veya nekroz ile ölüp ölmediklerinin ayırımı, nükleus morfolojisine bakılarak yapılır. Membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) canlı hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde

bulunmamaktadır. Apoptotik hücrelerde hücre zarında meydana gelen değişiklikler ile birlikte hücre apoptoza giderse; sağlıklı hücre zarlarının iç kısmında bulunan fosfatidilserinler hücre zarının dış yüzüne transloke olarak hücrenin dış kısmına çıkmaktadır. Bu translokasyon, hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde gerçekleşir. Hücre membranının dış yüzeyine yerleşen PS'ye bağlanan Annexin-V, floresan bir maddeyle işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilmektedir. Propidyum iyodid (PI) ise, çift sarmallı RNA ya da DNA'ya bağlanmasından dolayı membran yapısı bozulduğu geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin tespitinde kullanılmaktadır (Zhang vd., 1997; Kopman vd., 1994; Gatti vd., 1998). Annexin V-FITC (green fluorescence- Floresan izotiyosiyanat) ve non-vital boya olan propidium iodide (red fluorescence) ile aynı zamanda boyanan hücreler, canlı hücreler (Annexin V - /PI-), erken apoptotik hücreler (Annexin V+ / PI -), geç apoptotik hücreler (Annexin V+ / PI +) ve nekrotik hücrelerin (Annexin V- /PI +) birbirinden ayırt edilmesine izin verir (Dikmen, 2017; Overbeeke vd., 1998).

Bu çalışmada apoptotik etkinin belirlenmesi amacıyla Annexin-V Apoptosis Detection Kit (Katolog no: 556547, BD) kullanılmış ve kit protokolü uygulanmıştır. Çalışmada yukarıda açıklanan ko-kültür deney seti oluşturulmuştur. 48 saat boyunca ko-kültür hücre gruplarından, U87MG hücreleri, tripsinizasyon ile hızlıca kaldırılarak toplanmış ve 1200 rpm'de 5 dk sentrifüj edildikten sonra supernatant ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Kalan hücre peleti 2 ml soğuk PBS ile iki kez yıkanmıştır. Daha sonra kalan pellet 100 µl PBS ile tekrardan suspanse edilerek ependorfa alınmıştır. Aynı bir ependorfa 5 µl Annexin V ve 5 µl PI karşılıklı olarak ilave edildikten sonra resüspanse edilen hücreler eklenmiştir. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 20 dk inkübasyonun sonunda tüplere 250 µl "Annexin V bağlama tamponu" ilave edilerek 30 dk içinde grupların apoptotik okumaları akış sitometri cihazı (Accuri C6, BD) ile yapılmıştır.

3.13. Akış Sitometride Kaspaz-3 Aktivasyonunun Belirlenmesi

Kaspazlar gerek mitokondriyal apoptozda, gerekse ölüm reseptörleri yolunda rolü olan proteazlardır (Kaufmann ve Hengartner, 2001). Kaspaz-3; kaspaz-8 ve kaspaz-9 ile etkileşim halindedir. Kaspaz-3, pek çok proteinin spesifik yıkılımdan sorumlu olan bir ölüm proteaz enzimidir. Kaspaz-3, apoptoz mekanizmasında yer alan kaspazlardan olup hem dışsal (apoptotik) hem de içsel (mitokondriyal) apoptotik yolak üzerinden aktive edilmektedir. Kaspaz-3, kromatin kondensasyonundan, DNA

fragmentasyonundan ve hücre iskeletine ait proteinlerin yıkımından sorumludur. Bu nedenle bir hücrede apoptozun varlığının en önemli göstergelerinden biri, ilgili hücrede kaspaz-3 enzim aktivitesinin belirlenmesidir (Slee vd., 2001; Engür vd., 2016).

Çalışmamızda kaspaz-3 aktivitesi akım sitometri yöntemi ile değerlendirilmiştir. Kaspaz-3 aktivitesini tespit etmek için ilgili kitin (PE Active Caspase-3 Apoptosis Kiti, Katalog no: 550914, BD) protokolü uygulanmıştır. 48 saat boyunca inkübe edilen ko-kültür hücre gruplarından U87MG hücreleri tripsin ile kaldırılmış ve 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kalan hücre peleti soğuk PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra tüplerdeki süpernatant dökülmüş ve pelletin üzerine hücrelerin geçirgenliğini sağlamak ve fikse etmek amacıyla, 500 µL cytofix/cytoperm solüsyonu eklenerek 20 dk buzun içinde bekletilmiştir. Daha sonra 1250 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve pellet 500 µL “perm wash” ile 2 kez yıkanmıştır. Son yıkamanın ardından hücre pelleti 50 µL perm wash ile resüspanse edildikten sonra 10 µL antibody (PE Rabbit Anti kaspaz-3) eklenerek oda ısısında 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra her bir tüpe 1000 µL perm wash eklenerek santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmasını takiben herbir örneğin pelleti 350 µL perm wash ile flow tüpüne aktarılmış ve akış sitometri cihazında (BD Accuri C6) tüpler okutularak analiz edilmiştir (Engür Öztürk, 2020; Dikmen, 2017; Gökhaner, 2018).

3.14. Mitokondriyal Membran Potansiyeli (JC-1)'nin Belirlenmesi

Apoptozda, mitokondriyal disfonksiyonu belirleyen iki ana faktör tanımlanmıştır: membran potansiyelinin kaybı ve mitokondriyal membran geçirgenliğindeki değişiklikler (Chen vd., 2008). Mitokondriyal membran potansiyelini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir boya olan JC-1 (5,5', 6,6'-tetrahidrokloro-1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolilkarbosiyanin iyodür) kullanılır. JC-1, voltaj duyarlı, katyonik bir boyadır. JC-1, hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelini ölçmeye yardımcı olarak, mitokondriyal membranın polarizasyon durumunu gösterir (Engür Öztürk, 2020; Iijima, 2006). Mitokondriyal membran potansiyelinin kaybı, apoptozun önemli bir göstergesi olarak bilinmektedir (Yao vd., 2007).

Hücrelerde mitokondriyal membran bütünlüğünü tespit etmek için, bir mitokondriyal membran potansiyel testi kiti (Katalog no: 551302, BD) kullanılmıştır. Çalışma için, bölüm 3.14'te açıklanan ko-kültür deneysel düzenekleri oluşturulmuştur. 48 saatlik inkübasyonun ardından, U87MG hücreleri, tripsinizasyon ile hızla kaldırılmış, ardından

1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Kitin bileşenleri protokole göre her tüpe eklenmiş ve oluşan çözelti tüplere eklenerek 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, hücreler kitten alınan 1000 µL Assay Solution ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından hücreler, 250 µL Assay Solution içinde yeniden süspansiyona edilerek akış sitometrisi (Accuri C6, BD) kullanılarak analiz edilmiştir.

3.15. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Düzeyinin Belirlenmesi

Hücre geçirgen reaktif DCFDA, hücre içindeki hidroksil, peroksil ve diğer ROS aktivitesini ölçmek için kullanılan bir florojenik boyadır. Hücreye girdikten sonra DCFDA, hücresel esterase tarafından deasetillenir ve daha sonra ROS tarafından DCF'ye oksitlenen, yüksek floresanlı, sırasıyla 495 nm ve 529 nm'de maksimum uyarılma ve emisyon spektrumlarına sahip bir bileşik üretir (Juarez-Moreno vd., 2017). DCFDA deney protokolü, DCFDA / H₂DCFDA / DCFH-DA / DCFH'nin hücreye difüzyonuna dayanır. Daha sonra hücresel esterase tarafından floresan olmayan bir bileşiğe deasetillenir ve bu daha sonra ROS tarafından 2', 7' diklorofloresin (DCF)'e oksitlenir. DCF oldukça floresandır ve 485 nm / 535 nm'de uyarılma / emisyon ile floresan spektroskopisi ile tespit edilir.

Hücreler aerobik metabolizma sırasında sürekli olarak reaktif oksijen türleri (ROS) üretir. ROS üretimi bağışıklık sisteminde önemli bir koruyucu ve işlevsel rol oynar. Hücre, aşırı ROS üretimiyle mücadele etmek için güçlü bir antioksidan savunma sistemiyle donatılmıştır. Oksidatif stres, ROS üretimi hücrelerin doğal antioksidan savunmalarını alt ettiğinde hücrelerde meydana gelir. ROS ve oksidatif hasarın kanser, ateroskleroz, diğer nörodejeneratif hastalıklar ve diyabet dahil olmak üzere birçok insan hastalığında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bu nedenle, kesin rollerini belirlemek, ROS'u ve neden oldukları oksidatif hasarı doğru bir şekilde ölçme yeteneğini gerektirir. Hücrelerdeki serbest radikal üretimini ölçmek için birçok yöntem vardır. En basit teknikler hücre geçirgen floresan ve kemilüminesan problemleri kullanır. 2'-7'-Diklorodihidrofluorescein diasetat (DCFH-DA), bir hücrenin redoks durumunu doğrudan ölçmek için en yaygın kullanılan tekniklerden biridir. Geliştirilen diğer tekniklere göre birkaç avantajı vardır. Kullanımı oldukça kolaydır, hücrenin redoks durumundaki değişikliklere karşı son derece hassastır, ucuzdur ve zaman içinde ROS'taki değişiklikleri izlemek için kullanılabilir.

Bu tez çalışmasında ROS düzeyi, Abcam'dan DCFDA Acellular ROS detection assay kiti (ab113851) kullanılarak akış sitometri cihazında okunarak analiz edilmiştir. Çalışmada ko-kültür deney seti oluşturularak madde konsantrasyonları uygulanmıştır. 48 saatlik inkübasyon sonunda ko-kültür hücre gruplarından, U87MG hücreleri, tripsinizasyon ile hızlıca kaldırılarak toplanmış ve 1200 rpm'de 5 dk satrifüj edildikten sonra supernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kalan hücre peleti 2 ml soğuk PBS ile iki kez yıkanmıştır. Daha sonra her bir gruba ait pellet 100 µl PBS ile tekrardan süspanse edilerek, hücreler DCFDA antikoru ile karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dk inkübasyonuna bırakılmış ve süre sonunda ROS düzeyleri akış sitometri cihazı (Accuri C6, BD) ile okuma yapılmış ve analiz edilmiştir (Kisselev vd., 2017; Palit vd., 2015 ; Mousavi vd., 2009).

3.16. COX-2 Düzeyinin Belirlenmesi

COX2 düzeyi, COX2 Monoclonal Antibody (COX 229), PE, eBioscience™, Invitrogen Antibody kit protokolüne göre analiz edilmiştir.

Ko-kültür ortamından inkübasyon süreleri sonunda U87MG hücreleri üzerindeki süpernatant ve U87MG hücreleri kaldırılarak toplanmıştır. Örnekler ve 1250 rpm'de 5 dk satrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Kalan hücre peleti 2 kez 2 ml soğuk PBS ile yıkanmıştır. Son yıkamayı takiben kalan hücre pelleti PBS ile süspanse edilmiştir ve deney grupları için ayrı ependorflar kullanılmıştır. COX2 monoklonal antikordan (COX2 Monoclonal Antibody (COX 229), PE, eBioscience™, Invitrogen) ependoflara 5 µL konulup, üzerine 100 µl PBS ile resüspanse hücre eklenmiştir. 20 dakika'lık inkübasyonun ardından akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) okunarak analiz edilmiştir.

3.17. Akış Sitometride Sitokin (IL-1 β, TNF- α, IL-6, IL-8 ve IL-10) Düzeylerinin Belirlenmesi

Flow sitometre lazer kaynaklı florometre ile parçacık ışık yayılımı analizi bileşiminden oluşur. Flow sitometrede farklı moleküller, parçacıklar ve hücreler, düşük ve dik açılı ışık yayılımı kullanılarak şekil ve büyüklük olarak ayrılabilir. Bu hücreler, parçacıklar veya moleküller özel floresan işaretleyicilerle yada boya işaretli antikorlarla işaretlenebilir (Güleş ve Eren, 2008).

Nöroinflamasyon oluşturulmuş U87MG-THP1 kokültür ortamında motesanib (20, 40 µM) ve Diklofenak dietilamin (200µM) ve kombinasyon konsantrasyonlarının (20+200;

40+200 μ M) U87MG hücrelerinde sitokinlerin seviyeleri, uygun kit protokolleri uygulanarak akım sitometride ölçülmüştür. Çalışmada oluşturulan ko-kültür deney druplarına ait U87MG hücrleri 48 saat inkübasyondan sonra, tripsinizasyon ile hızlıca kaldırılarak toplanmış ve 1250 rpm'de 5 dk satrifüje edildikten sonra süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süpernatantlardan TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 ve IL-10 sitokin seviyeleri flow sitometri yöntemi kullanılarak belirlenerek analiz edilmiştir (Engür Öztürk, 2020; Klück vd., 2021).

3.17.1. İnterlökin 1-beta (IL-1 β) sitokin analizi

IL-1 β seviyelerinin tespiti için PE Anti-Human IL-1 β Antibody Kit protokolü uygulanmıştır. İnterlökin-1 beta (IL-1 β), kansere bağlı kronik inflamasyonun temel sitokinlerinden biridir (Crusz vd., 2015).

Hücrelerde IL-1 β seviyelerini belirlemek için antikora uygun olan fiksasyon ve permeabilizasyon protokolü uygulanmıştır. Çalışma FITC anti-human IL-1 β Antibody (Katalog No: 508206) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Ko-kültür ortamından inkübasyon süreleri sonunda U87MG hücreleri kaldırılarak toplanmış ve 1250 rpm'de 5 dk satrifüj edildikten sonra süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin fiksasyon ve permeabilizasyonu amacıyla 500 μ l cytofix/cytoperm solüsyonu (Katalog no: 550914, BD) eklenerek tüpler 20 dk buz içinde bekletilmiştir. Daha sonra 1250 rpm de 5 dk santrifüj edilmiş ve pellet 500 μ l PBS ile 2 kez yıkanmıştır. Son yıkamayı takiben hücre pelleti PBS içinde 5 μ l antibody ile 30 dakikalık inkübe edilmiş ve PBS ile yıkama yapıldıktan sonra örnekler akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) okutularak analiz edilmiştir.

3.17.2. TNF- α , IL-6, IL-8 ve IL-10 sitokin analizleri

Antiinflamatuvar etkileri değerlendirmek için, ko-kültür ortamından inkübasyon sonunda toplanan U87-MG hücre süpernatantlarından sitokin (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10) seviyeleri ilgili kitlerin protokolleri uygulanarak akış sitometri yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada PE anti-human TNF- α (Beckman Coulter LOT:200049), PE anti-human IL-6 (Invitrogen LOT:2489227), PE anti-human IL-8 (Invitrogen LOT:2489227) ve PE anti-human IL-10 (Invitrogen LOT: 2265361) kiti kullanılmıştır (Engür Öztürk, 2020).

Ko-kültür ortamından inkübasyon süreleri sonunda U87MG hücreleri üzerindeki

süpernatant ve U87MG hücreleri kaldırılarak toplanmıştır. Örnekler ve 1250 rpm’de 5 dk satrifüj edilmiş, süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kalan hücre peleti 2 kez 2 ml soğuk PBS ile yıkanmıştır. Son yıkamayı takiben kalan hücre pelleti PBS ile tekrar suspanse edilerek sitokin ölçümlerinde kullanılmıştır. Her sitokin ve deney grupları için ayrı ependorflar kullanılmıştır. Sitokinlerin ölçümü için (TNF- α , IL-6, IL-8 ve IL-10), antikorlardan ayrı ependoflara 5 μ L konulup, üzerine 100 μ l PBS ile resüspanse hücre eklenmiştir. 20 dakika’lık inkübasyonun ardından akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) okunarak analiz edilmiştir (Engür Öztürk, 2020).

3.18. İstatistiksel Değerlendirmeler

Veriler Microsoft Office Excel’de hesaplanarak oluşturulmuştur. Absorbans değerlerine göre % canlılık oranları Excel formülü ile hesaplanmıştır. İstatistiksel analizler Graphpad Prism 9 yazılım programında gerçekleştirilmiştir. Analizlerde hücre kontrol grubunun canlılık değeri %100 kabul edilmiş olup bu değer üzerinden diğer kuyucukların % canlılık verileri hesaplanmıştır (n=8). Ortalama $\pm$ standart sapma (Ort $\pm$ SS) değerleri hesaplanıp, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post-hoc (Tukey) testi kullanılmıştır. Anlamlılık değerleri; $p>0.05$ fark yok, $p<0.05^*$ fark var, $p<0.01^{**}$ önemli derecede fark var, $p<0.001^{***}$ çok önemli derecede fark var, $****p<0.0001$ çok çok önemli derecede fark var olarak değerlendirilmiştir.

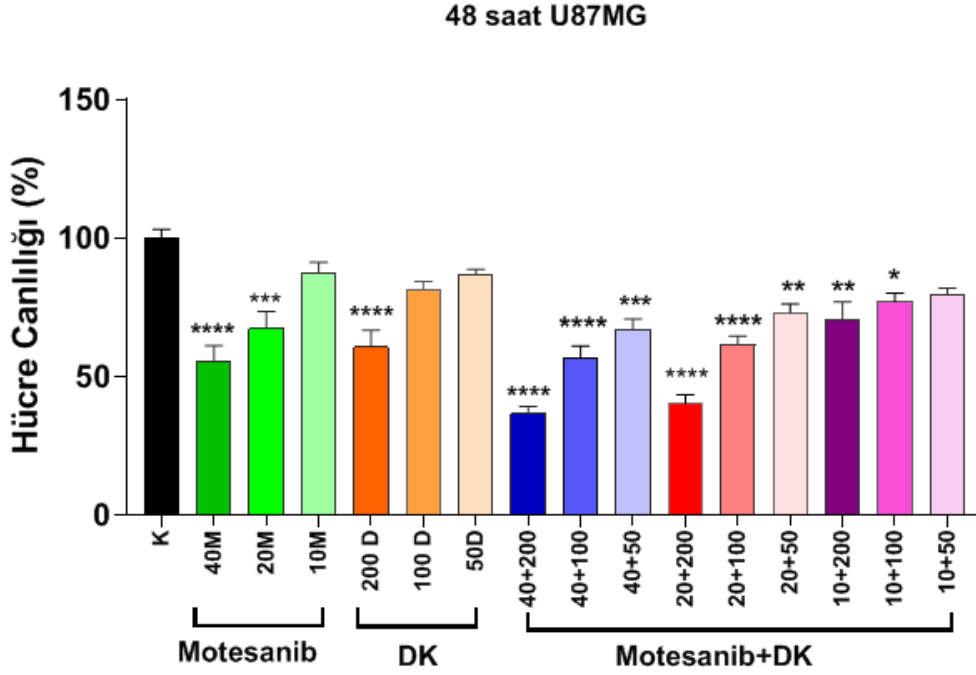
3.19. Etik Bildirim

Bu çalışma için etik kurul izni gerekmemektedir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Motesanib, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının U87MG, HUVEC ve THP-1 Hücrelerinde Sitotoksik Etkilerinin MTT Yöntemi ile Değerlendirilmesi

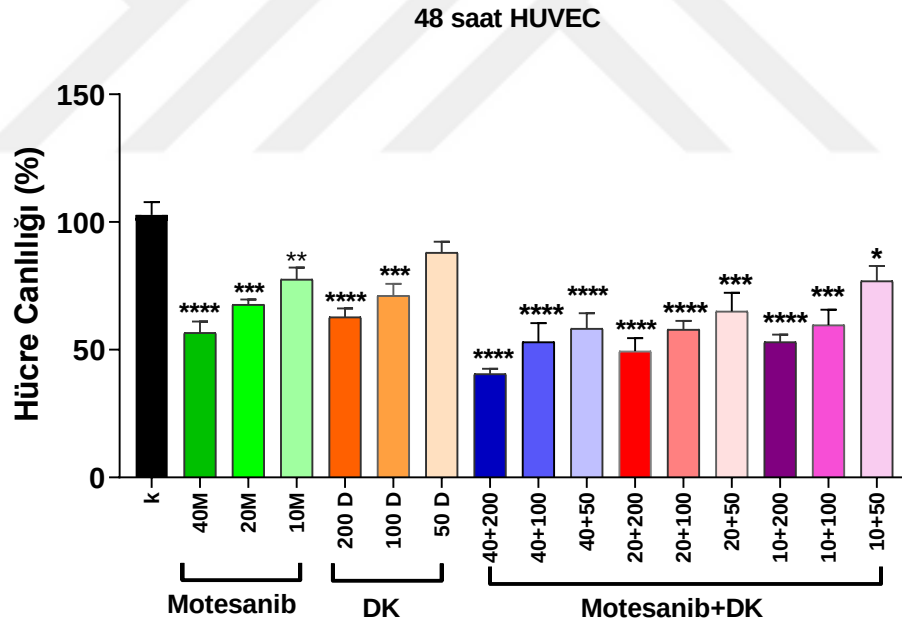


Şekil 4. 1. Motesanib, Diklofenak dietilamin (DK) ve kombine konsantrasyonlarının, U87MG Hücre Hattında 48. saat % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi (Ortalama $\pm$ Standart hata)

MTT sonuçlarımıza göre, U87MG hücrelerinde 48. saatte sadece motesanib uygulanan (40, 20, 10 μ M) gruplarda % hücre canlılık oranları sırasıyla %55.65, %67.49 ve %87.55, olarak belirlenmiştir. Kontrole göre 40 μ M ve 20 μ M sadece motesanib uygulanan gruplarındaki hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (**** p <0.0001 ve *** p <0.001). Diklofenak dietilamin konsantrasyonları (200, 100 ve 50 μ M) uygulanan gruplarda da sırasıyla % hücre canlılık oranları %60.72, %81.26 ve %86.64 olarak belirlenmiştir. Kontrole göre 200 μ M diklofenak dietilamin gruplarındaki hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmuştur (**** p <0.0001). Motesanib ve diklofenak dietilamin kombine uygulanan 40M+200DK, 40M+100DK, 40M+50DK gruplarda sırası ile U87MG % hücre canlılığı %36.57, %56.86, %67.06 olup, istatistiksel olarak kontrole göre hücre canlılıklarındaki

azalma tüm gruplarda anlamlı (**** $p < 0.0001$, **** $p < 0.0001$ ve *** $p < 0.001$). Kombine uygulanan 20M+200DK, 20M+100DK, 20M+50DK gruplarında hücre canlılıkları sırasıyla %40.27, %61.50, %73.18 olup kontrole göre hücre canlılıklarındaki azalma istatistiksel olarak sırasıyla **** $p < 0.0001$, **** $p < 0.0001$ ve ** $p < 0.01$ olarak anlamlı bulunmuştur. 10M+200DK, 10M+100DK, 10M+50DK kombine gruplarında da hücre canlılıkları sırasıyla % 70.41, %77.01 ve %79.41 olarak belirlenmiş olup, kontrol grubuna göre 10M+200DK, 10M+100DK gruplarda belirlenen hücre canlılığı azalışları istatistiksel olarak anlamlı olarak belirlenmiştir (** $p < 0.01$ ve * $p < 0.05$) (Şekil 4.1).

Şekil 4.1’de görüldüğü gibi kontrole göre yüksek konsantrasyonlar olan motesanib 40 ve 20 μ M da ve 200 μ M diklofenak dietilamin gruplarında önemli sitotoksik etki olduğu belirlenmiştir. Kombine uygulanan gruplardan da kontrole göre en fazla 20M+200DK ve 40M+200DK konsantrasyonlarında U87MG hücreleri üzerinde sitotoksik etki olduğu görülmektedir.



Şekil 4. 2. Motesanib, Diklofenak dietilamin (DK) ve kombine konsantrasyonlarının, HUVEC Hücre Hattında 48. saat % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi (Ortalama $\pm$ Standart hata).

MTT sonuçlarımıza göre, HUVEC hücrelerinde 48. saatte sadece motesanib uygulanan (40, 20, 10 μ M) gruplarda % hücre canlılık oranları sırasıyla % 56.68, 67.69 ve 77.52

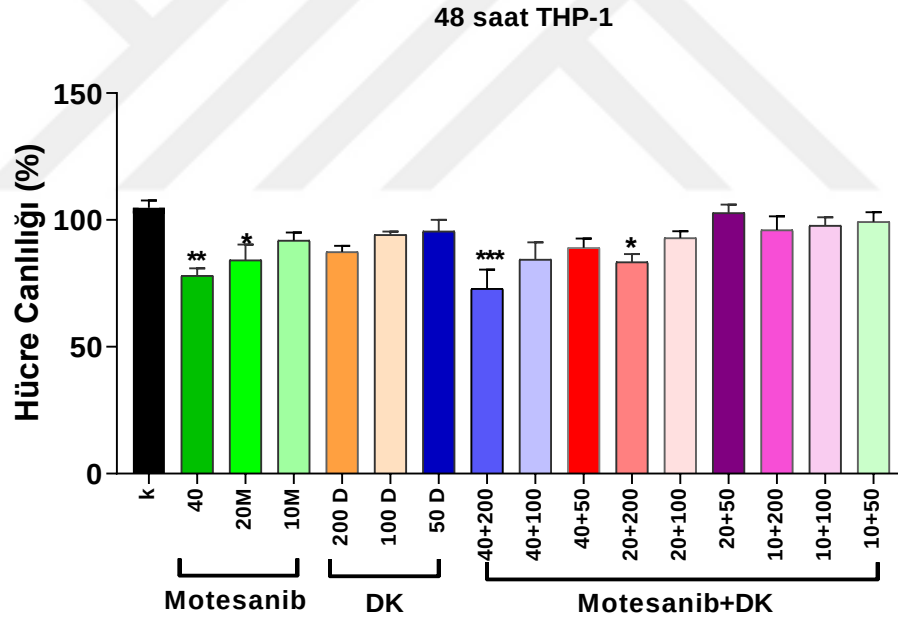
olarak belirlenmiştir. Kontrole göre tüm tekli motesanib uygulanan gruplarındaki hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (****p < 0.0001, ***p < 0.001 ve **p < 0.01). Diklofenak dietilamin konsantrasyonları (200, 100 ve 50 µM) uygulanan gruplarda da sırasıyla % hücre canlılık oranları % 62.83, 71.14 ve 88.05 olarak belirlenmiştir. Kontrole göre 200 ve 100 µM diklofenak dietilamin gruplarındaki hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmuştur (****p<0.0001 ve ***p<0.001). Motesanib ve diklofenak dietilamin kombine uygulanan 40M+200DK, 40M+100DK, 40M+50DK gruplarda sırası ile HUVEC % hücre canlılığı %40.52, 53.08 ve 58.34 olup, istatistiksel olarak kontrole göre hücre canlılıklarındaki azalma tüm gruplarda anlamlı olarak analiz edilmiştir (****p<0.0001). Kombine uygulanan 20M+200DK, 20M+100DK, 20M+50DK gruplarında hücre canlılıkları sırasıyla %49.46, 58.00 ve 65.05 olup kontrole göre hücre canlılıklarındaki azalma istatistiksel olarak sırasıyla ****p < 0.0001 , ****p < 0.0001 ve ***p< 0.001 olarak anlamlı bulunmuştur. 10M+200DK, 10M+100DK, 10M+50DK kombine gruplarında da hücre canlılıkları sırasıyla % 53.03, 59.63 ve 76.91olarak belirlenmiş olup, kontrol grubuna göre hücre canlılığı azalışları istatistiksel olarak anlamlı olarak belirlenmiştir (****p< 0.0001, ***p< 0.001 ve *p< 0.05) (Şekil 4.2).

Şekil 4.2’de görüldüğü gibi kontrole göre en yüksek hücre canlılığındaki azalmalar 40 ve 20 µM motesanib; 200 µM diklofenak dietilamin; 20M+200DK ve 40M+200DK gruplarında belirlenmiş olup, bu konsantrasyonlar HUVEC hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon sonunda önemli sitotoksik etkiler meydana getirmiştir.

U87MG ve HUVEC hücrelerinde maddelerin 48 saatlik inkübasyonu sonucu MTT sonuçlarına göre hesaplanan % canlılık değerleri, %100 den çıkarılarak % hücre inhibisyon değerleri hesaplanarak Tablo 4.1 de verilmiştir.

Tablo 4. 1. U87MG ve HUVEC hücrelerinde MTT sonuçlarına göre hesaplanan %İnhibisyon değerleri

Konsantrasyonlar (µM) 48.saat	U87MG hücrelerinde % inhibisyon	HUVEC hücrelerinde % inhibisyon
40M	44.35	43.32
20M	32.51	32.51
10M	12.45	22.48
200 DK	39.28	37.18
100 DK	18.74	28.86
50 DK	13.36	11.95
40 M+200 DK	63.43	59.48
40 M+100 DK	43.14	46.92
40 M+50 DK	32.94	41.66
20 M+200 DK	38.48	50.54
20 M+100 DK	33.5	42.00
20 M+50 DK	26.82	34.95
10 M+200 DK	29.59	46.97
10 M+100 DK	22.99	40.37
10 M+50 DK	23.09	23.09



Şekil 4. 3. Motesanib, Diklofenak dietilamin (DK) ve kombine konsantrasyonlarının, THP-1 Hücre Hattında 48. saat % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi (Ortalama ± Standart hata).

Daha sonraki tez deneylerinde kokültür çalışması yapılacağı için Motesanib ve diklofenak dietilamin konsantrasyonlarının THP-1 monosit hücrelerindeki sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir. MTT sonuçlarımıza göre, THP-1

hücrelerinde 48. saatte sadece motesanib uygulanan (40, 20, 10 µM) gruplarda % hücre canlılık oranları sırasıyla % 78.03, 84.21 ve 91.88 olarak belirlenmiştir. Kontrole göre 40 ve 20µM motesanib uygulanan gruplarındaki hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (**p<0.01,*p<0.05). Diklofenak dietilamin konsantrasyonları (200, 100 ve 50 µM) uygulanan gruplarda da sırasıyla % hücre canlılık oranları % 87.41, 94.19 ve 95.61 olarak belirlenmiş olup kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Motesanib ve diklofenak dietilamin kombine uygulanan 40M+200DK, 40M+100DK, 40M+50DK gruplarında sırası ile THP-1 % hücre canlılığı % 72.94, 84,47 ve 89.10 olup, istatistiksel olarak kontrole göre sadece 40M+200DK grubundaki hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı olarak belirlenmiştir (***p<0.0001). Kombine uygulanan 20M+200DK, 20M+100DK, 20M+50DK gruplarında hücre canlılıkları sırasıyla %83.41, 92.94 ve 102.8 olup kontrole göre 20M+200DK hücre canlılığındaki azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (*p<0.05) olarak anlamlı bulunmuştur. 10M+200DK, 10M+100DK, 10M+50DK gruplarında da hücre canlılıkları sırasıyla % 96.06, 97.77 ve 99.30 olarak belirlenmiş olup, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.3).

U87MG ve HUVEC hücrelerindeki sitotoksik etkiler kadar önemli olmasa da Şekil 4.3’de görüldüğü gibi kontrole göre en fazla sitotoksik etkiler 40 ve 20 µM motesanib ile 20M+200DK ve 40M+200DK kombine gruplarında meydana getirmiştir.

4.1.2. Motesanib (40, 20, 10 µM) ve diklofenak dietilamin (200, 100, 50 µM) kombinasyonlarının U87MG Ve HUVEC hücrelerinde sinerjistik, additif ve antagonist etkilerinin değerlendirilmesi

Motesanib (40, 20, 10 µM) ve Diklofenak dietilamin (200, 100, 50 µM)’in U87MG ve HUVEC hücreleri üzerinde antagonist/sinerjistik etkileşimleri CDI formülüne göre, MTT absorbans sonuçlarının % hücre canlılık değerlerine dönüştürülerek İlaç etkileşim katsayısı (CDI) hesaplanmış ve değerlendirilmiştir. Buna göre;

$$CDI = \frac{\text{Kombin (X+Y) \% Hücre Canlılığı}}{\text{X \% Hücre Canlılığı} \times \text{Y \% Hücre Canlılığı}} \times 100$$

$$X \% \text{ Hücre Canlılığı} \times Y \% \text{ Hücre Canlılığı}$$

kontrol grubu %100 kabul edilerek CDI formülüne göre yapılan hesaplamada, CDI < 1 olması durumunda sinerjistik etki, CDI < 0.7 olması durumunda kuvvetli sinerjistik etki,

CDI = 1 olması durumunda additif etki ve CDI > 1 olması durumunda antagonist etki meydana geldiği bildirilmiştir (Lopez-Acevedo vd., 2014; Zhao vd., 2014; Hao vd., 2008).

Tablo 4. 2. U87MG hücrelerine Motesanib, diklofenak dietilamin ve kombine uygulamaların 48 saat için hücre canlılık (%) oranları (ortalama $\pm$ standart hata) ve CDI değerleri

Konsantrasyon (μ M)	MOTESANİB (ort $\pm$ st. hata)	DİKLOFENAK DİETİLAMİN (ort $\pm$ st. hata)	MOTESANİB+DK (ort $\pm$ st. hata)	CDI
40 μ M+200 μ M	55,65 $\pm$ 5.5	60,72 $\pm$ 5.9	36,57 $\pm$ 2.5	1
40+100 μ M	55,65 $\pm$ 5.5	81,26 $\pm$ 3.1	56,86 $\pm$ 4.1	1,2
40+50 μ M	55,65 $\pm$ 5.5	86,64 $\pm$ 2.0	67,06 $\pm$ 3.8	1,3
20+200 μ M	67,49 $\pm$ 6.0	60,72 $\pm$ 5.9	40,27 $\pm$ 3.2	1
20+100 μ M	67,49 $\pm$ 6.0	81,26 $\pm$ 3.1	61,50 $\pm$ 3.1	1
20+50 μ M	67,49 $\pm$ 6.0	86,64 $\pm$ 2.0	73,18 $\pm$ 3.0	1,2
10+200 μ M	87,55 $\pm$ 3.6	60,72 $\pm$ 5.9	70,41 $\pm$ 6.4	1,3
10+100 μ M	87,55 $\pm$ 3.6	81,26 $\pm$ 3.1	77,01 $\pm$ 3.0	1
10+50 μ M	87,55 $\pm$ 3.6	86,64 $\pm$ 2.0	79,40 $\pm$ 2.5	1

CDI: İlaç etkileşim katsayısı.

MTT analizi sonuçlarından hesaplanan % hücre canlılık değerlerine göre U87MG hücrelerinde 48. saatte Motesanib ve diklofenak dietilamin kombinasyonlarının CDI değerleri 1 ile 1.3 arasında hesaplanmıştır (Tablo 4.2). CDI = 1 additif etkinin; CDI > 1 ise antagonist etkiyi göstermektedir. Motesanib ve diklofenak dietilamin kombin uygulamalarında U87MG hücre canlılığının, tekli madde uygulamalarına göre azaldığı belirlense de, sinerjistik etkiden çok additif etki görülmüştür.

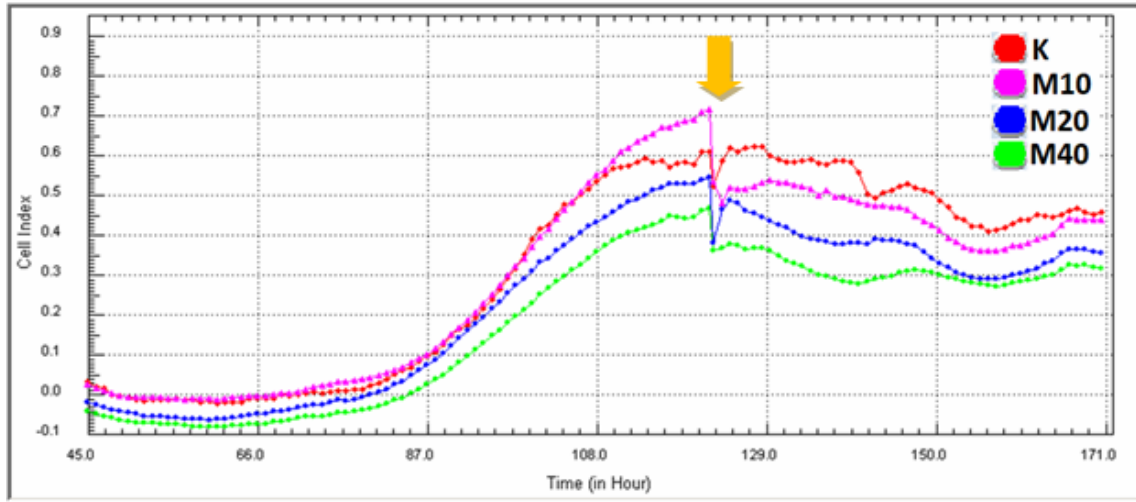
Tablo 4. 3. HUVEC hücrelerine Motesanib, diklofenak dietilamin ve kombine uygulamaların 48 saat için hücre canlılık (%) oranları (ortalama $\pm$ standart hata) ve CDI değerleri

Konsantrasyon (μ M)	MOTESANİB (ort $\pm$ st. hata)	DİKLOFENAK DİETİLAMİN (ort $\pm$ st. hata)	MOTESANİB+DK (ort $\pm$ st. hata)	CDI
40 μ M+200 μ M	56,68 $\pm$ 4.4	62,82 $\pm$ 3.3	40,52 $\pm$ 2.0	1,1
40+100 μ M	56,68 $\pm$ 4.4	71,14 $\pm$ 4.6	53,08 $\pm$ 7.3	1,1
40+50 μ M	56,68 $\pm$ 4.4	88,05 $\pm$ 4.3	58,34 $\pm$ 5.9	1,2
20+200 μ M	67,69 $\pm$ 2.0	62,82 $\pm$ 3.3	49,46 $\pm$ 5.0	1,1
20+100 μ M	67,69 $\pm$ 2.0	71,14 $\pm$ 4.6	58,00 $\pm$ 3.3	1
20+50 μ M	67,69 $\pm$ 2.0	88,05 $\pm$ 4.3	65,05 $\pm$ 7.2	1,1
10+200 μ M	77,52 $\pm$ 4.7	62,82 $\pm$ 3.3	53,03 $\pm$ 2.8	1
10+100 μ M	77,52 $\pm$ 4.7	71,14 $\pm$ 4.6	59,63 $\pm$ 6.1	1
10+50 μ M	77,52 $\pm$ 4.7	88,05 $\pm$ 4.3	76,91 $\pm$ 5.9	1,1

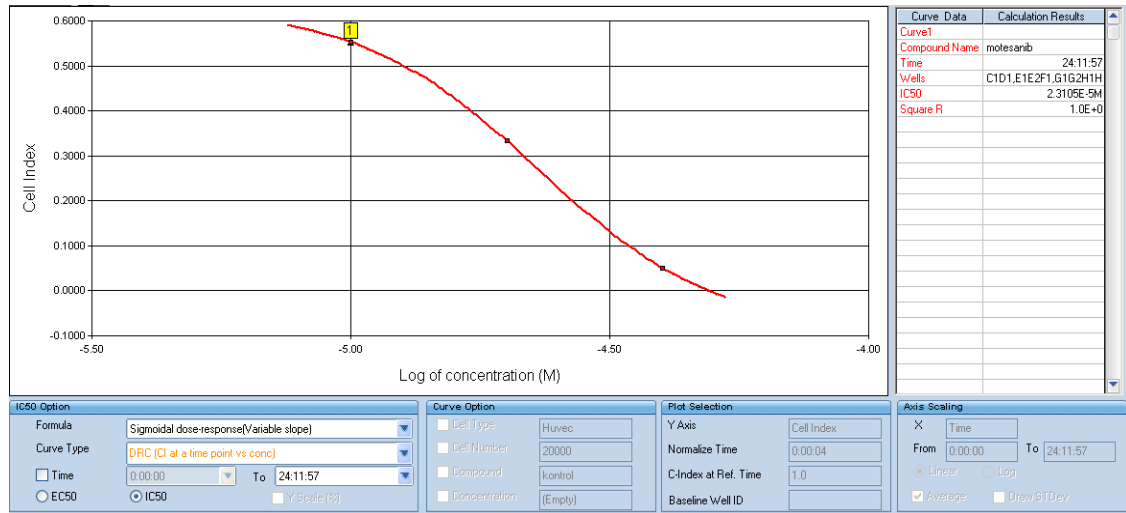
MTT analizi sonuçlarından hesaplanan % hücre canlılık değerlerine göre HUVEC

hücrelerinde 48. saatte Motesanib ve diklofenak dietilamin kombinasyonlarının CDI değerleri 1 ile 1.2 arasında hesaplanmıştır (Tablo 4.3). CDI = 1 additif etkinin; CDI > 1 ise antagonist etkiyi göstermektedir. Motesanib ve diklofenak dietilamin kombinasyonlarında HUVEC hücre canlılığının, tekli madde uygulamalarına göre azaldığı belirlense de, sinerjistik etkiden çok additif etki görülmüştür.

4.1.3. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA-DP)'inde U87MG hücrelerinde motesanib'in anti-proliferatif etkileri



Şekil 4. 4. Motesanib konsantrasyonlarının 48 saatlik U87MG hücre proliferasyon eğrileri (sarı ok: konsantrasyon uygulaması, n=6, ortalama±standart sapma)

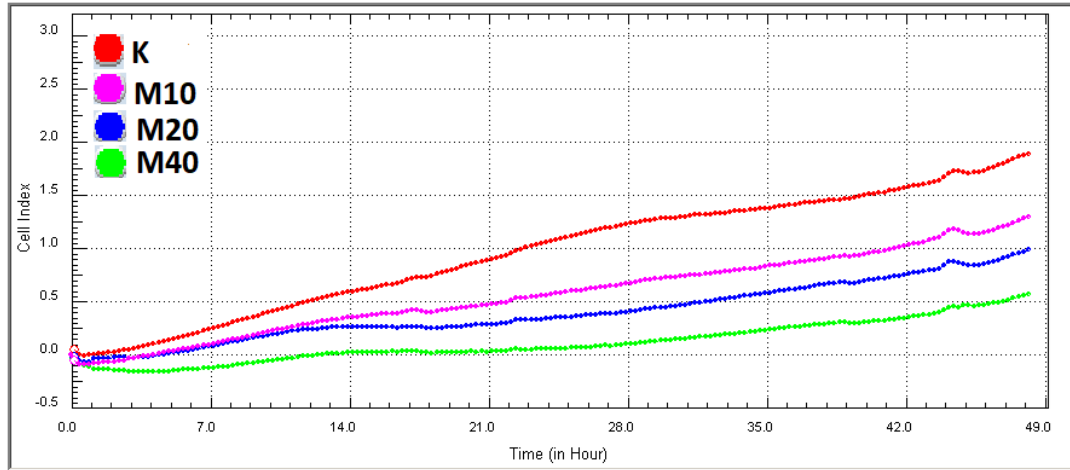


Şekil 4. 5. RTCA DP sisteminde U87MG hücrelerinde Motesanib'in 48. saatteki hücre indeks değerlerine göre IC50 değerinin hesaplandığı konsantrasyon-hücre indeksi eğrisi (IC50: 23 µM)

Motesanib'in U87MG hücre hattında, hücre proliferasyonu ve migrasyonu üzerindeki etkileri RTCA DP ile gerçek zamanlı olarak çalışılmıştır.

RTCA hücre proliferasyon analizi için, MTT sitotoksosite sonuçlarına göre motesanib konsantrasyonları seçilmiştir. E-plaka da log fazına ulaşmış U87MG hücreleri üzerine belirlediğimiz 10, 20 ve 40 μM motesanib konsantrasyonları uygulanmış ve 48 saatlik inkübasyon süresi boyunca hücre proliferasyonları tam zamanlı kayıt altına alınarak analiz edilmiştir. Şekil 4.4’de görüldüğü üzere motesanib konsantrasyon artışına bağlı olarak antiproliferatif etkide artış görülmüştür. RTCA DP ile elde edilen hücre indeks değerlerine göre Motesanib’in U87MG hücreleri için IC50 değeri RTCA DP Software 1.2.1 programı kullanılarak 23 μM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).

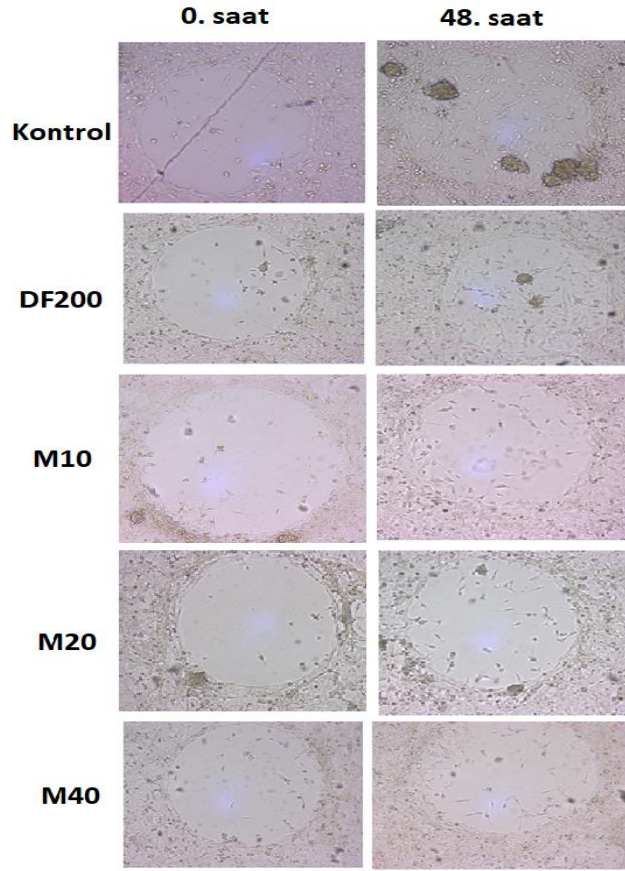
4.1.4. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA-DP) ile HUVEC hücrelerinde motesanib’in hücre migrasyonuna etkileri



Şekil 4. 6. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) ile Motesanibin HUVEC hücrelerinin migrasyonu üzerine etkilerinin zaman ve konsantrasyona bağlı değişimi

Migrasyon çalışmasında CIM plakanın üst odacığındaki her kuyuya besiyeri içinde 2×10^4 HUVEC hücresi ekilmiştir. Daha sonra hücreler üzerine deney gruplarına ait konsantrasyon uygulamaları yapılmış ve CIM plaklar RTCA DP cihazında 48 saat inkübasyona bırakılmış ve süre boyunca hücrelerin migrasyon özellikleri analiz edilmiştir. Motesanib konsantrasyonları (10, 20 ve 40 μM) uygulanan HUVEC hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon süresince 10 dakikalık periyotlarla, gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde (RTCA DP) hücrelerinin migrasyon etkileri değerlendirilmiştir. Şekil 4.7’de görüldüğü gibi 72 saat inkübasyon sonunda kontrol 10 grubuna göre sırasıyla 10 μM , 20 μM ve 40 μM motesanib konsantrasyon artışına bağlı olarak HUVEC hücrelerinin migrasyon etkinliğinin azalmış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6).

4.1.5. HUVEC hücrelerinde motesanib ve diklofenak dietilamin'in hücre migrasyonuna etkileri



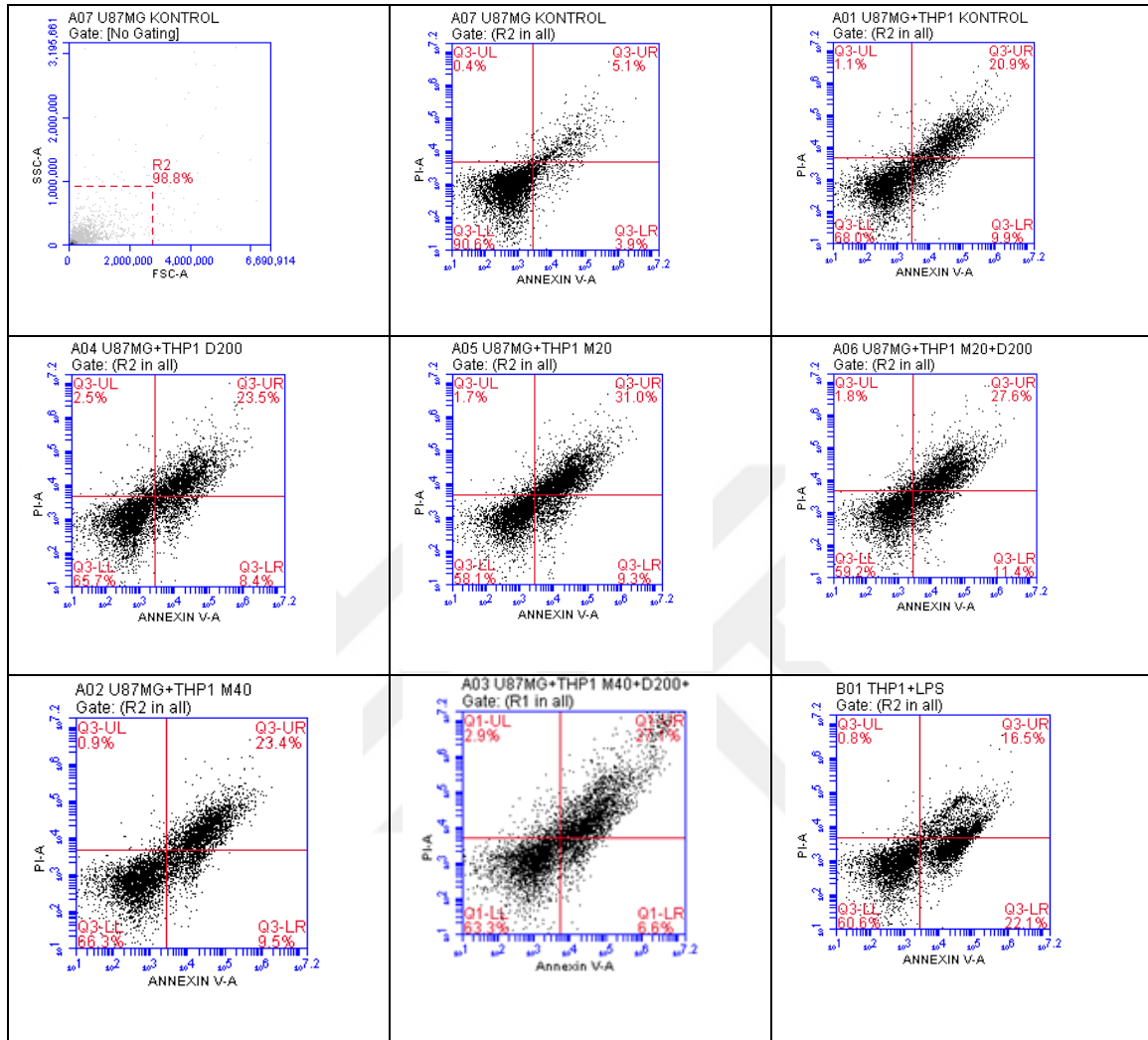
Şekil 4. 7. Motesanib (40, 20, 10 μM) ve diklofenak dietilamin (200 μM) konsantrasyonlarının HUVEC hücre migrasyonuna etkilerinin 48 saatlik inkübasyon sonundaki ışık mikroskop görüntüleri (MB:10X)

Şekil 4.7’de görüldüğü gibi ve gerçek zamanlı analiz sisteminde HUVEC migrasyon sonuçlarımıza da paralel olarak, HUVEC hücrelerinin kontrol göre sırasıyla 200 diklofenak dietilamin ve 10 μM , 20 μM ve 40 μM motesanib gruplarında 48. saatte hücre migrasyonlarının azalmış olduğu belirlenmiştir. En fazla antimigrasyon etki de sırasıyla 40 μM ve 20 μM motesanib grubunda olduğu görülmüştür.

4.1.6. Akış sitometride annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi

U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, Motesanib (20 ve 40 μM) ve diklofenak dietilamin (200 μM) ve kombinleri U87MG hücrelerine uygulanmış ve plakalar 48 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. 48 saatlik inkübasyon sonunda U87MG hücreleri kaldırılarak, ‘BD Pharmingen FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I’ kit

protokolü uygulanmış ve örnekler akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) ölçülerek analiz edilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.8 ve Tablo 4.4’de verilmiştir.



Şekil 4. 8. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombine uygulamalarının apoptotik etkilerinin akış sitometride belirlenmesi

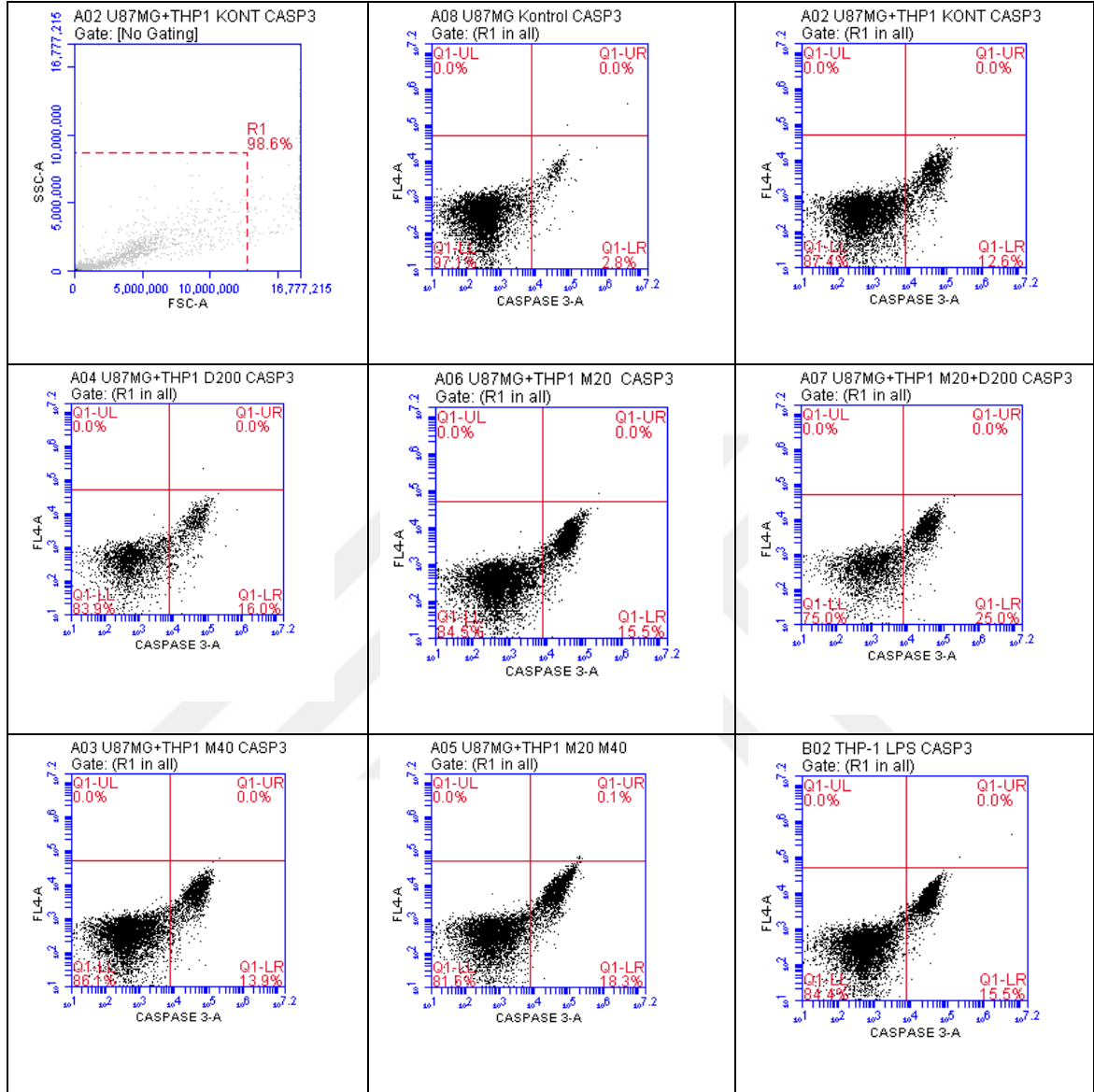
Tablo 4. 4. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombine uygulamalarını Annexin-PI Apoptoz Sonuçları (%).

Gruplar	Canlı hücre% Q3-LL	Nekroz hücre% Q3-UL	Erken Apoptoz% Q3-LR	Geç Apoptoz% Q3-UR
U87MG Kontrol	90.6%	0.4%	9.9%	5.1%
U87MG+THP-1(LPS) Kontrol	68.9%	1.1%	1.2%	20.9%
U87MG+THP-1(LPS) 200DF	65.7%	2.5%	8.4%	23.5%
U87MG+THP-1(LPS+) 20M	58.1%	1.7%	9.3%	31.0%
U87MG+THP-1(LPS) 20M+200DF	59.2%	1.8%	11.4%	27.6%
U87MG+THP-1(LPS) 40M	66.3%	0.9%	9.5%	23.4%
U87MG+THP-1(LPS) 40M+200DF	63.3%	2.9%	6.6%	27.1%
THP-1(LPS)	60.6%	0.8%	22.1%	16.5%

Şekil 4.8 ve Tablo 4.4’de görüldüğü gibi U87MG hücrelerinde Motesanib, diklofenak

dietilamin ve kombinasyonları ile yapılan çalışmada, kontrol (sadece %0.2 uL dmso çözücü içeren besiyeri uygulanmıştır) grubuna göre THP-1 ve U87MG+THP-1 kokültür kontrol grubunda LPS ile stimülasyonuna bağlı olarak apoptoz oranının artmış olduğu ve özellikle de geç apoptozun sırasıyla % 16.5 ve %20.9 olduğu belirlenmiştir. 200 µM diklofenak dietilamin grubunda apoptoz artışı olmuş ve erken apoptotik hücre oranı %8.4, geç apoptotik hücre oranı da %23.5 olarak bulunmuştur. Kokültür ortamında 20 µM motesanib uygulanan U87MG hücrelerinde erken apoptoz %9.3, geç apoptoz %31 iken, 20 µM motesanib+200 µM DF uygulanan grupta ise erken apoptoz %11.4, geç apoptoz %27.6 olarak belirlenmiştir. Her iki grupta da kontrol ve kokültür kontrole göre apoptotik hücre sayısı artmıştır. Ancak 20 µM motesanib grubuna göre, 20M+200DF grubunda hücrelerin erken apoptozu dikkat çekmektedir. Yine kokültür ortamında 40 µM motesanib grubunda U87MG erken apoptotik hücre oranı %9.5, geç apoptotik hücre oranı da %23.4; 40 µM motesanib+200 µM DF kombin grubunda da erken apoptoz %6.6, geç apoptoz % 27.1 olarak bulunmuştur. Motesanib ve motesanib+ diklofenak dietilamin gruplarında kontrol gruplarına göre apoptozun artmış olduğu görülmektedir.

4.1.7. Akış Sitometride kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi



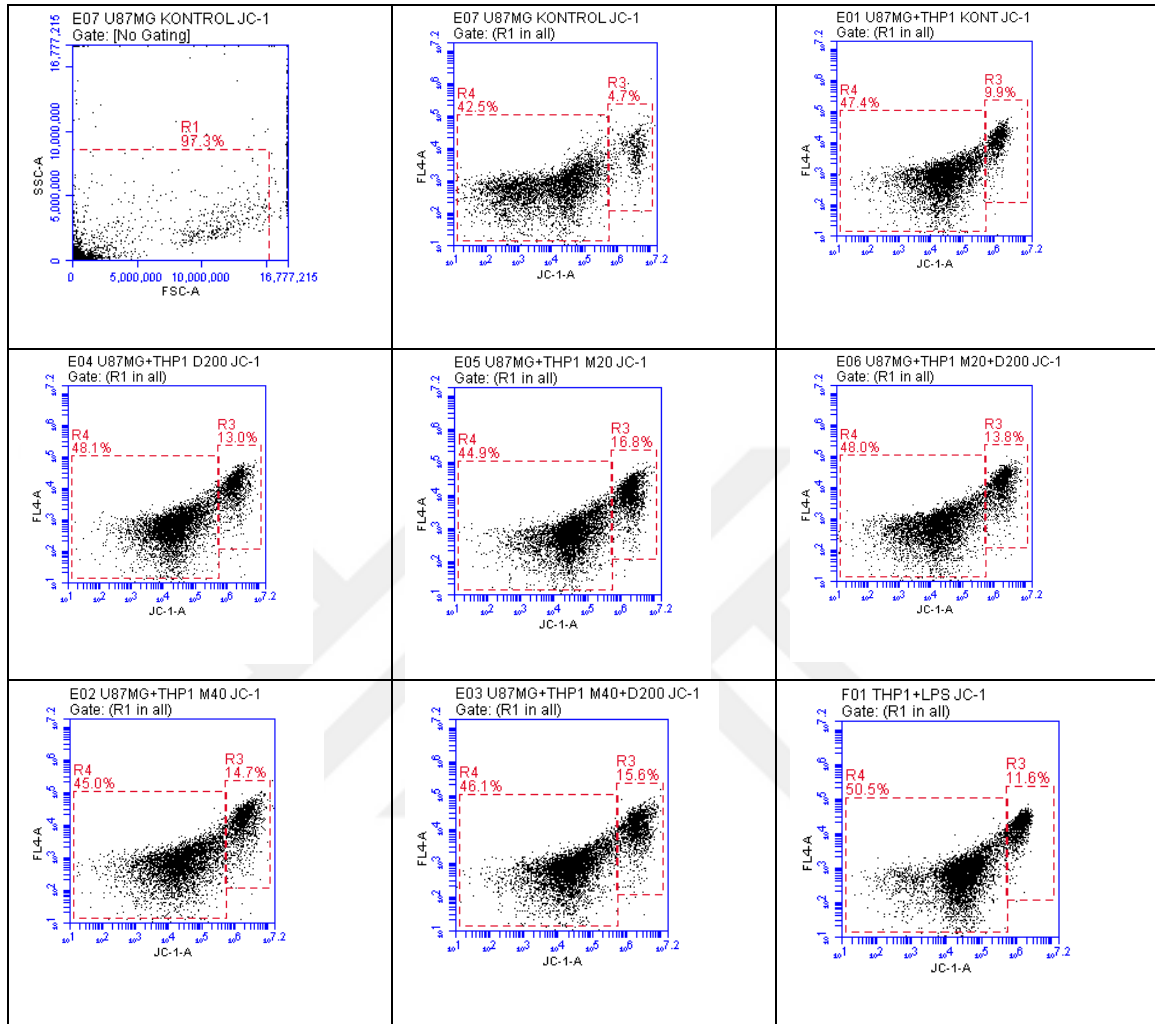
Şekil 4. 9. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombine uygulamalarının kaspaz-3 seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi

Tablo 4. 5. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombine uygulamalarını kaspaz-3 seviyelerine etkisi.

GRUPLAR	KASPAZ-3 (-) %	KASPAZ-3(+) %
U87MG Kontrol	97.1	2.8
U87MG+THP-1(LPS) Kontrol	87.4	12.6
U87MG+THP-1(LPS) 200DF	83.9	16.0
U87MG+THP-1(LPS+) 20M	84.5	15.5
U87MG+THP-1(LPS) 20M+200DF	75.0	25.0
U87MG+THP-1(LPS) 40M	86.1	13.9
U87MG+THP-1(LPS) 40M+200DF	81.6	18.3
THP-1(LPS)	84.4	15.5

Şekil 4.9 ve Tablo 4.5’de görüldüğü gibi U87MG hücrelerinde Motesanib, diklofenak dietilamin ve kombinasyonları ile yapılan çalışmada, kontrol (sadece %0.2 uL dmsö çözöcü içeren besiyeri uygulanmıştır) grubuna göre THP-1 ve U87MG+THP-1 kokültür kontrol grubunda LPS ile stimölasyonuna bağılı olarak kaspaz-3 aktivasyonun artmış olduğı ve kaspaz-3 pozitif hücre yüzdeleri sırasıyla % 15.5 ve %12.6 olduğı belirlenmiştir. 200 μ M diklofenak dietilamin de U87MG hücrelerinde kontrole göre kaspaz-3 aktivasyonunu arttırmış olup kaspaz-3 pozitif hücre oranı %16 olarak bulunmuştur. Kokültür ortamında 20 μ M motesanib uygulanan grupta kaspaz-3 pozitif hücre oranı %15.5, 20 μ M motesanib+200 μ M DF uygulanan grupta ise %25 olarak belirlenmiştir. Yine kokültür ortamında 40 μ M motesanib grubunda kaspaz-3 pozitif U87MG hücre oranı %13.9; 40 μ M motesanib+200 μ M DF kombin grubunda ise %18.3 olarak analiz edilmiştir. Motesanib ve motesanib+ diklofenak dietilamin gruplarında kontrol gruplarına göre apoptoz sonuçlarımıza paralel olarak kaspaz-3 aktivasyonun da artmış olduğı görölmektedir. Özellikle kaspaz-3 pozitif hücrelerin kombin uygulanan gruplarda daha fazla olduğı dikkat çekmektedir.

4.1.8. Akış sitometride JC-1 boyama yöntemi ile hücrelerin mitokondrial membran bütünlüğünün değerlendirilmesi



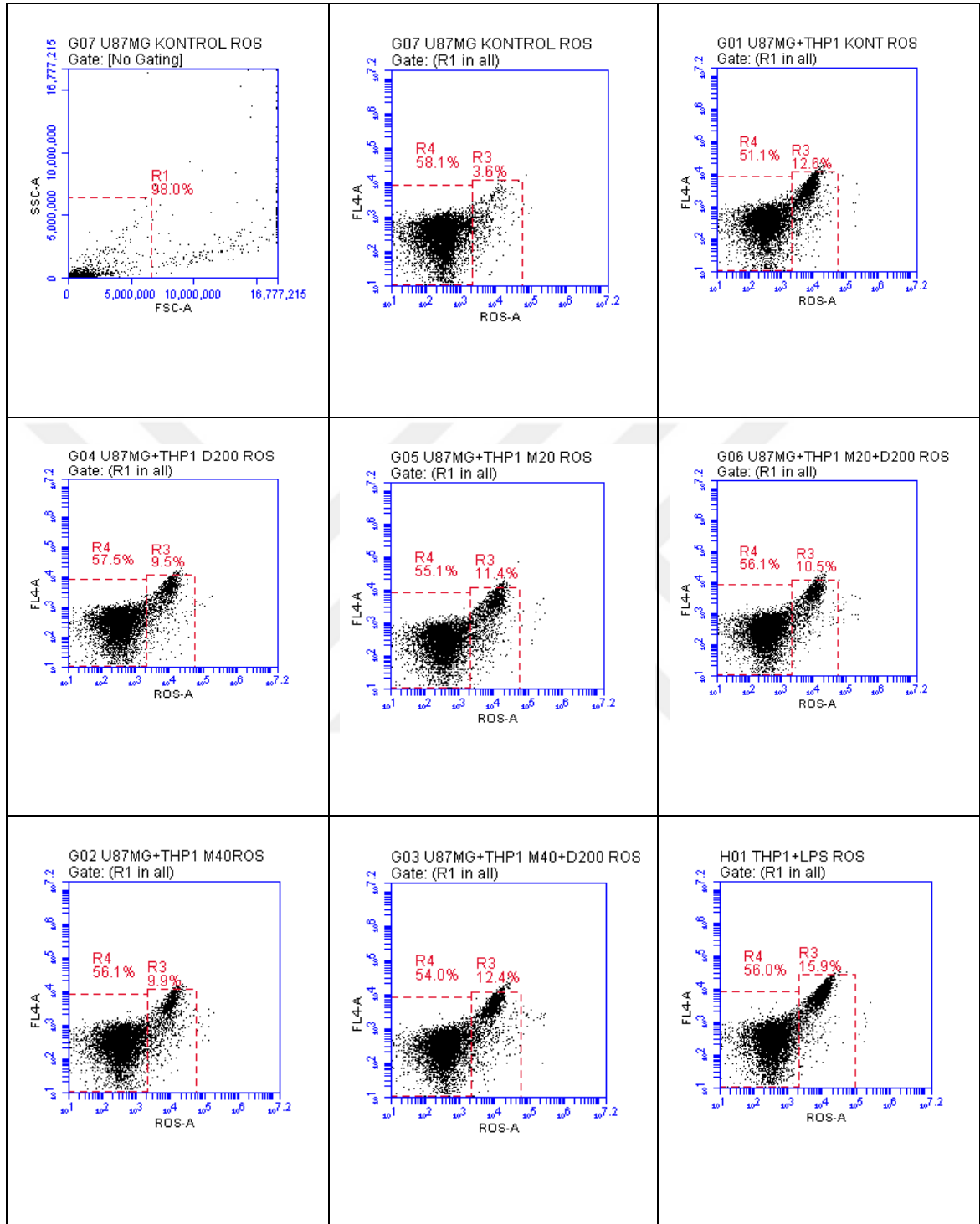
Şekil 4. 10. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombine uygulamalarının mitokondrial membran bütünlüğüne olan etkilerinin (JC-1) akış sitometride belirlenmesi.

Tablo 4. 6. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombine uygulamalarını JC-1 seviyelerine etkisi

GRUPLAR	JC-1 NEGATİF %	JC-1 POZİTİF %
U87MG Kontrol	42.5	4.7
U87MG+THP-1(LPS) Kontrol	47.4	9.9
U87MG+THP-1(LPS) 200DF	48.1	13.0
U87MG+THP-1(LPS+) 20M	44.9	16.8
U87MG+THP-1(LPS) 20M+200DF	48.0	13.8
U87MG+THP-1(LPS) 40M	45.0	14.7
U87MG+THP-1(LPS) 40M+200DF	46.1	15.6
THP-1(LPS)	50.5	11.6

Şekil 4.10 ve Tablo 4.6’da görüldüğü gibi U87MG hücrelerinde Motesanib, diklofenak dietilamin ve kombinasyonları ile yapılan çalışmada, kontrol (sadece %0.2 uL dmsö çözücü içeren besiyeri uygulanmıştır) grubuna göre THP-1 ve U87MG+THP-1 kokültür kontrol grubunda LPS ile stimölasyonuna bağılı olarak JC-1 aktivasyonun artmış olduğı ve JC-1pozitif hücre yüzdeleri sırasıyla % 11.6 ve %9.9 olduğı belirlenmiştir. 200 µM diklofenak dietilamin de U87MG hücrelerinde kontrole göre JC-1 aktivasyonunu arttırmış olup JC-1 pozitif hücre oranı %13 olarak bulunmuştur. Kokültür ortamında 20 µM motesanib grubunda JC-1 pozitif hücre oranı %16.8; 20 µM motesanib+200 µM DF uygulanan grupta ise %13.8 olarak belirlenmiştir. Yine kokültür ortamında 40 µM motesanib grubunda JC-1 pozitif U87MG hücre oranı %14.7; 40 µM motesanib+200 µM DF kombin grubunda ise %15.6 olarak analiz edilmiştir. Motesanib ve motesanib+ diklofenak dietilamin gruplarında apoptoz ve kaspaz-3 sonuçlarımıza paralel olarak JC-1 aktivasyonun da artmış olduğı görölmektedir.

4.1.9. Akış sitometride ROS düzeylerinin belirlenmesi



Şekil 4. 11. U87MG ve THP-1 (LPS+)ko-kültür hücrelerinde Motesanib (40,20 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombinasyonlarının ROS seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi.

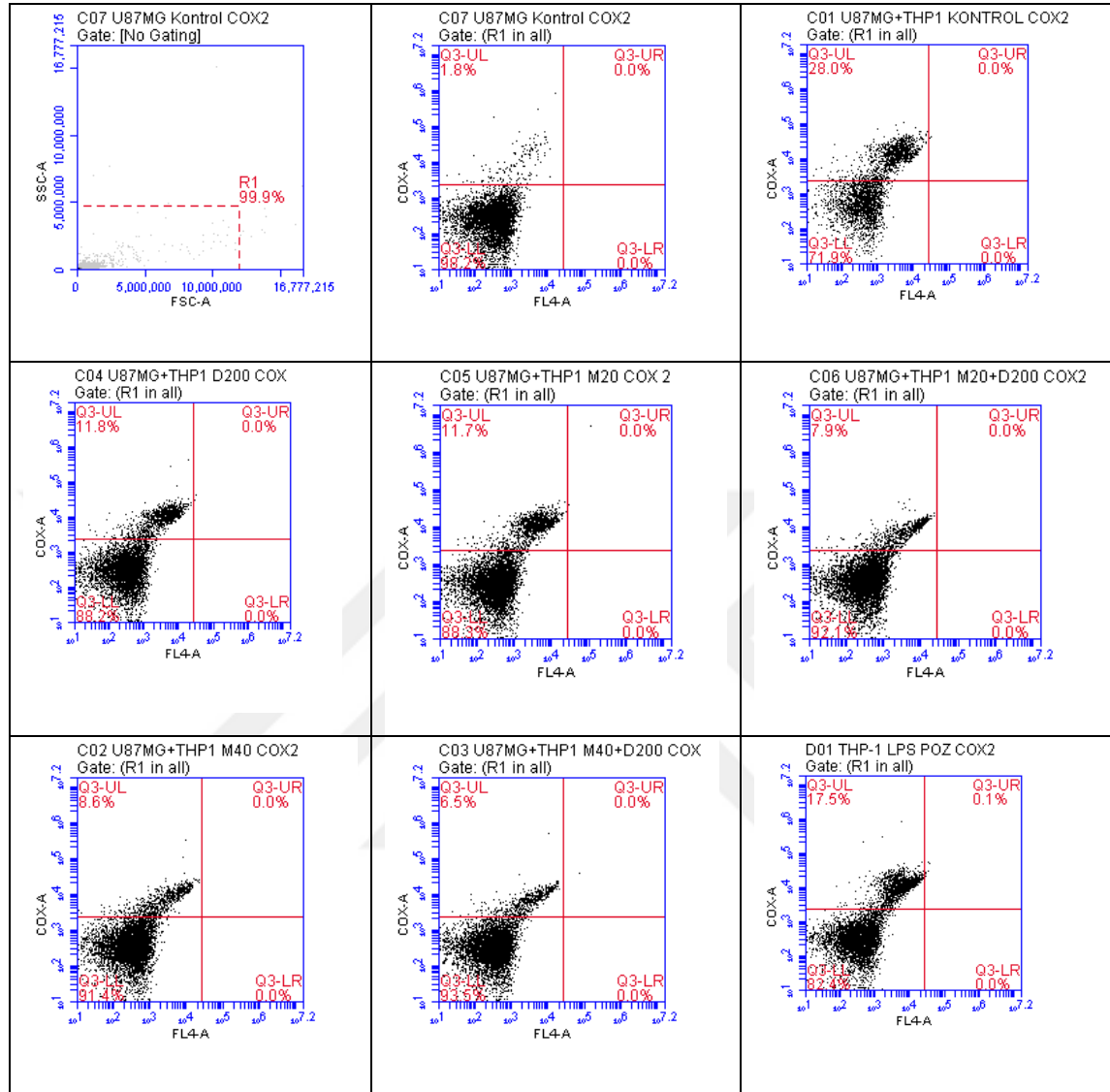
Tablo 4. 7. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombine uygulamalarını ROS seviyelerine etkisi

GRUPLAR	ROS NEGATİF %	ROS POZİTİF %
U87MG Kontrol	58.1	3.6
U87MG+THP-1(LPS) Kontrol	51.1	12.6
U87MG+THP-1(LPS) 200DF	57.5	9.5
U87MG+THP-1(LPS+) 20M	55.1	11.4
U87MG+THP-1(LPS) 20M+200DF	56.1	10.5
U87MG+THP-1(LPS) 40M	56.1	9.9
U87MG+THP-1(LPS) 40M+200DF	54	12.4
THP-1(LPS)	55	15.9

Reaktif oksijen türleri, DNA ve RNA'ya zarar veren ve proteinleri ve lipitleri oksitleyen (lipit peroksidasyonu) bir dizi molekülü içerir. İnflamatuvar hastalıklar, kanserler, iskemi/reperfüzyon ve ayrıca radyasyon veya kemoterapi (yani sisplatin) gibi tedaviler gibi çeşitli patolojik durumlar ROS aşırı üretimini tetikler. Bu nedenle, ROS seviyelerini tespit etmek ve ölçmek birçok temel, klinik öncesi ve klinik çalışmada önemlidir. Ancak, ROS'un yarı ömürleri çok kısadır ve tespiti karmaşık olabilir (Wu ve Yotnda, 2011).

Şekil 4.11 ve Tablo 4.7'de görüldüğü gibi U87MG kontrol grubuna göre THP-1 ve U87MG+THP-1 kokültür kontrol grubunda LPS ile stimülasyonuna bağlı olarak ROS seviyelerinde bir miktar artmış olduğu ve ROS (+) hücre yüzdelerinin sırasıyla % 15.9 ve %12.6 olduğu belirlenmiştir. 200 μ M diklofenak dietilamin de U87MG hücrelerinde U87MG+THP-1 kokültür kontrol grubuna göre ROS aktivasyonunun azalmış olduğu, ROS(+) hücre oranının %9.5 olduğu belirlenmiştir. Kokültür ortamında 20 μ M motesanib grubunda ROS(+) hücre oranı %11.4; 20 μ M motesanib+200 μ M DF uygulanan grupta ise %10.5 olarak belirlenmiştir. Yine kokültür ortamında 40 μ M motesanib grubunda ROS(+) pozitif U87MG hücre oranı %9.9; 40 μ M motesanib+200 μ M DF kombin grubunda ise %12.4 olarak analiz edilmiştir. Motesanib, diklofenak dietilamin ve motesanib+ diklofenak dietilamin gruplarında U87MG+THP-1 kokültür kontrol grubuna göre ROS aktivasyonunun azalma olduğu görülmektedir.

4.1.10. Akış sitometride COX-2 düzeylerinin belirlenmesi



Şekil 4. 12. U87MG hücrelerinde Motesanib (40,20 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombinasyonlarının COX-2 seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi

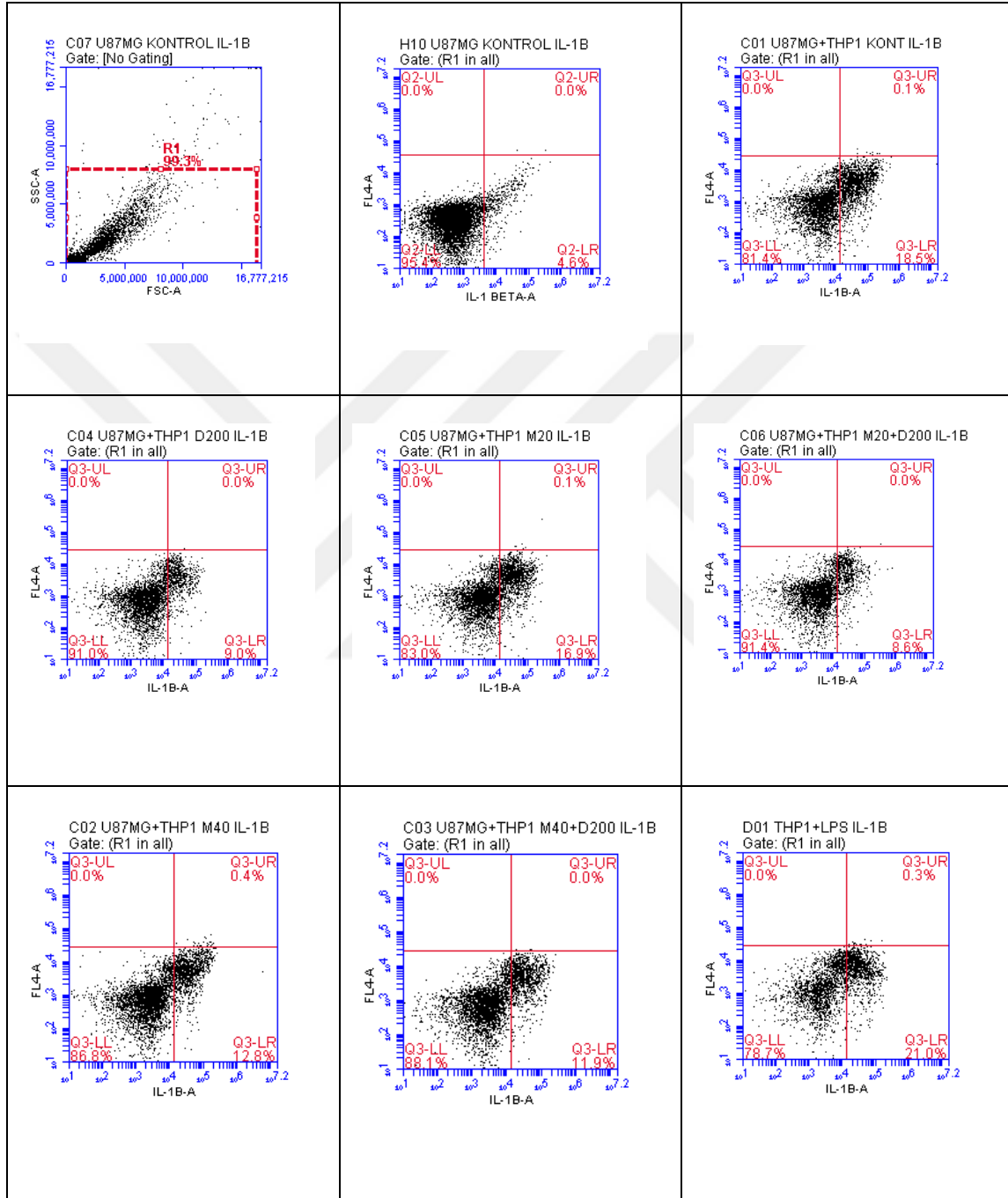
Tablo 4. 8. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombine uygulamalarını COX-2 seviyelerine etkisi

GRUPLAR	COX-2 NEGATİF %	COX-2 POZİTİF %
U87MG Kontrol	98.2	1.8
U87MG+THP-1(LPS) Kontrol	71.9	28.0
U87MG+THP-1(LPS) 200DF	88.2	11.8
U87MG+THP-1(LPS+) 20M	88.3	11.7
U87MG+THP-1(LPS) 40M	91.4	8.6
U87MG+THP-1(LPS) 20M+200DF	92.1	7.9
U87MG+THP-1(LPS) 40M+200DF	93.5	6.5
THP-1(LPS)	82.4	17.5

Şekil 4.11 ve Tablo 4.8’de görüldüğü gibi U87MG kontrol (sadece %0.2 uL dmsö çözöcü içeren besiyeri uygulanmıştır) grubuna göre THP-1 ve U87MG+THP-1 koköltür kontrol grubunda LPS ile stimölasyonuna bağılı olarak COX-2 aktivasyonun artmış olduğı ve COX-2 pozitif hücre yüzdeleri sırasıyla % 17.5 ve %28 olduğı belirlenmiştir. 200 µM diklofenak dietilamin grubunda U87MG+THP-1 koköltür kontrol grubuna göre, COX-2 inhibisyonu olduğı için COX-2 pozitif hücre oranı %11.8’e düşmüştür. Koköltür ortamında 20 µM motesanib grubunda COX-2 pozitif hücre oranı %11.7; 20 µM motesanib+200 µM DF uygulanan grupta ise %7.9 olarak belirlenmiştir. Yine koköltür ortamında 40 µM motesanib grubunda COX-2 pozitif U87MG hücre oranı %8.6; 40 µM motesanib+200 µM DF kombin grubunda ise %6,5 olarak analiz edilmiştir. Hem motesanib hemde motesanib+ diklofenak dietilamin gruplarında, koköltür kontrol grubuna göre COX-2 aktivasyonda azalma olduğı görölmektedir.

4.1.11. Akış sitometride sitokin (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 ve IL-10) düzeylerinin belirlenmesi

4.1.11.1. IL-1 β sitokin miktarlarının değerlendirilmesi



Şekil 4. 13. U87MG hücrelerinde Motesanib (40,20 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombinasyonlarının IL-1 β seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi

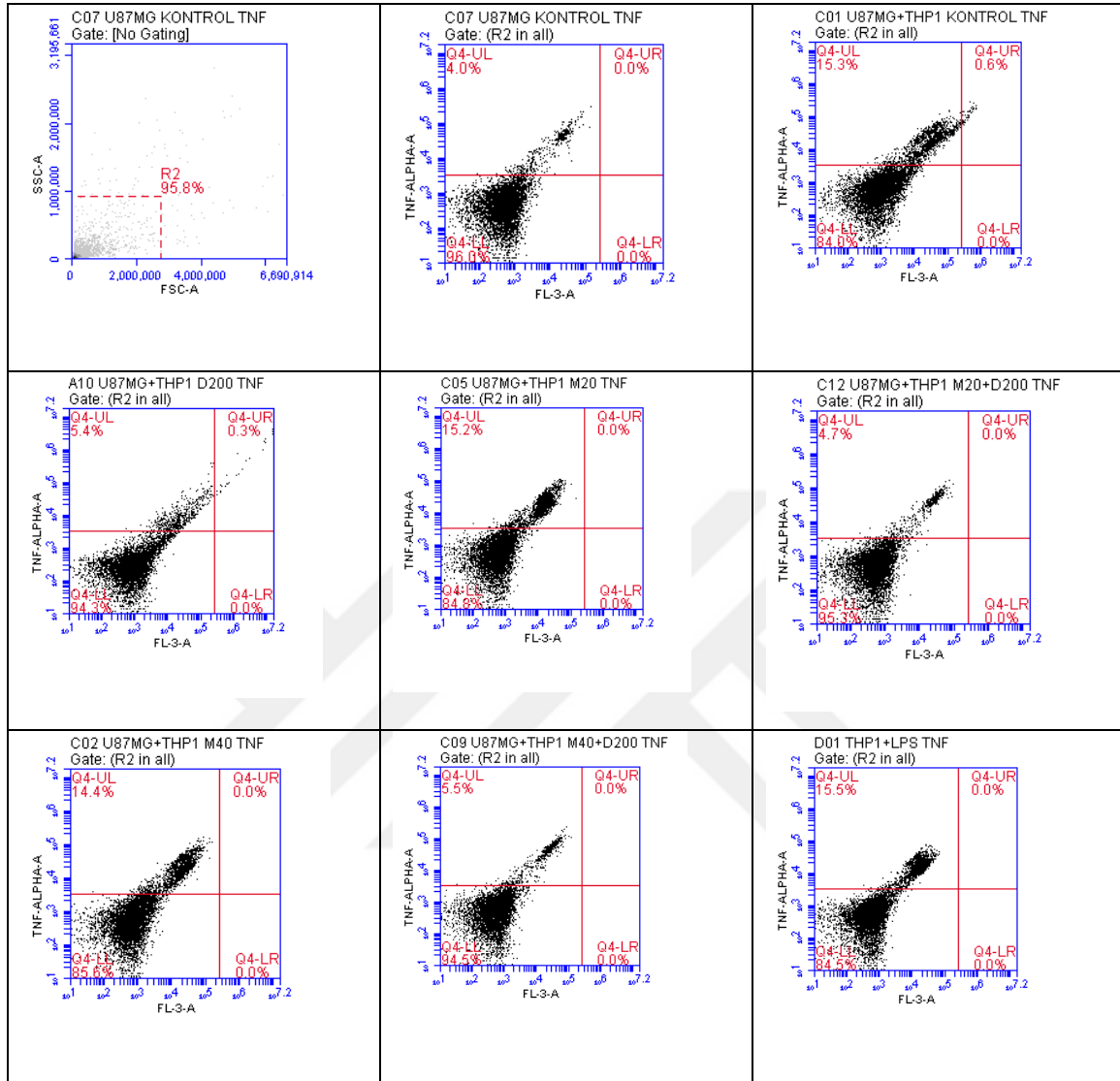
Tablo 4. 9. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombine uygulamalarını IL-1 β seviyelerine etkisi

Gruplar	IL-1B Negatif (%)	IL-1B Pozitif (%)
U87MG Kontrol	95.4%	4.6%
U87MG+THP-1(LPS) Kontrol	81.4%	18.5%
U87MG+THP-1(LPS+) 20M	83.0%	16.9%
U87MG+THP-1(LPS) 40M	86.8%	12.8%
U87MG+THP-1(LPS) 200DF	91.0%	9.0%
U87MG+THP-1(LPS) 20M+200DF	91.4%	8.6%
U87MG+THP-1(LPS) 40M+200DF	88.1%	11.9%
THP-1(LPS)	78.7%	21.0%

IL-1'in β (IL-1 β) formu, birçok hücre tipi tarafından salınan bir proinflamatuvar sitokindir ve enfeksiyon sırasında önemli bir inflamasyon aracıdır. IL-1 β üretimi, birden fazla seviyede düzenlenme ve tipik olarak aktivasyon ve salım için iki ayrı sinyal gerektiren oldukça sıkı kontrol edilen bir süreçtir. Bir proinflamatuvar sinyal ilk olarak NF- κ B aktivasyonuna ve pro-IL-1 β 'nın sentezine yol açar. İkinci sinyal, pro-IL-1 β 'yı olgun ve biyolojik olarak aktif IL-1 β 'ya parçalayan, bir sistein proteaz olan ve inflamazom olarak bilinen bir multiprotein kompleksi yoluyla aktive edilmesi gereken bir protein olarak üretilen kaspaz-1'in aktivasyonunu içerir (Meylan vd., 2006).

Şekil 4.13 ve Tablo 4.9'da görüldüğü gibi U87MG kontrol grubuna göre THP-1 ve U87MG+THP-1 kokültür kontrol grubunda LPS ile stimülasyonuna bağlı olarak IL-1 β 'in artmış olduğu ve IL-1 β seviyelerinin sırasıyla % 21 ve % 18.5 olduğu belirlenmiştir. 200 μ M diklofenak dietilamin grubunda U87MG+THP-1 kokültür kontrol grubuna göre, antiinflamatuvar etki nedeni ile IL-1 β düzeyi %9'a düşmüştür. Kokültür ortamında 20 μ M motesanib grubunda IL-1 β pozitif hücre oranı %16.9 iken, 20 μ M motesanib+200 μ M DF uygulanan kombine grupta ise azalmış ve %8.6 olarak belirlenmiştir. Yine kokültür ortamında 40 μ M motesanib grubunda IL-1 β pozitif %12.8 iken 40 μ M motesanib+200 μ M DF kombin grubunda ise %11.9 olarak analiz edilmiştir. Hem motesanib hemde motesanib+ diklofenak dietilamin gruplarında, kokültür kontrol grubuna göre IL-1 β aktivasyonda azalma olduğu, özellikle de kombine gruplarda diklofenak dietilaminin etkisi ile IL-1 β (+) düzeylerinde azalmaların olduğu önemli bulgular arasındadır.

4.1.11.2. *TNF- α sitokin miktarlarının değerlendirilmesi*



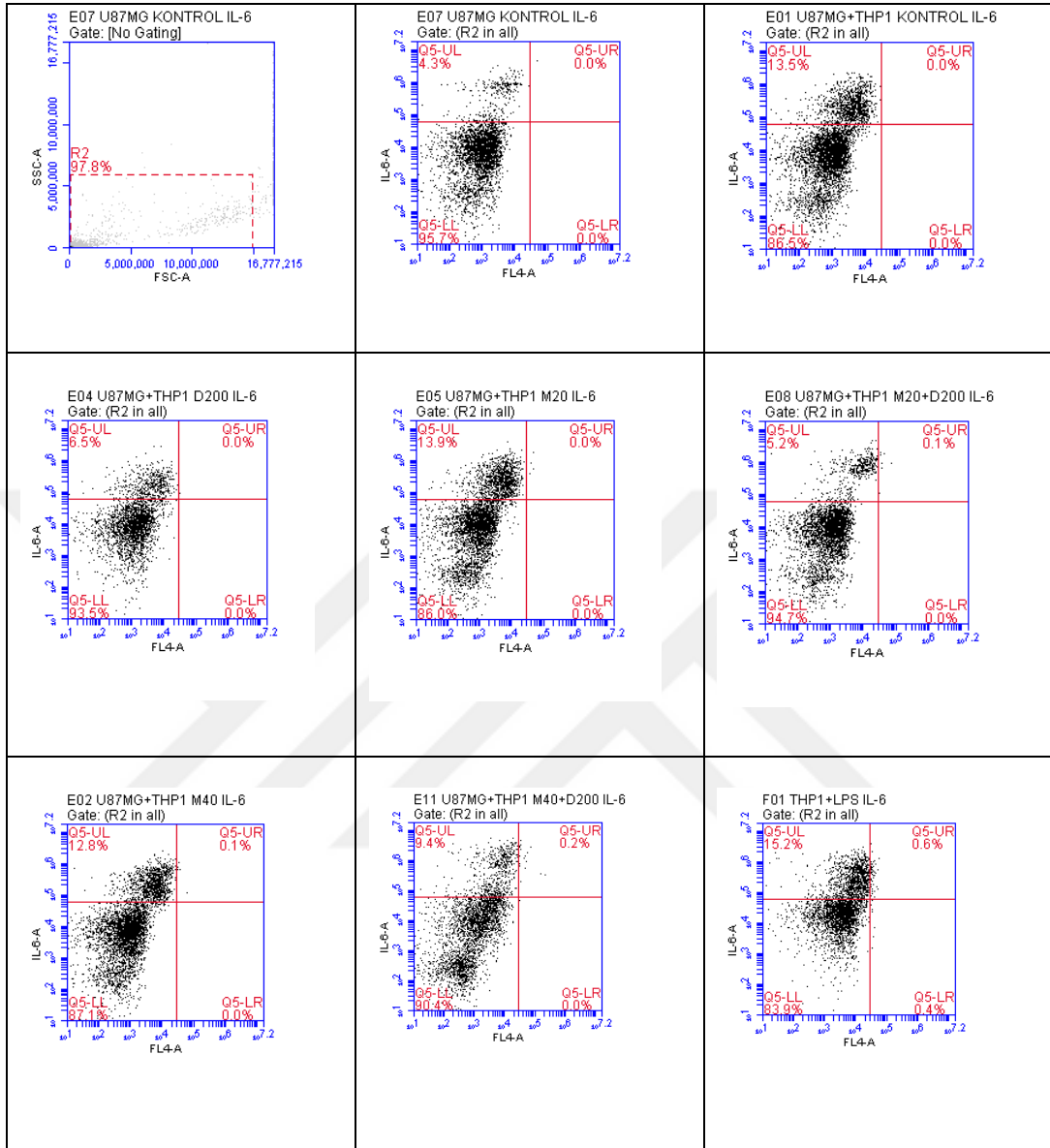
Şekil 4. 14. U87MG hücrelerinde Motesanib (40,20 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombinasyonlarının TNF- α seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi

Tablo 4. 10. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 µM), diklofenak dietilamin (200 µM) ve kombine uygulamalarını TNF-α seviyelerine etkisi

GRUPLAR	TNFα NEGATİF %	TNFα POZİTİF %
U87MG Kontrol	96.0	4.0
U87MG+THP-1(LPS) Kontrol	84.0	15.3
U87MG+THP-1(LPS) 200DF	94.3	5.4
U87MG+THP-1(LPS+) 20M	82.8	15.2
U87MG+THP-1(LPS) 20M+200DF	95.3	4.7
U87MG+THP-1(LPS) 40M	85.6	14.4
U87MG+THP-1(LPS) 40M+200DF	94.5	5.5
THP-1(LPS)	84.5	15.5

Şekil 4.14 ve Tablo 4.10’da görüldüğü gibi U87MG kontrol grubuna göre THP-1 ve U87MG+THP-1 kokültür kontrol grubunda LPS ile stimülasyonuna bağlı olarak TNF-α’nın artmış olduğu ve TNF-α seviyelerinin de sırasıyla % 15.5 ve % 15.3 olduğu belirlenmiştir. 200 µM diklofenak dietilamin grubunda U87MG+THP-1 kokültür kontrol grubuna göre, antiinflamatuvar etki nedeni ile TNF-α pozitif düzeyi %5.4’e düşmüştür. Kokültür ortamında 20 µM motesanib grubunda TNF-α pozitif oranı %15.2 iken, 20 µM motesanib+200 µM DF uygulanan kombine grupta ise azalmış ve %4.7 olarak belirlenmiştir. Yine kokültür ortamında 40 µM motesanib grubunda TNF-α %14.4 iken 40 µM motesanib+200 µM DF kombin grubunda ise %5.5 olarak analiz edilmiştir. Sonuçlarımıza göre kokültür kontrol grubuna ve sadece motesanib 20 ve 40 µM uygulanan gruplara göre, TNF-α’nın azaldığı, özellikle de diklofenak dietilaminin etkisi ile TNF-α düzeylerinde önemli azalmaların olduğu bulgularımız arasındadır.

4.1.11.3. IL-6 sitokin miktarlarının değeriendirilmesi



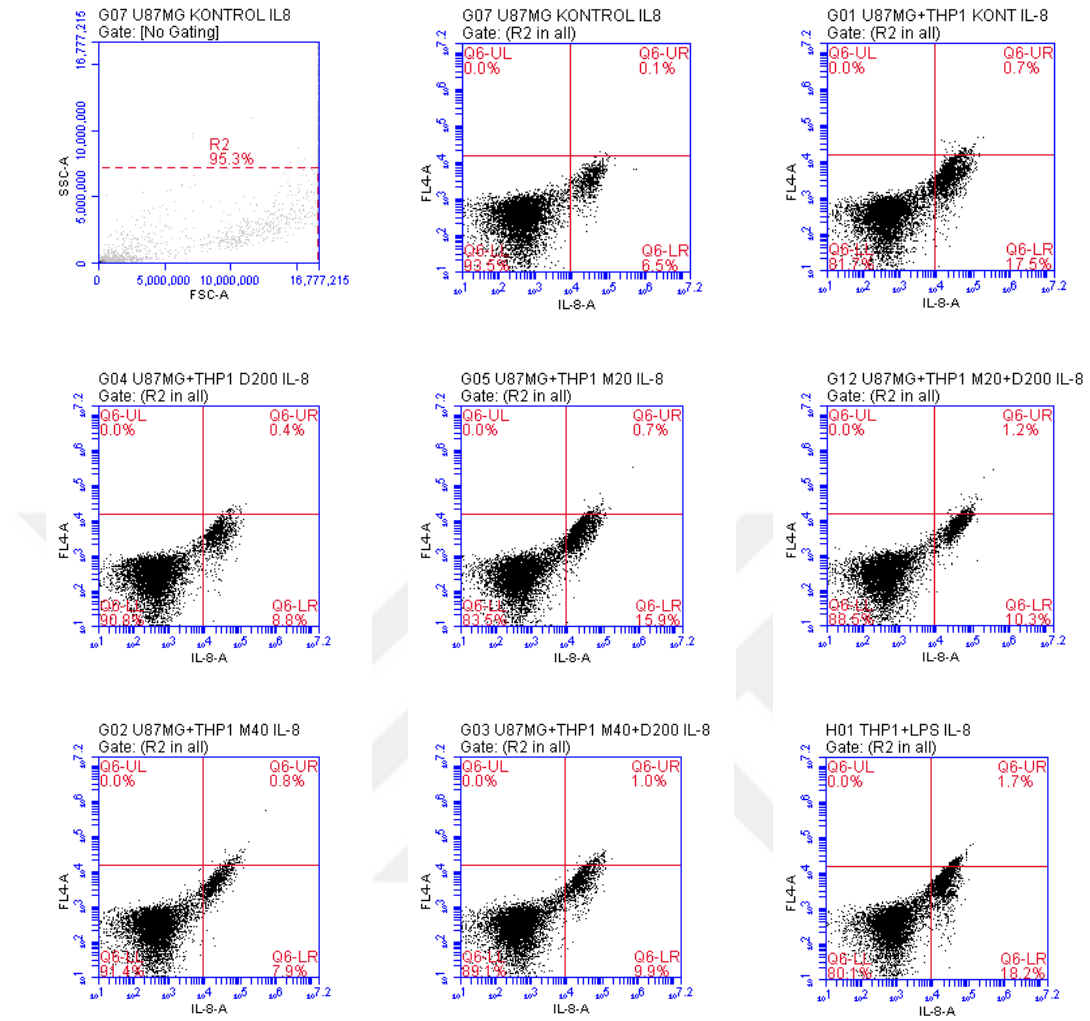
Şekil 4. 15. U87MG hücrelerinde Motesanib (40,20 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombinasyonlarının IL-6 seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi

Tablo 4. 11. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombine uygulamalarını IL-6 seviyelerine etkisi

GRUPLAR	IL-6 NEGATİF %	IL-6 POZİTİF %
U87MG Kontrol	95.7	4.3
U87MG+THP-1(LPS) Kontrol	86.5	13.5
U87MG+THP-1(LPS) 200DF	93.5	6.5
U87MG+THP-1(LPS+) 20M	86.0	13.9
U87MG+THP-1(LPS) 20M+200DF	94.7	5.2
U87MG+THP-1(LPS) 40M	87.1	12.8
U87MG+THP-1(LPS) 40M+200DF	90.4	9.4
THP-1(LPS)	83.9	15.2

Şekil 4.15 ve Tablo 4.11’de görüldüğü gibi U87MG kontrol grubuna göre THP-1 ve U87MG+THP-1 kokültür kontrol grubunda LPS ile stimülasyonuna bağlı olarak IL-6’nın artmış olduğu ve IL-6 seviyelerinin de sırasıyla % 15.2 ve % 13.5 olduğu belirlenmiştir. 200 μ M diklofenak dietilamin grubunda U87MG+THP-1 kokültür kontrol grubuna göre, antiinflamatuvar etki nedeni ile IL-6 pozitif düzeyi %6.5’e düşmüştür. Kokültür ortamında 20 μ M motesanib grubunda IL-6 pozitif oranı %13.9 iken, 20 μ M motesanib+200 μ M DF uygulanan kombine grupta ise azalmış ve %5.2 olarak belirlenmiştir. Yine kokültür ortamında 40 μ M motesanib grubunda IL-6 %12.8 iken 40 μ M motesanib+200 μ M DF kombin grubunda ise %9.4 olarak analiz edilmiştir. Sonuçlarımıza göre kokültür kontrol grubuna ve sadece motesanib 20 ve 40 μ M uygulanan gruplara göre motesanib+ diklofenak dietilamin gruplarında, IL-6’nın azaldığı, özellikle de diklofenak dietilaminin etkisi ile IL-6 düzeylerinde önemli azalmaların olduğu bulgularımız arasındadır.

4.1.11.4. IL-8 sitokin miktarlarının değerlendirilmesi



Şekil 4. 16. U87MG hücrelerinde Motesanib (40,20 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombinasyonlarının IL-8 seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi

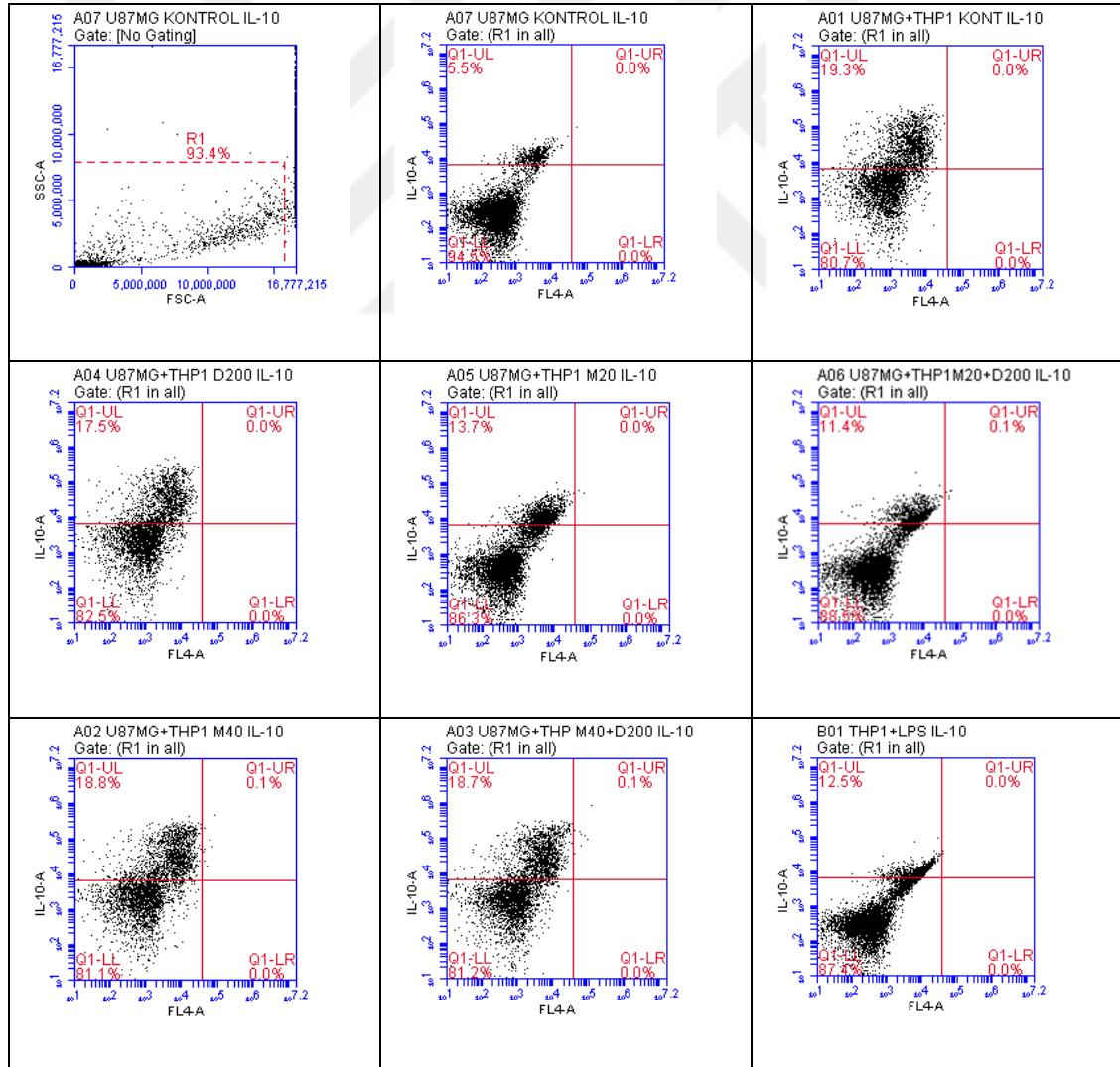
Tablo 4. 12. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombine uygulamalarını IL-8 seviyelerine etkisi

Gruplar	IL-8 Negatif (%)	IL-8 Pozitif (%)
U87MG Kontrol	93.5%	6.5%
U87MG+THP-1(LPS) Kontrol	81.7%	17.5%
U87MG+THP-1(LPS+) 20M	83.5%	15.9%
U87MG+THP-1(LPS) 40M	91.4%	7.9%
U87MG+THP-1(LPS) 200DF	90.8%	8.8%
U87MG+THP-1(LPS) 20M+200DF	88.5%	10.3%
U87MG+THP-1(LPS) 40M+200DF	89.1%	9.9%
THP-1(LPS)	82.1%	18.2%

Şekil 4.16 ve Tablo 4.12’de görüldüğü gibi U87MG kontrol grubuna göre THP-1 ve U87MG+THP-1 kokültür kontrol grubunda LPS ile stimülasyonuna bağlı olarak IL-8’in artmış olduğu ve IL-8 seviyelerinin de sırasıyla % 18.2 ve % 17.5 olduğu belirlenmiştir.

200 μ M diklofenak dietilamin grubunda U87MG+THP-1 kokültür kontrol grubuna göre, antiinflamatuvar etki nedeni ile IL-8 pozitif düzeyi %8.8'e düşmüştür. Kokültür ortamında 20 μ M motesanib grubunda IL-8 pozitif oranı %15.9 iken, 20 μ M motesanib+200 μ M DF uygulanan kombine grupta ise azalmış ve %10.3 olarak belirlenmiştir. Yine kokültür ortamında 40 μ M motesanib grubunda IL-8 %7.8 iken 40 μ M motesanib+200 μ M DF kombin grubunda ise %9.9 olarak analiz edilmiştir. Sonuçlarımıza göre U87MG+THP-1 kokültür kontrol grubuna göre sadece motesanib ve motesanib+ diklofenak dietilamin gruplarında, IL-8'in azaldığı, özellikle de motesanib konsantrasyonunun artışına ve diklofenak dietilaminin kombine kullanımına bağlı olarak IL-8 düzeylerinde önemli azalmaların olduğu bulgularımız arasındadır.

4.1.11.5. IL-10 sitokin miktarlarının değerlendirilmesi



Şekil 4. 17. U87MG hücrelerinde Motesanib (40,20 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombinasyonlarının IL- 10 seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi

Tablo 4. 13. U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, U87MG hücrelerinde Motesanib (20 ve 40 μ M), diklofenak dietilamin (200 μ M) ve kombine uygulamalarını IL-10 seviyelerine etkisi

Gruplar	IL-10 Negatif (%)	IL-10 Pozitif (%)
U87MG Kontrol	94.5%	5.5%
U87MG+THP-1(LPS) Kontrol	80.7%	19.3%
U87MG+THP-1(LPS+) 20M	86.3%	13.7%
U87MG+THP-1(LPS) 40M	81.1%	18.8%
U87MG+THP-1(LPS) 200DF	82.5%	17.5%
U87MG+THP-1(LPS) 20M+200DF	88.5%	11.4%
U87MG+THP-1(LPS) 40M+200DF	81.2%	18.7%
THP-1(LPS)	87.4%	12.5%

Şekil 4.17 ve Tablo 4.13’de görüldüğü gibi U87MG kontrol grubuna göre THP-1 ve U87MG+THP-1 kokültür kontrol grubunda LPS ile stimülasyon sonunda IL-10’in artmış olduğu ve IL-10 seviyelerinin de sırasıyla % 12.2 ve % 19.3 olduğu belirlenmiştir. 200 μ M diklofenak dietilamin grubunda U87MG+THP-1 kokültür kontrol grubuna göre, antiinflamatuvar etki nedeni ile IL-10 pozitif düzeyi %17.5 olarak belirlenmiştir. Kokültür ortamında 20 μ M motesanib grubunda IL-10 pozitif oranı %13.7 iken, 20 μ M motesanib+200 μ M DF uygulanan kombine grupta ise %11.4 olarak bulunmuştur. Yine kokültür ortamında 40 μ M motesanib grubunda IL-10 %18.8, 40 μ M motesanib+200 μ M DF kombin grubunda da %18.7 olarak analiz edilmiştir. Sonuçlarımıza göre, IL-10 düzeylerinin özellikle de motesanib konsantrasyonunun artışına ve diklofenak dietilaminin kombine kullanım gruplarında artmış olduğunu ve bu gruplarda önemli antiinflamatuvar etkinin meydana geldiğini söyleyebiliriz.

4.2. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, U87MG, HUVEC ve THP-1 hücre hatlarında motesanib ve diklofenak dietilaminin sitotoksik etkileri araştırılmıştır. MTT analizleri sonucunda, motesanib ve diklofenak dietilaminin tek başına ve kombineli uygulamaları, hücre canlılıklarını anlamlı derecede azaltmıştır. U87MG hücrelerinde, 40 μ M ve 20 μ M motesanib ile 200 μ M diklofenak dietilaminin gruplarında hücre canlılıklarında %55.65 ile %60.72 arasında önemli bir azalma gözlemlenmiştir. Kombinasyon uygulamaları da benzer şekilde hücre canlılıklarını daha da düşürmüştür.

HUVEC hücrelerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. 40 μ M motesanib ve 200 μ M diklofenak dietilamin uygulamaları, kontrol grubuna göre hücre canlılığını %40.52 ile %62.83 arasında azaltmıştır. Kombinasyon uygulamalarında ise hücre canlılıklarındaki azalma anlamlıdır.

Özellikle U87MG hücrelerinde motesanib ve diklofenak dietilamin kombinasyonlarının kullanımında additif etkinin meydana geldiği belirlenmiştir (CDI değeri 1 ile 1.3 arasında). HUVEC hücrelerinde ise benzer şekilde additif etkiler gözlenmiştir (CDI 1 ile 1.2 arasında).

Hücre proliferasyonu ve migrasyonu üzerine yapılan analizler de önemli bulgular ortaya koymuştur. U87MG hücrelerinde motesanib, konsantrasyon artışıyla hücre proliferasyonunu anlamlı şekilde inhibe etmiştir ve IC50 değeri 23 μ M olarak hesaplanmıştır. HUVEC hücrelerinde ise motesanib konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre migrasyonları azalmış ve özellikle 40 μ M motesanib konsantrasyonunda en yüksek antimigrasyon etkisi gözlemlenmiştir.

Ayrıca, U87MG/THP-1 kokültür ortamında, motesanib ve diklofenak dietilaminin U87MG hücrelerinde apoptotik etkileri artırdığı belirlenmiştir. U87MG hücrelerinde apoptoz oranı özellikle 20 μ M ve 40 μ M motesanib uygulamalarında artmış olup, bu etki diklofenak dietilaminin kombinasyonu ile daha da artış göstermiştir. MTT testi ve CDI değerlendirmeleri ile elde edilen veriler, literatürdeki önceki çalışmalarla uyumlu sonuçlar göstermektedir. THP-1 monosit hücrelerinde ise motesanib ve diklofenak dietilaminin belirgin bir sitotoksik etkisi gözlenmemiştir (Renner vd., 2018; Choy vd., 2005). HUVEC hücrelerinde ise, motesanib ve diklofenak dietilaminin konsantrasyon artışlarına bağlı olarak sitotoksik etkiler belirlenmiştir (Isenberg vd., 2007; Hu vd., 2023). Ayrıca, U87MG glioblastoma hücrelerinde önemli sitotoksikite gözlemlenmesine karşın, sağlıklı HUVEC hücrelerinin kanser hücrelerine kıyasla daha düşük bir duyarlılığa sahip olduğu belirlenmiştir. Mevcut kemoterapi tedavilerinin, kanser hücreleriyle birlikte sağlıklı hücrelere de zarar verdiği bilinen bir gerçektir. Test edilen bileşiklerin sağlıklı hücreler üzerinde daha düşük bir duyarlılık göstermesi, bu bileşiklerin kemoterapide kullanım potansiyeli açısından önemli bir avantaj sağlamaktadır (Hu vd., 2023).

Apoptoz, kaspaz-3 aktivasyonu ve JC-1 pozitif hücre oranları incelendiğinde, motesanib ve diklofenak dietilamin kombinasyonlarının apoptoz süreçlerini önemli ölçüde tetiklediği görülmüştür. Kaspaz-3 aktivasyonunda, özellikle kombinasyon gruplarında daha yüksek oranlar gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, ROS (reaktif oksijen türleri) seviyeleri de artmıştır, kokültür kontrol grubuna göre ise ROS artışları önemli bir farklılık yaratmamıştır. Kanser tedavisinde, hücre proliferasyonunun artışı ile

karakterize edilen hastalıkların tedaviye yönelik yaklaşımlarında, apoptozun indüklenmesi temel bir strateji olarak öne çıkmaktadır (Akşit vd., 2008). Bu doğrultuda, test edilen bileşiklerin ve kombinasyonlarının apoptotik etkileri, Annexin V-PI ve Kaspaz-3 yöntemleriyle detaylı bir şekilde incelenmiştir. Yapılan literatür taramaları sonucunda, LPS'nin *in vivo* deney modelleri ve farklı *in vitro* kanser hücre hatlarında apoptozu tetiklediği bildirilmiştir (Reisser vd., 2002; Wona vd., 2003).

İnflamatuvar yanıtlar üzerine yapılan çalışmalarımızda, U87MG/THP-1 kontrol grubuna göre IL-1 β , TNF- α ve IL-6 seviyelerinde belirgin azalmalar gözlemlenmiştir. Özellikle diklofenak dietilaminin IL-1 β ve TNF- α üzerindeki anti-inflamatuvar etkisi belirlenmiştir. Ayrıca, COX-2 aktivasyonu da hem motesanib hem de motesanib+diklofenak dietilamin kombinasyonlarında azalmıştır. U87 hücrelerinde IL-1 β ve TNF α gibi proinflamatuvar sitokinlerin COX-2 ekspresyonunu belirgin bir şekilde artırdığı daha önce rapor edilmiştir (Taniura vd., 2008). Artan proinflamatuvar sitokin düzeyleri, COX-2'nin indüksiyonuna yol açarak, PGE2 seviyelerinde yükselmeye neden olmakta ve bu durum siklik inflamasyon zincirinin tetiklenmesine yol açmaktadır (Dean ve Hooks, 2023).

Sonuç olarak, motesanib ve diklofenak dietilamin kombinasyonları, U87MG ve HUVEC hücrelerinde sitotoksik, antiproliferatif, antimigrasyon ve apoptoz etkilerini güçlendirmekte, ayrıca inflamatuvar yanıtları azaltmaktadır. Bu bulgular, bu kombinasyonların kanser tedavisinde potansiyel bir strateji olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Hedefe yönelik bir tedavi olan motesanib, tümör gelişimini destekleyen belirli büyüme faktörlerini, özellikle trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörlerini (PDGFR) ve glial hücre kaynaklı büyüme faktörü reseptörlerini bloke ederek çalışır. 2006 yılında Polverino ve arkadaşları, motesanibin VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) yolunu engelleyerek tümörlerin hayatta kalması için gerekli olan kan damarlarının büyümesini yavaşlatabileceğini gösterdi. Hem canlı organizmalarda hem de laboratuvar ortamlarında yapılan deneylerde motesanibin insan endotelial hücrelerinin büyümesini azaltabileceği ve farelerde anormal kan damarı oluşumunu yavaşlatabileceği açıklanmıştır. Cilt kanseri modellerinde (A431 ksenograftları), motesanib yalnızca tümör büyümesini azaltmakla kalmadı, aynı zamanda hayvanlara herhangi bir zarar vermeden sonuçları iyileştirdi.

Coxon ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptığı başka bir çalışma, motesanibin küçük hücreli olmayan akciğer kanserine karşı etkili olduğunu vurguladı ve daha yüksek dozların etkinliğini artırdığını gösterdi. İlginç bir şekilde, motesanibin kemoterapi ilacı doksetaksel ile kombinasyon halinde kullanılması, kombinasyon tedavilerinde iyi sonuçlar verdiğini ortaya koydu.

Meme kanseri üzerine yapılan bir çalışmada, Coxon liderliğinde 2009 yılında yapılan deneylerde motesanib, laboratuvar ortamında kanser hücrelerinin büyümesini etkilemedi. Ancak canlı hayvan modellerinde kullanıldığında, özellikle doksetaksel ile eşleştirildiğinde, tümör boyutunu etkili bir şekilde azalttı. Aynı faydalar, motesanibin başka bir kemoterapi ilacı olan doksorubisin ile kombinasyonunda görülmedi; bu da tedavinin başarısının kullanılan ilaç kombinasyonuna bağlı olabileceğini gösteriyor. Mesane kanseri için motesanib daha fazla potansiyel göstermiştir. Standart bir kemoterapi ilacı olan sisplatin ile birlikte kullanıldığında motesanib tümör büyümesini yavaşlattı, hücre döngüsünde gecikme (hücreleri S fazında tutma) sağladı ve kanser hücrelerinin ölme olasılığını artıran bir dizi değişiklik başlattı (Coxon vd., 2009).

Kaya ve arkadaşlarının 2016'da yaptığı kolon kanseri çalışmalarında da motesanibin potansiyeli ortaya çıkarıldı. Başka bir ajan olan DUP-697 ile kombine edildiğinde, motesanibin tümör büyümesini baskılama ve kanser hücresi ölümünü teşvik etme yeteneği önemli ölçüde arttı (Kaya vd., 2016)

Kanser büyümesini yönetmenin başka bir yaklaşımı, tümörlerin etrafındaki iltihabı hedef almaktır. Diklofenak gibi NSAID'ler (steroidal olmayan antiinflamatuvar ilaçlar), COX-2 adı verilen, iltihaplanma ve tümör ilerlemesinde kritik rol oynayan bir enzimi bloke etme yetenekleri nedeniyle araştırılmıştır. Örneğin kolon kanserinde, COX-2'nin aşırı ekspresyonu artan tümör istilası ve yayılmasıyla ilişkilendirilmiştir (Kolawole ve Kashfi, 2022). Selekokoksib ve diklofenak gibi ilaçlarla COX-2'yi bloke etmek, özellikle metastatik karaciğer kanserinde tümör büyümesini azaltmıştır. Yaygın bir ağrı kesici olan diklofenak, aynı zamanda iltihaplanma yollarını engelleyerek antitümör özellikler de sergilemektedir. Bu da onu kanser tedavisi için ilginç bir seçenek haline getirmektedir (Cheng vd., 2024).

Araştırmalar, başlangıçta farklı amaçlar için tasarlanan bu ilaçların, özellikle inflamasyon ile tümör büyümesi arasındaki karmaşık ilişkiyi hedef aldıklarında, kanserle mücadelede değerli araçlar haline geldiğini ortaya çıkarmaya devam

etmektedir (Lan vd., 2021).

Motesanib, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) ve c-KIT'i inhibe eden bir çoklu tirozin kinaz inhibitörüdür. Önceki klinik ve deneysel kanıtlar, güçlü antianjiyojenik etkilere sahip olduğunu ve tümör anjiyojenezini baskıladığını göstermiştir. Motesanib, esas olarak endotel hücre çoğalması, göçü ve canlılığı ile ilişkili VEGF sinyal yolunu bloke ederek işlev görür. Motesanib, tüm VEGFR'leri (VEGFR-1, -2 ve -3), PDGFR'yi ve kök hücre faktörü reseptörü/CD117'yi inhibe eden küçük bir molekül çoklu tirozin kinaz inhibitörüdür (TKI-KIT). Önceki klinik ve deneysel çalışmalar, motesanib'in güçlü antianjiyojenik etkilere sahip olduğunu ve tümör anjiyojenezini baskıladığını öne sürmüştür. Motesanib, VEGF'yi bloke ederek endotel hücre proliferasyonunu, göçünü ve sağ kalımını etkiler. Motesanib şu anda metastatik meme kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri, kolorektal kanser, gastrointestinal stromal tümörler ve tiroid kanseri dahil olmak üzere birçok kanserin tedavisinde araştırılmaktadır. Ek olarak, çeşitli çalışmalar oküler neovaskülarizasyonu araştırmıştır. Rho ve arkadaşları, 46 erkek sıçanda lazer fotokoagülasyonla indüklenen koroidal neovaskülarizasyon modelinde topikal motesanib ve topikal DMSO damlaları uyguladılar. Topikal motesanib damlalarının topikal DMSO'ya kıyasla koroidal neovaskülarizasyonu önemli ölçüde azalttığını buldular. Polverino ve arkadaşları, oral gavaj yoluyla uygulanan motesanib'in korneal neovaskülarizasyon modelinde, neovaskülarizasyonu doz bağımlı bir şekilde gerilediğini buldular. Dahası, motesanib'in iyi tolere edildiğini ve hayvanların vücut ağırlığı veya genel sağlığı üzerinde önemli bir toksik etkisinin olmadığını belirlediler (Çelenk vd., 2023). Erken klinik öncesi (Polverino vd., 2006) ve klinik (Rosen vd., 2007) çalışmalar, motesanibin katı tümörlerin büyümesini engellediğini göstermiştir. Bu çalışmanın amacı, insan meme kanserinin fare ksenograft modellerinde motesanibin antitümör etkilerini araştırmak ve bu etkileri aracılık eden mekanizmaları incelemektir. Rosen vd., (2007), motesanib tedavisinin hem lüminal hem de lüminal olmayan meme kanseri ksenograftlarında tümör hacminde doza bağlı bir azalmaya neden olduğunu ve buna hem canlı tümör fraksiyonunda hem de tümör kan damarı yoğunluğunda eş zamanlı bir azalmanın eşlik ettiğini göstermeyi amaçladılar. Hayvanlar docetaxel veya tamoksifen ile birlikte motesanib ile tedavi edildiğinde tümör hacminde daha fazla azalma sağlandı ancak bu durumun doksorubisin ile birlikteliğinde görülmediğini bildirdiler. Motesanib'in *in vitro* tümör hücrelerinin büyümesi üzerinde hiçbir etkisi

olmadığını açıkladılar. Motesanib'in antianjiyojenik aktivitesinin bu çalışmada gözlemlenen antitümör aktivitesinin birincil aracı olduğunu düşündürmektedir. Veriler, motesanib'in meme kanseri tedavisi için daha geniş çaplı geliştirilmesini desteklemektedir. Bu çalışmada 3 gün boyunca 3 µmol/L'ye kadar konsantrasyonlarda motesanib ile tedavi, MCF-7, MDA-MB-231 veya Cal-51 hücrelerinin çoğalmasını önemli ölçüde etkilememiştir. Bunun aksine, kemoterapi ajanı docetaxel ile tedavi, üç meme kanseri hücre hattının hepsinden hücre çoğalmasını önemli ölçüde inhibe etmiştir (IC50 = 0,5-0,6 nmol/L). Bu sonuçlar, motesanib'in tümör hücreleri üzerinde doğrudan bir antitümör etkisinin olmamasıyla tutarlıdır. Motesanib ve doksorubisin kombinasyonunun, motesanib kaynaklı anjiyojenez inhibisyonu ile tümör büyümesinin inhibisyonunun tümör hücrelerini doksorubisine duyarlı hale getirmede etkili olduğunu araştırmışlardır. Açıkça, tümörlerin doğasını moleküler düzeyde daha iyi anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu düşündürmektedir (Coxon vd., 2009).

Doğrudan kanıtlanmamış olsa da, STAT-3 fosforilasyonunun kısıtlanması, ibuprofen ve diklofenakın tümör karşıtı etkisinin c-myc ve COX'tan bağımsız bir mekanizmasını oluşturabilir. Diklofenak, kısmen tümör nekroz faktörü α (TNF- α) kaynaklı NF- κ B'nin nükleer translokasyonunu önleyerek apoptozu indükler. Ancak, TNF- α sinyalleme apoptoz indüksiyonuna ana katkıda bulunan unsur değildir ve bu da TNF- α ile diklofenakın diğer inhibitör özellikleri arasında sinerjik bir etki olduğunu desteklemektedir (Leidgens vd., 2015).

Wu vd (2006) tarafından yapılan çalışmada, COX-2'nin VEGF kaynaklı yukarı regülasyonunun p38 MAPK ve JNK sinyal yollarına bağlı olduğunu açıkça göstermektedir. COX-2'nin VEGF tarafından uyarılmasının, HUVEC'lerin sırasıyla güçlü bir seçici p38 ve JNK inhibitörü olan SB203580 ve SP600125 ile inhibe edildiğini göstermişlerdir. VEGF stimülasyonu ile indüklenen p38 ve JNK'nin fosforilasyonu ile birleştiğinde, p38 ve JNK yollarının aktivasyonunun insan vasküler endotel hücrelerinde COX-2 indüksiyonu için kritik olduğunu güçlü bir şekilde ortaya koymaktadır. Vaskülogenez ve anjiyojenezin düzenleyicisi olan VEGF, p38 MAPK ve JNK sinyal yolları yoluyla insan vasküler endotel hücrelerinde hem mRNA hem de protein seviyelerinde COX-2 gen regülasyonunu arttırmaktadır (Wu vd., 2006).

CXCL8 geni tarafından kodlanan pro-inflamatuvar kemotaktik sitokin olan İnterlökin-8 (IL-8), esas olarak makrofajlar ve diğer bağışıklık hücreleri tarafından salgınır ve çeşitli

malignitelerde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Hem kemotaksi hem de nötrofillerin degranülasyonu, etkili bir vaskülarizasyon ajanı olarak hareket eden, kanser hücrelerinin çoğalmasını artıran, prostat kanseri, metastaz ve tümör oluşumunun androjenden bağımsız çoğalmasını düzenleyen ve tümör bölgesinde nötrofilleri infiltre eden IL-8 ile ilişkilidir. Bu kemokin, protein kinaz C (PKC), fosfolipaz C (PLC), fosfoinozitid 3-kinaz (PI3K), mitogenle aktive olan protein kinaz (MAPK), Janus kinaz (JAK), sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) ve Rho-GTPase G protein-eşli reseptörler (sistein-X-sistein kemokin reseptörü (CXCR1, CXCR2) dahil olmak üzere bir dizi efektör molekülü aktive ederek birden fazla aşağı akış sinyal yolunu aktive etmektedir. IL-8 ve reseptörlerinin artan ekspresyonu kanser hücrelerinde karakterize edilmiştir. Etkileyicilerin sayısı ve aşağı akış kaskadı sonucunda, CXCL8 sinyalleme tümör oluşumunu başlatır. İnflamatuvar bir reaksiyon, meme bezi tümörleri, prostat kanseri ve yumurtalık kanseri ile ilgili temel bilgileri üretebildiği için bir hasta sağkalım prognostik belirteci olarak kullanılabilen kemotaktik sitokin molekülü interlökin-8 (IL-8) tarafından tetiklenir. IL-8 sinyallemesinin kanser hücrelerinde kemoterapötik direnç sağladığı gösterilmiştir. IL-8 kaskadının ekspresyonunu azaltmak, kanser tedavisi için tümör mikroçevresini hedef alırken önemli bir fayda sağlayabilir (Mir vd., 2023).

İnterlökin (IL)-6, konakçının bağışıklık savunmasını aracılık etmede önemli bir rol oynar. Makrofajlar, dendritik hücreler, fibroblastlar, mast hücreleri, vasküler endotel hücreleri, monositler, T hücreleri, B hücreleri vb. dahil olmak üzere birden fazla hücre tipi IL-6 üretiminde yer alır. Ayrıca, tümörlere sızan stromal hücreler, bağışıklık hücreleri ve tümör mikroçevresinde bulunan kanser hücreleri de IL-6 üretmekten sorumludur. IL-6'nın kan seviyeleri fizyolojik seviyelerde (1–5 pg/ml) neredeyse fark edilmese de, ani bir inflamatuvar reaksiyon sırasında 100.000 kattan fazla arttığı gözlemlenmiştir. IL-6'nın yüksek yoğunlukları neredeyse tüm insan kanserlerinde tanımlanmıştır. Tümör mikroçevresinde IL-6'nın aşırı ekspresyonu, kansere yol açan tüm yolları kontrol ederek karsinogenezi uyarır. İki tipte interlökin-6 reseptörü vardır: birincisi IL-6'nın hücre zarına bağlı reseptörünü (IL-6R) içerir. IL-6, IL-6R ile bağlandığında glikoprotein 130 (gp130) (bir sinyal dönüştürücü) ile bir kompleks oluşturur ve böylece anti-inflamatuvar aktivite gösteren klasik sinyal yolu aktive olur. İkinci tip, interlökin-6 reseptörünün çözünür bir türevini, yani çözünür IL-6R'yi (sIL-6R) içerir. IL-6'nın sIL-6R'ye bağlanması üzerine, bir zarla ilişkili sinyal dönüştürücü

(gp130) kompleksi oluşur ve trans-sinyalizasyon aktive olur. Örneğin, Ras/Raf/mitogen-aktif protein kinaz (MAPK), Janus kinaz/transkripsiyonun sinyal transdüktörü ve aktivatörü (JAK/STAT), fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K) veya Src/ilişkili protein (Src/YAP) gibi sinyal yolları, inflamatuvar aktivite gösterir ve bunun sonucunda aktive olurlar. Neredeyse tüm insan maligniteleri kandaki daha yüksek IL-6 seviyeleriyle ilişkilidir (Mir vd., 2023).

Siklooksijenaz (COX) enzimleri inflamasyon ve kanser gelişiminde çok önemlidir. Özellikle COX-2, tümör büyümesi, anjiyogenez ve bağışıklık kaçışında rol oynar. Son zamanlarda, COX-2 inhibitörleri kanser tedavisinde potansiyel terapötik ajanlar olarak ortaya çıkmıştır. Ek olarak, COX inhibitörlerini diğer tedavi yöntemleri ile birleştirmek, terapötik etkinliği iyileştirme potansiyelini göstermiştir. COX inhibisyonunun, hem tek başına hem de diğer yöntemlerle birlikte, çeşitli kanserlerde sinyal yolları ve karsinogenez üzerindeki etkilerini araştırılmıştır. Rodrigues vd (2024) tarafından yapılan çalışmada, COX-2 mekanizmaları, COX-2 inhibitörleri, COX-2 inhibitörleriyle monoterapi ve COX-2 inhibitörlerinin tümörlerde kemoterapötik ajanlarla birleştirilmesi üzerine önde gelen araştırmalar dahil olmak üzere tüm büyük akademik veri tabanlarında (PubMed, Scholar google) bir literatür taraması yapılmıştır. Çalışma, klinik öncesi ve klinik kanıtları kapsamakta ve klinik uygulama için potansiyel çıkarımları vurgulamaktadır. Klinik öncesi çalışmalara göre, tümör hücresi çoğalması, sağkalımı, invazyonu ve metastazında rol oynayan çoklu sinyal yolları COX'u inhibe ederek baskılanabilir. Ek olarak, COX inhibitörlerini kemoterapi ilaçları, hedefli tedaviler, immünoterapiler ve miRNA tabanlı yaklaşımlarla birleştirmek anti-tümör aktivitesini artırmıştır. Bu sonuçlar, kombinasyon tedavinin direnç mekanizmalarını aşma ve tedavi sonuçlarını iyileştirme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Ancak, kombinasyon rejimlerini seçerken ve uygularken dikkatli olunmalıdır. COX-2 inhibitörlerinin diğer ilaçlarla olan tüm kombinasyonları sinerjistik etkilere yol açmaz; bazıları olumsuz etkileşimlere bile sahip olabilir. Bu nedenle, kanserin ve ilgili ilaçların spesifik özelliklerini dikkate alan kişiselleştirilmiş yaklaşımlar, terapötik stratejileri optimize etmek için çok önemlidir. Sonuç olarak, monoterapi veya diğer yöntemlerle birlikte kullanıldığında, COX inhibisyonu çeşitli kanserlerde sinyal yollarını düzenleme ve karsinogenezi engelleme konusunda umut vaat etmektedir. COX inhibisyonunun ve kombinasyon tedavisinin kanser tedavisi sonuçlarını iyileştirmedeki etkinliğini tamamen açıklamak için ek çalışmalar ve iyi tasarlanmış klinik çalışmalara ihtiyaç

vardır (Rodrigues vd., 2014).

Hedefli tedaviler ile konvansiyonel kemoterapi ajanlarının kombinasyon tedavileri hala araştırma konusudur ve akciğer kanseri ve meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde klinik olarak başarılı oldukları kanıtlanmıştır (Miller vd., 2005; Sandler vd., 2006). Hem hücre çoğalmasını hem de tümör vaskülarizasyonunu hedefleyerek, edinilmiş ilaç direnci potansiyelini en aza indirirken sinerjistik antitümör aktivitesi elde edilebilir. Motesanib'in sitotoksik ajan dosetaksel ve östrojen reseptör modülatörü tamoksifen ile birleştirildiğinde, her iki tedavinin tek başına uygulanmasına kıyasla tümör hacminde artmış bir azalma sağlandığını göstermektedir. Dosetakselin daha önce VEGFR2 sinyallesinin inhibisyonu ile güçlendirilebilen antianjiyojenik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Sweeney vd., 2001). Motesanib ile dosetaksel kombinasyonu ile gözlenen tümör hacmindeki azalma üzerindeki etki, dosetakselin antitümör aktivitesini artırabilen VEGF sinyallesinin inhibisyonundan kaynaklanıyor olabilir. Motesanib'in taksanlarla kombinasyon halinde potansiyel kullanımı şu anda çeşitli tümör tiplerinin ksenograft modellerinde araştırılmaktadır. Kombinasyon çalışmalarda, hem motesanib hem de test edilen kemoterapi ajanlarının submaksimal dozlarının, katkısız aktiviteyi araştırmak için kullanıldığı belirtilmelidir. Maksimum dozlarda daha da büyük antitümör aktivitesi görülebileceği de ifade edilmektedir. Genel olarak, bu veriler solid tümörlü hastalarda kemoterapi ajanlarıyla kombinasyon halinde motesanib'in güvenliğini ve etkinliğini araştıran ve önemli bir ilaç etkileşimi veya toksisite göstermeyen ilk klinik çalışmalarla tutarlıdır (Price vd., 2007; Schwartzberg vd., 2007). Özellikle, lokal olarak tekrarlayan veya metastatik meme kanserinin motesanib ve dosetaksel ile kombinasyon tedavisi tolere edilebilir olup, her iki ajanın farmakokinetik profili üzerinde belirgin bir etki yoktur (Coxon vd., 2009). Motesanib ile tedavinin, insan lüminal (MCF-7), mezenkimal (MDA-MB-231) ve karma/progenitor (Cal-51) meme kanseri hücre hatlarından türetilen ksenograftlarda yapılan bir çalışmada, doza bağlı olarak tümör büyümesinin önemli bir inhibisyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Dahası, motesanib ile sitotoksik kemoterapi ajanı dosetaksel veya östrojen reseptör modülatörü tamoksifen kombinasyonunun, her iki ajanın tek başına kullanıldığı tedaviye kıyasla tümör hacminde önemli ölçüde azalmaya yol açmıştır. Veriler, motesanib tedavisinin tek başına veya kemoterapi ile kombinasyon halinde farklı meme kanseri alt tiplerinin yönetiminde geniş uygulanabilirliğini önermekte ve bu tedavi rejimlerinin klinik çalışmalarda daha fazla geliştirilmesini

önermektedir (Coxon vd., 2009).

Fredrikson vd (2011) tarafından diklofenak/sitokin kaynaklı stres sinyalinin hepatosit apoptotik hücre ölümündeki rolünün araştırıldığı bir çalışmada, diklofenak tek başına hücre ölümünde konsantrasyona bağlı hafif bir artışa neden olmuştur. TNF- α tek başına kullanıldığında apoptoz gözlenmemesine rağmen, diklofenak ile kombinasyon halinde TNF- α ilavesi apoptozun 2 kat artmasına neden olmuştur. TNF- α , HepG2 hücrelerinin diklofenak kaynaklı hücre ölümünü arttırmış ve bu hücre ölümü, kaspaz-8/Bid/APAF1 kaskadına ve kaspaz-3 aktivitesine bağlı olan apoptoz meydana getirmiştir. Diklofenak/TNF- α sinerjisi, NF κ B fosforilasyonunun bozulması ve ardından NF κ B 'nin nükleer alana diferansiyel translokasyonu ile ilişkili olan TNF- α kaynaklı NF κ B aktivitesinin inhibisyonuna neden olmuştur. Diklofenakın TNF- α sinyal programını etkilediği, böylece NF- κ B'nin antiapoptotik etkilerini önlediği ve JNK ve ölüm reseptörü aracılı mitokondriyal apoptoza neden olduğu açıklanmıştır (Fredrikson vd., 2011).

NSAID'lerin farklı hücresel mekanizmalar sayesinde tümör oluşumunu ve kanser ilerlemesini baskıladığı bildirilmiştir COX yoluna alternatif olarak ortaya çıkan etki mekanizmaları, özellikle peroksizom proliferatör aktiveli reseptör gama (PPAR γ) olmak üzere nükleer reseptör aktivitesinin modülasyonudur. PPAR γ , yağ asidi metabolizmasında rol oynar ve yağ hücrelerinin ve makrofajların farklılaşmasını kontrol eder. Ayrıca inflamatuvar süreçlerde de rol oynar ve tümör hücresi çoğalmasını baskılamada rol oynadığı gösterilmiştir (Dermond ve Rüegg, 2001). COX'un tümör ilerlemesindeki rolü de kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Tangrea vd., 2003; Wang vd., 2011; Hashemi Goradel vd., 2019; Zappavigna vd., 2020). Díaz-Rodríguez vd (2012) 1 ve 10 μ mol/L diklofenak ile 24 saatlik inkübasyondan sonra tedavi uygulanmayan MG-63 hücrelerine kıyasla hücre çoğalmasında önemli azalmalar meydana getirdiği bulunmuştur. Gottfried vd (2013) diklofenakın MYC (transkripsiyon faktörlerini kodlayan bir düzenleyici gen ve protoonkogen ailesi) ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığını ve glikoz metabolizmasını düzenleyerek *in vitro* melanom, lösemi ve karsinoma hücre hattı proliferasyonunun bozulmasına neden olduğunu gösterilmiştir. Hixson vd (1994) 18 farklı NSAID'nin (diklofenak dahil) HT-29, SW480 ve DLD-1i insan kolon kanseri hücreleri için IC50 değerleri araştırılmıştır. Diklofenak, HT-29 hücreleri için IC50 değeri 55 μ mol/L iken (DLD-1 hücreleri için de benzer sonuçlar elde edilmiştir), SW480 için IC50 önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (170 μ mol/L) (Arisan vd., 2018). Hücre hattına bağlı olarak

farklı potansiyele sahip benzer sonuçlar Al-Nimer vd. (2015) nin çalışmasında da gözlemlenmiştir. NSAID'lerin (diklofenak dahil) geniş spektrumlu ve pleiotropik antineoplastik etkilere sahip olduğu ve bu da potansiyel antikanser ajan olarak daha fazla farmakolojik değerlendirmelerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Yapılan çalışmalarda, diklofenakın (analjezik, anti-inflamatuvar ve antipiretik özelliklere sahip, yaygın olarak reçete edilen bir NSAID, çeşitli akut ve kronik ağrı ve inflamatuvar durumların tedavisinde yaygın olarak kullanılır) *in vitro* da çeşitli hücre hatlarının büyümesini engellediğini ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Díaz-Rodríguez vd., 2012; Gottfried vd., 2013; Hixson vd., 1994; Arisan vd., 2018; Al-Nimer vd., 2015; Arisan vd., 2019; Yang vd., 2021). 0,4 mmol/L konsantrasyonundaki diklofenak, insan melanomu (MelIm) ve miyeloid lösemi (U937) hücre hattının *in vitro* çoğalmasını önemli ölçüde bastırmıştır. Canlı U937 hücrelerinin sayısı, 0,1 mmol/L ve 0,2 mmol/L konsantrasyon için sırasıyla %45 ve %31 olarak belirlenmiştir. Buna karşılık, aynı konsantrasyonlardaki diklofenak, normal kan monositlerinin canlılığını etkilememiştir (Gottfried vd., 2013). 50 µg/mL konsantrasyonda diklofenak tedavisi, HepG2 hepatosellüler karsinom (HCC) hücre hattının çoğalmasını önemli ölçüde azaltmıştır (Yagi vd., 2014). Marinov vd (2021) tarafından yapılan bir çalışmadan elde edilen bulgular yukarıdaki çalışmalarda incelenen tüm konsantrasyonlarda diklofenakın üç tümör hücre hattının proliferasyonunu azalttığını ve bu inhibisyonun doza bağlı olduğunu göstermiştir. 24 saatlik tedaviden sonra, inhibitör etki HT-29'da (kolorektal kanser) en güçlü ve diğer iki hücre hattında (HeLa ve MCF-7) hemen hemen aynı olarak belirlenmiştir. En düşük hücre canlılığı, 400 µg/mL diklofenakta HT-29'da $29,32 \pm 1,31$ olarak bulunmuştur. Çalışmanın 48. saatinde, en güçlü inhibisyon MCF-7 hücrelerinde görülmüş ve 400 µg/mL konsantrasyonunda hücre canlılığı $14,57 \pm 4,89$ olarak tespit edilmiştir. Leidgens vd (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, diklofenakın insan glioblastoma hücre hatlarına (HTZ-349, U87MG ve A172) karşı *in vitro* anti-proliferatif etkisinin, fizyolojik olarak önemli olan 50 µmol/L ile 200 µmol/L arasındaki konsantrasyonlarda olduğu göstermiştir. Benzer şekilde, 200 µmol/L'nin altındaki diklofenak konsantrasyonları hücre büyümesini inhibe etmiş ve 300 µmol/L'nin üzerindeki konsantrasyonlar kültürlenmiş GL261 glioma hücrelerinde önemli hücre ölümüne neden olmuştur (Chirasani vd., 2013). Başka bir çalışmada, diklofenak (20-200 µmol/L aralığında) en güçlü aktiviteyi göstererek apoptozu indüklemiş ve yumurtalık kanseri hücre hatlarında (SKOV-3, CAOV-3, SW626 ve 36M2) hücre büyümesini

engellemiştir (Zerbini vd., 2011). HEY ve OVCAR5 hücrelerinde 50 µmol/L konsantrasyonlarda ve UCI-101 hattında 250 µmol/L konsantrasyonlarda diklofenak tedavisinden 24 saat sonra yumurtalık kanseri hücre hatlarının hücre canlılığının önemli ölçüde azaldığı da rapor edilmiştir (Valle vd., 2013). Üç insan kolon kanseri hücre hattında (HT-29, SW480 ve DLD-1) diklofenakın *in vitro* anti-proliferatif etkisi sırasıyla 55 µmol/L, 37 µmol/L ve 170 µmol/L'lik IC50 değerlerinde belirlenmiştir (Hixson vd., 1994). Başka bir çalışmada HT-29 hücreleri için diklofenakın 24. ve 48. saatlerde belirlenen IC50 değerleri sırasıyla 111,29 µg/mL (350 µmol/L) ve 78,97 µg/mL (248 µmol/L) olarak bulunmuştur. Diklofenakın reaktif oksijen türleri (ROS), Akt, kaspaz-8 ve Bid tarafından düzenlenen mitokondriyal fonksiyonların modülasyonu yoluyla promyelositik lösemi hücrelerinin (HL-60) büyüme inhibisyonu ve apoptozunu indüklediği gösterilmiştir. Diklofenakın seçici apoptotik etkisi iki insan melanom hücre hattı olan A2058 ve SAN için gösterilmiştir, buna karşın insan malign olmayan fibroblast hücre hattı olan BJ-5ta'da önemli bir etki gözlenmemiştir (Marinov vd., 2021).

Glioblastomalar (GBM), gelişmiş mitotik aktivite ve anjiyojenez ile karakterize kötü huylu beyin tümörleri olarak bilinmektedir. Kombine tedavi yaklaşımlarına rağmen, tanı sonrası ortalama sağkalım süresi standart tedavi ile 14.6 ay ile sınırlıdır (Stupp vd., 2015). Bu nedenle, bu tümörler için yeni tedavi arayışları devam etmektedir. İbuprofen ve diklofenak gibi steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (NSAID'ler) böyle bir yaklaşım için aday olabilir. Son veriler, NSAID'lerle tedavinin çeşitli kanser tiplerinin riskini azalttığını (Cha ve DuBois, 2007; Abnet vd., 2009; Harris vd., 2006) ve solid tümörlerde tümör büyümesini azalttığını (Cha ve DuBois, 2007; Johnsen vd., 2004) göstermektedir. Geleneksel NSAID'ler seçici olmayan COX-1 ve -2 inhibitörleridir. COX-2'nin seçici olmayan inhibisyonu, prostaglandin sentezinin azalmasına neden olur (Ulrich vd., 2006) ve prostaglandin E2, tümör hücresi proliferasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Lin vd., 2001). Ek olarak, NSAID tedavisiyle tümör hücresi çoğalmasının inhibisyonu (Taketo, 1998) ve apoptozisin indüklenmesinin (Song vd., 2002; Joe vd., 2003) de COX'tan bağımsız mekanizmalar yoluyla gerçekleştiği açıklanmıştır. Ek olarak, diklofenak, kısmen tümör nekroz faktörü α (TNF- α) kaynaklı NF- κ B'nin nükleer translokasyonunu önleyerek apoptozu indükler. Ancak, TNF- α sinyalleme apoptoz indüksiyonuna ana katkıda bulunan unsur değildir ve bu da TNF- α ile diklofenakın diğer inhibitör özellikleri arasında sinerjik bir etki olduğunu desteklemektedir (Leidgens vd., 2015) .

Yamazaki vd (2006) tarafından yapılan çalışmada diklofenakın anti-apoptotik etkisi ve PG azaltıcı etkisi arasında doz-cevap korelasyonu olmadığı saptanmıştır. Araştırmacılar aynı zamanda, SH-SY5Y hücre hattında iki tip ER stresi tarafından uyarılan hücre ölümü üzerinde PGE2'nin etkilerini de incelemişlerdir. PGE2'nin uygulanmasının diklofenak tarafından üretilen anti-apoptotik etkilere karşı hiçbir etki göstermediği saptanmıştır. Bu sonuçlar diklofenakın anti-apoptotik etkisinin COX inhibitör aktivitesinden bağımsız görüldüğünü düşündürmüştür. Diklofenak ve NSAID'nin ER stres kaynaklı apoptozu engellediği rapor edilmiştir. NSAID'lerin bu inhibe edici etkisi PG üretimiyle ilişkili olmadığı ve kaspaz-2 aktivasyonu yoluyla içsel apoptotik yolun aktivasyonunu baskılayarak olduğu açıklanmıştır. Bu veriler, NSAID'lerin anti-nörodejeneratif ilaçlar olarak yeni uygulamalarının olasılığını göstermektedir. ER stresi ve nörodejenerasyona karşı koymada önemli bir rolü olabilecek diklofenak'ın anti-apoptotik etkisinin altında yatan mekanizmayı daha ayrıntılı olarak belirlemek için çalışmalar devam etmektedir (Yamazaki vd., 2006).

Klinik tedavide siklooksijenaz inhibitörleri olarak yaygın olarak kullanılan steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAID'ler), bazı kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkiler de göstermiştir. Özellikle, en yaygın NSAID'lerden biri olan diklofenak, hücrel redoks durumunu değiştirerek birçok tümör hattında anti-proliferatif etki göstermektedir. Son birkaç yılda, NSAID'lerin apoptozu ve hücre döngüsü durmasını indükleyerek, bazı kanserlerin gelişimini olumsuz etkileyebileceği bildirilmiştir (Hosomi vd., 2000; Rao ve Reddy, 2004). Özellikle, diklofenak hücrel redoks durumunu değiştirerek birçok kültürlenmiş hücre hattında sitotoksik etkiye sahiptir (Kusuhara vd., 1999; Hickey vd., 2001). Ayrıca, bir çalışmada diklofenakın bir nöroblastoma hücre dizisi olan SH-SY5Y'de apoptozu indükleyerek mitokondriyal disfonksiyona neden olduğu bildirilmiştir (Cecere vd., 2010). Gerçekten de, SH-SY5Y'nin diklofenak ile tedavisi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücre içi seviyesini artırmış ve mitokondriyal antioksidan enzim olan süperoksit dismutazın (SOD2) hem protein seviyelerini hem de enzimatik aktivitesini azaltmıştır. Yapılan bir çalışmada hücre içi ROS seviyelerinin DCFH-DA ile ölçümlerine ilişkin olarak, floresan yoğunluğunda bir artış yalnızca hem A2058 hem de SAN hücrelerinde diklofenak ile daha uzun bir inkübasyondan sonra belirginleşmiş, ancak BJ-5ta hücrelerinde diklofenak tedavisi sonrasında ROS seviyelerinde hiçbir artış tespit edilmemiştir. Diklofenak'ın benzer bir etkisinin diğer kanser hücre hatlarında da rapor edildiği

bildirilmiştir (Kusuhara vd., 1999; Hosomi vd., 2000; Benamouzig vd., 2001; Zerbini vd., 2011). Albano vd (2013), diklofenak'ın A2058 ve SAN melanom hücreleri için sitotoksik olduğunu, ancak kötü huylu fibroblast BJ-5ta'da önemli bir etki görülmediğini açıklamışlardır. Özellikle, diklofenak tedavisi ile melanom hücrelerinin apoptotik bir mekanizma yoluyla öldüğünü, bunun da hücre içi ROS seviyelerinin artması, Bcl-2/Bax oranının azalması, sitokrom c'nin mitokondriyal salınımı, kaspaz-9 ve -3 aktivitesinin artması, SOD2 protein seviyelerinin azalması ve bu mitokondriyal enzimin sitozolik translokasyonu gibi diğer olaylarla ilişkili bir süreç olduğunu göstermişlerdir. Diklofenak kaynaklı apoptozisin zamana göre etkisini değerlendirmek için, melanom hücre hatlarında apoptozu indükleyen en düşük diklofenak konsantrasyonunu olarak 150 µM diklofenak ile hücreler nkübe edilmiş ve 24 saat sonra, sub-diploid DNA içeriğine sahip çekirdeklerin sayısı hem A2058'de hem de SAN hücrelerinde da artmaktarken, fibroblast hücre hattı BJ-5ta'da herhangi bir etki gözlenmemiştir. 48 saatlik ilaç uygulanmasından sonra, apoptotik süreç daha belirgin hale gelmiştir. Malign kanser hücreleri, malign olmayan benzer kanser hücreleriyle karşılaştırıldığında genellikle daha yüksek hücre içi ROS seviyelerine sahiptir (Szatrowski ve Nathan, 1991; Toyokuni vd., 1995; Ralph vd., 2010). Bu oldukça reaktif moleküller, hücresel çoğalmayı düzenler ve sonunda onkojenik hücre dönüşümüne neden olurlar (Storz, 2005) . ROS ayrıca neoplastik hücrelerin ortaya çıkmasına ve yayılmasına karşı doğal savunmaların aktivasyonunda da rol oynar (Pani vd., 2004) . Her iki melanom hücresinde tespit edilen hücre içi ROS'un gözlemlenen artışı, muhtemelen diklofenak kaynaklı apoptoza katkıda bulunmaktadır. Özellikle, ilacın detoksifikasyonunda yer alan bazı enzim sistemlerinin aktivitesinden kaynaklanan süperoksit anyonlarının erken artışı (Gómez-Lechón vd., 2003), daha sonraki bir aşamada diğer ROS'ların oluşumunu tetikleyebilir (Albano vd., 2013).

Akhondzadeh vd (2009), COX inhibitörlerinin proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltarak depresif semptomların tedavisinde önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir. Guo vd (2009), COX inhibitörü ile kronik tedavinin sıçan beyinde siklooksijenaz-2 ekspresyonunu azaltarak kronik öngörülemeyen stres kaynaklı depresif benzeri davranışı tersine çevirdiğini bulmuşlardır. TNF- α ve IL-10, bağışıklık sisteminde tamamen zıt rollere sahip iki önemli sitokindir. TNF- α , proinflamatuvar bir bileşik iken IL-10 antiinflamatuvar bir bileşiktir. Bir çalışmada diklofenak, farklı antidepresanlar (sertralin, venlafaksin ve fluvoksamin) ve B6 vitamininin (piridoksin)

IL-10 ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) üzerindeki etkileri, lipopolisakkarit (LPS) ile indüksiyon olsun ya da olmasın, 2 günlük İsviçre-Albino farelerinden alınan astrositlerin *in vitro* kültüründe araştırılmıştır. Diklofenak ve sertralin, astrosit kültüründe anti-inflamatuvar sitokin (IL-10)'u önemli ölçüde iyileştirirken, LPS ile indüklenen pro-inflamatuvar medyatörlerin (TNF- α) yükselmiş seviyesini baskıladığı bildirilmiştir (Al-Amin vd., 2013).

Monositler ve makrofajlar üzerinde ifade edilen TLR4, hücre dışı lpsin açısından zengin bir tekrarlamaya alanına ve hücre içi interlökin-1R (IL-1R) sinyalleme alanına sahiptir. TLR4'ün ligandı olan LPS ile etkileşimi, adaptör molekül MyD88'in (miyeloid farklılaşma faktörü 88) devreye girmesi, IRAK'ın (IL-1 reseptörüyle ilişkili kinaz) fosforilasyonu ve ardından TRAF6 [TNF (tümör nekroz faktörü) reseptörüyle ilişkili faktör 6] ile sonuçlanır. TRAF6, MAPK (mitogenle aktive olan protein kinaz) yolunu ve NF- κ B'yi aktive eden TAK1[TGF- β (dönüştürücü büyüme faktörü β)-aktive edilmiş kinaz] fosforilasyonuna yol açar ve bunu proinflamatuvar sitokinler tümör nekroz faktörü (TNF) ve IL-1 β 'nin aktivasyonu izler (Fukata ve Abreu, 2007; McGuire ve Arthur, 2015). Tollip, IRAK'a bağlı bir Toll/IL-1R (TIR) alanı içeren inhibitör proteindir (Burns vd., 2000). Tollip ekspresyonu, LPS'ye zayıf yanıt veren bağırsak epitel hücrelerinde yüksektir. Dahası, Tollip ekspresyonu LPS veya LTA ile tedavi edilen bağırsak epitel hücrelerinde artar ve PAMP'lere karşı düşük yanıtla ilişkilidir. PPAR-gama da bu yolun önemli negatif düzenleyicileridir. TLR sinyal yolunun aktivasyonu doğal bağışıklık tepkisi ve edinilmiş bağışıklık ile ilişkilidir ve vücudu korumada rol oynar. Etkili bir şekilde kontrol edilmeden sürekli olarak aktive edilirse vücutta kronik hasara neden olabilir. TLR sinyal yolunun dengesizliği, bulaşıcı hastalıkların, kronik inflamasyonun ve tümörlerin patogeneğinde önemli bir rol oynar. Lornoxicam'ın LPS ile uyarılan THP-1 hücrelerinde 54 μ M'lik bir IC50 değeriyle IL-6 oluşumunu doza bağlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. 300 μ M'de IL-6 salgılanmasının %89'luk inhibisyonu gözlemlendi. TNF- α , IL-1 β ve IL-8 üretimi yalnızca hafif bir şekilde etkilendi (Berg vd., 1999). NSAID'lerin TLR4/NF- κ B sinyal yolu tarafından indüklenen IL-6 artışını inhibe edileceği öne sürülmüştür (Xu vd., 2021).

Enflamasyon hem karsinogenez hem de tümör büyümesinin ilerlemesiyle oldukça ilişkilidir (Le Bitoux ve Stamenkovic, 2008). Epidemiyolojik çalışmalar, kronik

enflamasyonun hastaları kanser gelişimine yatkın hale getirdiğini ve steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaçların (NSAID'ler) uzun süreli kullanımının çeşitli kanser riskini azalttığını göstermektedir. Siklooksijenazlar (COX-1 ve -2), araşidonik asitten prostaglandin (PG) üretiminde hız sınırlayıcı enzimlerdir. COX-1 ekspresyonu genellikle yapısaldır, COX-2 ise genellikle inflamatuvar yanıtlarla ilgili uyarıcılar tarafından indüklenir. COX-2'nin birincil metaboliti olan prostaglandin E2'nin (PGE2), hücre sağ kalımını, çoğalmasını ve anjiyogenezisini desteklediği ve apoptozu ve antitümör bağışıklık yanıtını engellediği, tüm bu süreçlerin kanser gelişimini desteklediği gösterilmiştir. En eski NSAID'lerden biri olan diklofenak 1976'dan beri kullanılmaktadır. Diklofenak siklooksijenazları seçici olmayan bir şekilde inhibe eder. İnsanlarda yapılan çalışmalar, COX-2 aktivitesinin %94'ünü ve COX-1 aktivitesinin %49'unu azalttığını göstermiştir (Van Hecken vd., 2001). *İn vitro* olarak, araşidonik asit ve lizofosfolipid serbest bırakarak proinflamatuvar eikozanoidler (PGE2 dahil) ve trombosit aktive edici faktör üreten enzim olan fosfolipaz A2'yi (PLA2) güçlü bir şekilde inhibe eder (Mäkelä vd., 1997). Diklofenakın *in vivo olarak* PLA2'yi de inhibe ettiği gösterilmiştir. Diklofenakın hem COX-2 hem de PLA2'yi güçlü bir şekilde inhibe etme yeteneği ışığında, Mayorek vd (2010), pankreas kanseri fare modelinde antikanser potansiyelini araştırmıştır. Burada diklofenak tedavisinin tümör boyutunda %60'lık bir azalmaya neden olduğu bildirmektedirler. Bu, tümör hücrelerinin artan apoptozundan kaynaklanmaktadır. Bu etkinin dolaylı olduğunu ve en az iki mekanizma aracılığıyla işlediğine dair kanıtlar sunmaktadırlar. İlk olarak, diklofenak, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) tümör içeriğinde güçlü bir azalma, mikrovasküler yoğunlukta azalma ve tümör kan damarlarında morfolojik değişikliklerle gösterildiği gibi önemli bir antianjiyogenik etki sağlar. İkinci olarak, diklofenak tedavisi tümör stroma hücrelerinde, peritoneal makrofajlarda ve beyaz kan hücrelerinde arginaz aktivitesini önemli ölçüde artırır, çünkü COX-2 inhibitörlerinin arginaz inhibisyonu yoluyla tümör büyümesini azalttığı gösterilmiştir (Mayorek vd., 2010).

Mayorek vd (2010) tarafından yapılan çalışmada PANC02 hücreleri ile aşılınmış farelere diklofenak tedavisinin (11 gün boyunca 30 mg/kg/vücut ağırlığı) tümör ağırlığını %60 oranında azalttığı ve tümör hücrelerinin artan apoptozuyla korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Bu etki *in vitro* kültürlenmiş PANC02 hücrelerinde gözlenmediğinden, diklofenakın yararlı tedavisinin *in vivo* mevcut diğer medyatörleri içerdiği bildirilmiştir. Gerçekten de diklofenak, tümördeki ve karın boşluğu sıvısındaki

VEGF'yi aşığı düzenleyerek tümör vaskülarizasyonunu önemli ölçüde azalttığı görölmüştür. Dahası, diklofenak doğrudan *ex vivo* vasküler filizlenmeyi inhibe etmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde, diğer COX-2 inhibitörlerinin aksine diklofenak, tümör stroma hücrelerinde, peritoneal makrofajlarda ve beyaz kan hücrelerinde arginaz aktivitesini/arginaz 1 protein içeriğini sırasıyla 2.4, 4.8 ve 2 kat artırmıştır. Araştırmacılar arginin eksikliğinin ve serum ve periton boşluğundaki NO düzeylerinin azalmasının, yetersiz beslenme ve zayıf damar gelişimi yoluyla tümör büyümesinin inhibisyonuna katkıda bulunduğunu ileri sürmektedirler. Diklofenakın vasküler hücreleri doğrudan etkileyebileceği olasılığı da test edilmiştir. Diklofenak kültürlenmiş PANC02 üzerinde pro-apoptotik ve anti-VEGF etkisi yaratamazken, antianjiyojenik etkisi *ex vivo olarak* gösterilmiştir. 10 µM diklofenak sıçan aort halkalarıyla birlikte inkübe edildiğinde, filizlenmede belirgin bir inhibisyon sağlamıştır. Bu, diklofenakın endotel/düz kas hücrelerinin gelişimini doğrudan inhibe edebileceğini düşündürmektedir.

Apoptozis ve bağışıklık gözetimi düzenlenmesinde önemli olmasının yanı sıra, COX'un anjiyojenezin düzenlenmesinde güçlü bir şekilde yer aldığı kabul edilmiştir. Meme kanseri, kolon kanseri ve yumurtalık kanseri hücre hatları kullanılarak yapılan hücre kültürü deneyleri, ana mekanizmalardan birinin vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ailesinin proanjiyogenik büyüme faktörlerinin, özellikle de kan damarı neoformasyonunun merkezi düzenleyicisi olan VEGF-A'nın indüklenmesi olduğunu göstermektedir. Bu kavram, tümörlerdeki mikro damar yoğunluğunun artan COX-2 ekspresyon seviyeleriyle arttığını gösteren kolon kanseri örnekleri üzerinde de doğrulanmıştır. Sonuç olarak, NSAID'lerin antitümör etkisi kısmen antianjiyojenik nitelikte kabul edilir. Akciğer adenokarsinomu örnekleri üzerinde yapılan çalışmalar, lenfanjiyojenik faktör VEGF-C'nin indüksiyonu yoluyla COX-2'nin lenfanjiyojenezin düzenlenmesinde de yer alabileceğini göstermektedir (Burkhard vd., 2005). Diklofenakın COX inhibisyonuna atfedilen antitümör etkisinin yanı sıra, mitokondriyal aktiviteyi etkilemesi nedeniyle COX'tan bağımsız yeni etkiler de gösterdiği görölmüştür. Mitokondriyal aktivitedeki azalma, diklofenakın tümör hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisine katkıda bulunabilir. Diklofenakın hem transkripsiyon faktörü MYC'nin hem de laktat taşıyıcılarının inhibisyonuna neden olarak tümör hücresi proliferasyonunu hedeflediği gösterilmiştir. Diklofenakın mitokondriyal aktiviteyi etkilemesi nedeniyle COX'den bağımsız yeni antitümör etkileri gösterilmiştir. Ayrıca

DCF'nin bazal ve bağımsız solunumu uyardığı, ATP sentezini inhibe ettiği ve mitokondride membran potansiyelini çökerttiği gözlenmiştir. Mitokondriyal aktivitenin azalması diklofenakın tümör hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisine katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Intini vd., 2017).

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, motesanib, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının U87MG ve HUVEC hücrelerinde önemli antiproliferatif etkileri olduğu belirlenmiştir. Motesanib HUVEC hücrelerinde konsantrasyon artışına bağlı olarak antianjiyojenik etkiler meydana getirmiştir. U87MG/THP-1 kokültür modelinde de, glioma hücrelerinde motesanib ve diklofenak dietilamin kombinasyonlarının, önemli apoptotik ve antiinflamatuvar etkileri bulunmuştur. Özellikle de U87MG/THP-1 kokültür modelinde, glioma hücrelerinde motesanib ve diklofenak dietilamin kombinasyonlarının önemli apoptotik (40 μ M motesanib+200 μ M diklofenak dietilaminin) ve antiinflamatuvar (20 μ M ya da 40 μ M motesanib ile 200 μ M diklofenak dietilaminin) etkileri belirlenmiştir. Bu çalışmada motesanib ve diklofenak dietilamin kombinasyonları, U87MG ve HUVEC hücrelerinde sitotoksik, antiproliferatif, antimigrasyon ve apoptoz etkilerini güçlendirmekte, ayrıca inflamatuvar yanıtları azaltmaktadır. Sonuçlarımız, bu kombinasyonların özellikle metastatik kanser tedavisinde potansiyel bir strateji olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

KAYNAKÇA

- Abnet, C. C., Freedman, N. D., Kamangar, F., Leitzmann, M. F., Hollenbeck, A. R., & Schatzkin, A. (2009). Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of gastric and oesophageal adenocarcinomas: results from a cohort study and a meta-analysis. *British journal of cancer*, 100(3), 551-557.
- Achiwa H, Yatabe Y, Hida T, Kuroishi T, Kozaki K, Nakamura S, vd. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in primary, resected lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1001–1005.
- Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AA, Bigner DD. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert opinion on investigational drugs* 2009;18(8):1061-1083.
- Agrez, M. V. (1996). Cell adhesion molecules and colon cancer. *Aust N Z J Surg*. 66 (12): 791-798
- Ahmed, S. I., Bareeqa, B. S. ve Samar, S. S.(2018). Re-expression of the p53 Gene by Inhibiting the Mdm-2 Receptor in Wildtype p53 Tumors for the Treatment of Glioblastoma: A Mini Review. *Cureus.*, 10(7).
- Akbulut, H ve Akbulut K.G. (2005). *Tıbbi Onkoloji Kitabı*. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antıp Yayınları, Editör İçli F. Sayfa 23.
- Akhondzadeh S, Jafari S, Raisi F, Nasehi AA, Ghoreishi A, Salehi B, Mohebbi-Rasa S, Raznahan M, Kamalipour A (2009) Clinical trial of adjunctive celecoxib treatment in patients with major depression: a double blind and placebo controlled trial. *Depression Anxiety* 26(7):607–611
- Al-Amin, M. M., Uddin, M. M. N., Rahman, M. M., Reza, H. M., & Rana, M. S. (2013). Effect of diclofenac and antidepressants on the inflammatory response in astrocyte cell culture. *Inflammopharmacology*, 21, 421-425.
- Albano F, Arcucci A, Granato G. (2013) Markers of mitochondrial dysfunction during the diclofenac-induced apoptosis in melanoma cell lines. *Biochimie*, 95(4):934–945.
- Albano, F., Arcucci, A., Granato, G., Romano, S., Montagnani, S., De Vendittis, E., & Ruocco, M. R. (2013). Markers of mitochondrial dysfunction during the diclofenac-induced apoptosis in melanoma cell lines. *Biochimie*, 95(4), 934-945.
- Alexiou, D., Karayiannakis, A. J., Syrigos, K. N., Zbar, A., Kremmyda, A., Bramis, I., & Tsigris, C. (2001). Serum levels of e-selectin, icam-1 and vcam-1 in colorectal cancer patients: Correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery. *Eur J Cancer*. 37 (18): 2392-2397
- Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*. 2002;1:219-27

- Al-Nimer, M. S., Hameed, H. G., & Mahmood, M. M. (2015). Antiproliferative effects of aspirin and diclofenac against the growth of cancer and fibroblast cells: In vitro comparative study. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(5), 483-486.
- Altman, R., Bosch, B., Brune, K., Patrignani, P., & Young, C. (2015). Advances in NSAID development: evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology. *Drugs*, 75(8), 859-877
- Amirian, E. S., Zhou, R., Wrensch, M. R., Olson, S. H., Scheurer, M. E., Il'Yasova, D., ... & Bondy, M. L. (2016). Approaching a scientific consensus on the association between allergies and glioma risk: a report from the glioma international case-control study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 25(2), 282-290.
- Annabi B, et al. A MT1-MMP/NF-kappaB signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133+ U87 glioblastoma cells. *J Neuroinflammation*. 2009; 6:8.
- Arisan, E. D., Akar, R. O., Rencuzogullari, O., Yerlikaya, P. O., Gurkan, A. C., Akın, B., ... & Unsal, N. P. (2019). The molecular targets of diclofenac differs from ibuprofen to induce apoptosis and epithelial mesenchymal transition due to alternation on oxidative stress management p53 independently in PC3 prostate cancer cells. *Prostate International*, 7(4), 156-165.
- Arisan, E. D., Ergül, Z., Bozdağ, G., Rencüzoğulları, Ö., Çoker-Gürkan, A., Obakan-Yerlikaya, P., & Palavan-Ünsal, N. (2018). Diclofenac induced apoptosis via altering PI3K/Akt/MAPK signaling axis in HCT 116 more efficiently compared to SW480 colon cancer cells. *Molecular biology reports*, 45(6), 2175-2184.
- Auffinger, B., Spencer, D., Pytel, P., Ahmed, A. U., & Lesniak, M. S. (2015). The role of glioma stem cells in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence. *Expert review of neurotherapeutics*, 15(7), 741-752.
- Authier, A. vd. (2015) Enhanced immunosuppression by therapy-exposed glioblastoma multiforme tumor cells. *Int. J. Cancer* 136, 2566–2578
- Autiero, M.; Waltenberger, J.; Communi, D.; Kranz, A.; Moons, L.; Lambrechts, D.; Kroll, J.; Plaisance, S.; De Mol, M.; Bono, F.; Kliche, S.; Fellbrich, G.; Ballmer-Hofer, K.; Maglione, D.; MayrBeyrle, U.; Dewerchin, M.; Dombrowski, S.; Stanimirovic, D.; Van Hummelen, P.; Dehio, C.; Hicklin, D.J.; Persico, G.; Herbert, J.M.; Communi, D.; Shibuya, M.; Collen, D.; Conway, E.M.; Carmeliet, P. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat. Med.*, 2003, 9(7), 936-943.
- Avşar, T., & Kılıç, T. (2017). Yüksek gradeli gliomların moleküler biyolojisi. *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 27(2), 162-168.
- Ay, M. E., Terzioğlu, O., Terzi, C. and Ay, Ö. İ. (2006). Kolorektal kanserlerde, p21, p27, p57 siklin bağımlı kinaz inhibitör geni (CDKI) ekspresyonlarının değerlendirilmesi. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi*, 5(1), 20-25

- Azevedo Martins JM, Rabelo-Santos SH, do Amaral Westin MC, Zeferino LC. (2020). Tumoral and stromal expression of MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2, and VEGF-A in cervical cancer patient survival: A competing risk analysis. *BMC Cancer*, 20(1):660.
- Aziz G, Akselsen ØW, Hansen TV, Paulsen RE: Procaspaseactivating compound 1 induces a caspase-3-dependent cell death in cerebellar granule neurons. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010, 247(3):238-242
- Babat, Y. (2014). İnsan osteosarkoma hücre hattında (saos-2) baicalein'in 12-lox ve 15-lox mrna ifadesi ve apoptozis üzerine etkisi (Master's thesis, Adnan Menderes Üniversitesi)
- Bajaj P, Ballary CC, Dongre NA. (2004). Comparison of the effects of parecoxib and diclofenac in preemptive analgesia: a prospective, randomized, assessor-blind, single-dose, parallel-group study in patients undergoing elective general surgery. *Curr Ther Res Clin Exp*, 65(5):383–397.
- Banerjee, S.; Dowsett, M.; Ashworth, A.; Martin, L-A. Mechanisms of disease: Angiogenesis and the management of breast cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 2007, 4(9), 536-55
- Baratelli F, Lee JM, Hazra S. (2010). PGE(2) contributes to TGF-beta induced T regulatory cell function in human non-small cell lung cancer. *Am J Transl Res* 2(4):356–367.
- Baş Topcu K.S. (2022). Tümör İlerlemesinde Tümör Mikroçevrenin Rolü. *Türk Nöroşir Derg*, 32(1):98-104.
- Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165
- Bayrak, Ö. F. (2010). İnsan Kordomalarında Ekspresyon Farklılıkları Olan MikroRNA'ların ve İlgili Transkriptlerin İncelenmesi ve Bunların Kordomaların Patogenezindeki Öneminin Belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya
- Belda-Iniesta, C., de Castro Carpeño, J., Saenz, E. C., Gutiérrez, M., Perona, R., & González-Barón, M. (2006). Long term responses with cetuximab therapy in glioblastoma multiforme. *Cancer biology & therapy*, 5(8), 912-914.
- Benamouzig, R., Yoon, H., Little, J., Martin, A., Couturier, D., Deyra, J., ... & APACC Study Group. (2001). APACC, a French prospective study on aspirin efficacy in reducing colorectal adenoma recurrence: design and baseline findings. *European journal of cancer prevention*, 10(4), 327-335.
- Ben-Av P, Crofford LJ and Wilder RL vd (1995) Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis *FEBS Lett* 372(1) 83–87

- Benjamin RS, Schoffski P, Hartmann JT, Van Oosterom A, Bui BN, Duyster J, vd. (2011). Efficacy and safety of motesanib, an oral inhibitor of VEGF, PDGF, and Kit receptors, in patients with imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2011;68:69–77
- Berg, J., Fellier, H., Christoph, T., Grarup, J., & Stimmer, D. (1999). The analgesic NSAID lornoxicam inhibits cyclooxygenase (COX)-1/-2, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and the formation of interleukin (IL)-6 in vitro. *Inflammation Research*, 48, 369-379.
- Bertotti A, Burbridge MF, Gastaldi S, Galimi F, Torti D, Medico E, Giordano S, Corso S, Rolland-Valognes G, Lockhart BP, vd. Only a subset of Met-activated pathways are required to sustain oncogene addiction. *Sci Signal.* 2009;2:ra80–ra80. doi: 10.1126/scisignal.2000643
- Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Oghaki H. Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol.* 94: 303-309, 1997.
- Bleeker FE, Atai NA, Lamba S, Jonker A, Rijkeboer D, Bosch KS, Tigchelaar W, Troost D, Vandertop WP, Bardelli A, Van Noorden CJ. (2010). The prognostic IDH1(R132) mutation is associated with reduced NADP⁺-dependent IDH activity in glioblastoma. *Acta Neuropathol.* 2010;119:487–94.
- Bloch, O., Crane, C. A., Fuks, Y., Kaur, R., Aghi, M. K., Berger, M. S., ... & Parsa, A. T. (2014). Heat-shock protein peptide complex–96 vaccination for recurrent glioblastoma: a phase II, single-arm trial. *Neuro-oncology*, 16(2), 274-279.
- Blomgren H, Rotstein S, Wasserman J. (1990). In vitro capacity of various cyclooxygenase inhibitors to revert immune suppression caused by radiation-therapy for breast-cancer. *Radiother Oncol*, 19:329–335. DOI: 10.1016/0167-8140(90)90033-S PMID: 2126634
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2018;68(6):394–424
- Brennan, C. W., Verhaak, R. G., McKenna, A., Campos, B., Nounmeh, H., Salama, S. R., ... & Davidsen, T. (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *cell*, 155(2), 462-477.
- Brower, V., (2011). Early-stage progress on glioma vaccines, *Journal of the National Cancer Institute*, 103 (18), 1361-1362
- Bruce, D.; Tan, P.H. Blocking the interaction of vascular endothelial growth factor receptors with their ligands and their effector signaling as a novel therapeutic target for cancer: Time for a new look? *Expert Opin. Investig. Drugs.*, 2011, 20(10), 1413-1434.
- Burns, K., Clatworthy, J., Martin, L., Martinon, F., Plumpton, C., Maschera, B., ... & Volpe, F. (2000). Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nature cell biology*, 2(6), 346-351.

- Caenepeel S, Renshaw-Gegg L, Baher A, Bush TL, Baron W, Juan T, Manoukian R, Tasker AS, Polverino A, Hughes PE., (2010). Motesanib inhibits Kit mutations associated with gastrointestinal stromal tumors. *J Exp Clin Cancer Res.* 29:96
- Cancer Research UK, Cancer Stats, Cancer Worldwide (2011). (http://publications.cancerresearchuk.org/downloads/product/CS_CS_WORLD.pdf).
- Carlberg, M., & Hardell, L. (2017). Evaluation of mobile phone and cordless phone use and glioma risk using the Bradford Hill viewpoints from 1965 on association or causation. *BioMed research international*, 2017.
- Castellone MD, Teramoto H and Williams BO vd (2005) Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis *Science* 310(5753) 1504–1510
- Cecere, F., Iuliano, A., Albano, F., Zappelli, C., Castellano, I., Grimaldi, P., ... & Ruocco, M. R. (2010). Diclofenac-Induced Apoptosis in the Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y: Possible Involvement of the Mitochondrial Superoxide Dismutase. *BioMed Research International*, 2010(1), 801726.
- Cha, Y. I., & DuBois, R. N. (2007). NSAIDs and cancer prevention: targets downstream of COX-2. *Annu. Rev. Med.*, 58(1), 239-252.
- Chang C.Y., Shen C.C., Su H.L., Chen C.J. (2011). Gefitinib induces apoptosis in human glioma cells by targeting Bad phosphorylation. *J Neurooncol*, 105:507–522.
- Chang SM, Mehta MP, Vogelbaum MA, Taylor MD, Ahluwalia MS. (2018). Neoplasms of the central nervous system. In: DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology. 11th ed. Wolters-Kluwer; 2018. p. 1568–616.
- Chen CH, Lai JM, Chou TY, Chen CY, Su LJ, Lee YC, Cheng TS, Hong YR, Chou CK, Whang-Peng J, Wu YC, Huang CY. (2009). VEGFA upregulates FLJ10540 and modulates migration and invasion of lung cancer via PI3K/AKT pathway. *PLoS One* 4:e5052.
- Cheng, L., Hu, Z., Gu, J., Li, Q., Liu, J., Liu, M., ... & Bi, X. (2024). Exploring COX-Independent Pathways: A Novel Approach for Meloxicam and Other NSAIDs in Cancer and Cardiovascular Disease Treatment. *Pharmaceuticals*, 17(11), 1488.
- Chirasani, S. R., Leukel, P., Gottfried, E., Hochrein, J., Stadler, K., Neumann, B., ... & Grauer, O. M. (2013). Diclofenac inhibits lactate formation and efficiently counteracts local immune suppression in a murine glioma model. *International journal of cancer*, 132(4), 843-853.
- Chiu, W.T. vd. (2010) Contribution of reactive oxygen species to migration/ invasion of human glioblastoma cells U87 via ERK-dependent COX-2/PGE(2) activation. *Neurobiol. Dis.* 37, 118–129

- Cho M, Gwak J, Park S, Won J, Kim D.E., Yea S.S., Cha I.J., Kim T.K., Shin J.G., Oh S. (2005). Diclofenac attenuates Wnt/ β -catenin signaling in colon cancer cells by activation of NF- κ B. *FEBS Lett.*, 2005;579:4213–4218
- Ciardiello F, Tortora G. (2008). EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 358:1160–74
- Collett D. (1991). Modelling binary data. Chapman & Hall/CRC, London
- Comincini S, Paolillo M, Barbieri G, Palumbo S, Sbalchiero E, Azzalin A, Russo MA, Schinelli S. (2009). Gene expression analysis of an EGFR indirectly related pathway identified PTEN and MMP9 as reliable diagnostic markers for human glial tumor specimens. *J Biomed Biotechnol.* 2009;2009:924565.
- Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008;455:1061–1068
- Coomer BL, Stewart PA, Hayakawa K, vd: Quantitative morphology of human glioblastoma multiforme microvessels: structural basis of blood-brain barrier defect. *J Neurooncol* 5: 299–307, 1987
- Coxon A, Bush T, Saffran D, Kaufman S, Belmontes B, Rex K, vd. (2009). Broad antitumor activity in breast cancer xenografts by motesanib, a highly selective, oral inhibitor of vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and Kit receptors. *Clin. Cancer Res.* 2009;15:110–118
- Coxon, A., Bready, J., Kaufman, S., Estrada, J., Osgood, T., Canon, J., & Polverino, A. (2012). Anti-tumor activity of motesanib in a medullary thyroid cancer model. *Journal of endocrinological investigation*, 35(2), 181-190
- Coxon, A., Bush, T., Saffran, D., Kaufman, S., Belmontes, B., Rex, K., ... & Polverino, A. (2009). Broad antitumor activity in breast cancer xenografts by motesanib, a highly selective, oral inhibitor of vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and Kit receptors. *Clinical Cancer Research*, 15(1), 110-118.
- Crusz, S. M. and Balkwill, F. R. (2015). Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 12(10), 584–596).
- Curigliano, G., Lenihan, D., Fradley, M., Ganatra, S., Barac, A., Blaes, A. and Patel, A. (2020). Management of cardiac disease in cancer patients throughout oncological treatment: ESMO consensus recommendations. *Annals of Oncology*, 31(2), 171-190
- Çelenk, M., Yıldırım, H., Tektemur, A., Balbaba, M., & Erdağ, M. (2023). Effect of topical motesanib in experimental corneal neovascularization model. *International Ophthalmology*, 43(8), 2989-2997
- Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, vd. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature.* 2009;462 (7274): 739-744.

- Danyeli, A. (2019). Santral Sinir Sistemi Tümörlerinin Sınıflaması Geçmişten Güncele. *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 29(3), 217-225.
- Daumas-Duport, C., Scheithauer, B., O'Fallon, J., & Kelly, P. (1988). Grading of astrocytomas: a simple and reproducible method. *Cancer*, 62(10), 2152-2165.
- Davis LE, Hofmann NE, Li G, Huang ET, Loriaux MM, Bracha S, Helfand SC, Mata JE, Marley K, Mansoor A, Tyner JW, Abraham J, Seguin B and Keller C. A case study of personalized therapy for osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2013; 60:1313-1319.
- Dean P.T., Hooks S.B. (2023). Pleiotropic effects of the COX-2/PGE2 axis in the glioblastoma tumor microenvironment. *Frontiers in oncology*. 1-9.
- Del Vecchio, C. A., Giacomini, C. P., Vogel, H., Jensen, K. C., Florio, T., Merlo, A., & Wong, A. J. (2013). EGFRvIII gene rearrangement is an early event in glioblastoma tumorigenesis and expression defines a hierarchy modulated by epigenetic mechanisms. *Oncogene*, 32(21), 2670-2681
- Demchenko AP (2012). The change of cellular membranes on apoptosis: fluorescence detection. *Exp Oncol* 2012, 34(3):263-268
- Demers PA, Vaughan TL, Schommer RR. Occupation, socioeconomic status, and brain tumor mortality: a death certificate-based case-control study. *J Occup Med* 1991;33(9):1001-6
- Dermond, O., & Rüegg, C. (2001). Inhibition of tumor angiogenesis by non-steroidal anti-inflammatory drugs: emerging mechanisms and therapeutic perspectives. *Drug Resistance Updates*, 4(5), 314-321.
- Devlin TM. (2006). Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. Wiley-Liss, Hoboken, NJ
- Díaz-Rodríguez, L., García-Martínez, O., Morales, M. A., Rodríguez-Pérez, L., Rubio-Ruiz, B., & Ruiz, C. (2012). Effects of indomethacin, nimesulide, and diclofenac on human MG-63 osteosarcoma cell line. *Biological research for nursing*, 14(1), 98-107.
- Dikmen, M. (2015) In vitro evaluation of the cytotoxic, anti-proliferative, apoptotic and anti-migration properties of Fumagillin on C6 Glioma Cells. *Extended Abstracts*, 125-138
- Dikmen, M. (2017). Aprepitant on Human Glioblastoma U87MG Cells Antiproliferative and Apoptotic Effects. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21, 156-164.
- Dohadwala, M., Luo, J., Zhu, L., Lin, Y., Dougherty, G. J., Sharma, S., Dubinett, S. M. (2001). Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent invasion is mediated by cd44. *J Biol Chem*. 2001; 276 (24): 20809-20812

- Dolecek, T.A., Propp, J.M., Stroup, N.E., Kruchko, C., (2012), CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro-Oncology*, 14 (5), 1-49
- Donnem, T., Al-Saad, S., Al-Shibli, K., Busund, L. T., & Bremnes, R. M. (2010). Co-expression of PDGF-B and VEGFR-3 strongly correlates with lymph node metastasis and poor survival in non-small-cell lung cancer. *Annals of oncology*, 21(2), 223-231.
- Dubois, R. N. (2009). New, long-term insights from the adenoma prevention with celecoxib trial on a promising but troubled class of drugs. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009; 2 (4): 285-287
- Dvorak, H. F. (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of clinical oncology*, 20(21), 4368-4380.
- Einspahr JG, Thomas TL, Saboda K, Nickolof BJ, Warneke J, Curiel-Lewandrowski C, Ranger-Moore J, Duckett L, Bangert J, Fruehauf JP, Alberts DS. (2007). Expression of vascular endothelial growth factor in early cutaneous melanocytic lesion progression. *Cancer*, 110:2519-2527.
- Elledge, S. J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*, 274(5293), 1664-1672.
- Ellis, L.M.; Hicklin, D.J. (2008). VEGF-targeted therapy: Mechanisms of anti-tumour activity. *Nat. Rev. Cancer*. 8(8), 579-591.
- England, B., Huang, T., and Karsy, M. (2013). Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme. *Tumour Biol*. 34, 2063–2074. doi: 10.1007/s13277-013-0871-3.
- Engür Öztürk, S. (2020). THP-1 kökenli makrofaj ve A549 akciğer kanseri ko-kültür modelinde epitelyal-mezenkimal değişim yolağına immünoterapötik yaklaşımlar. Doktora Tezi, 1-41.
- Fan X, Khaki L, Zhu TS, Soules ME, Talsma CE, Gul N, Koh C, Zhang J, Li YM, Maciarczyk J, Nikkhah G, Dimeco F, Piccirillo S, Vescovi AL, Eberhart CG. (2010). NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells*. 2010;28:5–16.
- Felton, J. S. (1997). The heritage of Bernardino Ramazzini. *Occupational medicine*, 47(3), 167-179
- Fenton T.R., Nathanson D, Ponte de Albuquerque C. (2012). Resistance to EGF receptor inhibitors in glioblastoma mediated by phosphorylation of the PTEN tumor suppressor at tyrosine 240. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(35):14164-9.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. (2003). The Biology of VEGF and Its Receptors. *Nat Med*. (9): 669-676

- Fischer, C.; Mazzone, M.; Jonckx, B.; Carmeliet, P. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: Drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat. Rev. Cancer.*, 2008, 8(12), 942-956.
- Fredriksson, L., Herpers, B., Benedetti, G., Matadin, Q., Puigvert, J. C., de Bont, H., ... & van de Water, B. (2011). Diclofenac inhibits tumor necrosis factor- α -induced nuclear factor- κ B activation causing synergistic hepatocyte apoptosis. *Hepatology*, 53(6), 2027-2041.
- Friedman, H. S., Prados, M. D., Wen, P. Y., Mikkelsen, T., Schiff, D., Abrey, L. E., ... & Cloughesy, T. (2009). Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *Journal of clinical oncology*, 27(28), 4733-4740.
- Frosch M, Douglas A, Girolami U. (2010). The central nervous system. 8th edition. Philadelphia: Saunders/Elsevier.
- Fukata, M., & Abreu, M. (2007). TLR4 signalling in the intestine in health and disease. *Biochemical Society Transactions*, 35(6), 1473-1478.
- Fukushima T, Favereaux A, Huang H, Shimizu T, Yonekawa Y, Nakazato Y, Ohagki H. (2006). Genetic alterations in primary glioblastomas in Japan. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006;65:12–8.
- Gan, H. K., Cvrljevic, A. N., & Johns, T. G. (2013). The epidermal growth factor receptor variant III (EGFR v III): where wild things are altered. *The FEBS journal*, 280(21), 5350-5370
- Gan, H. K., Kaye, A. H., & Luwor, R. B. (2009). The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *Journal of Clinical Neuroscience*, 16(6), 748-754
- Gan, HK, Burgess, AW, Clayton, AH vd. (2012) Targeting of a conformationally exposed, tumor-specific epitope of EGFR as a strategy for cancer therapy. *Cancer Res* 2012; 72: 2924–30
- Geisbrecht BV, Gould SJ. The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 30527 – 33, 1999.
- Ghanghas, P., Jain, S., Rana, C., & Sanyal, S. N. (2016). Chemopreventive action of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the inflammatory pathways in colon cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 78, 239-247
- Gómez-Lechón, M. J., Ponsoda, X., O'Connor, E., Donato, T., Castell, J. V., & Jover, R. (2003). Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Biochemical pharmacology*, 66(11), 2155-2167.
- Gonzalez-Moreno O, Lecanda J, Green JE, Segura V, Catena R, Serrano D, Calvo A. (2010). VEGF elicits epithelial-mesenchymal transition (EMT) in prostate intraepithelial neoplasia (PIN)-like cells via an autocrine loop. *Exp Cell Res* 2010;316:554-567.

- Gosselin, N. H., Mouksassi, M. S., Lu, J. F., & Hsu, C. P. (2015). Population pharmacokinetic modeling of motesanib and its active metabolite, M4, in cancer patients. *Clinical pharmacology in drug development*, 4(6), 463-472.
- Gottfried, E., Lang, S. A., Renner, K., Bosserhoff, A., Gronwald, W., Rehli, M., ... & Kreutz, M. (2013). New aspects of an old drug—diclofenac targets MYC and glucose metabolism in tumor cells. *PloS one*, 8(7), e66987.
- Gökhaner G. (2018). Yeni sigma-1 reseptör antagonisti S1RA (e-52862)'nın ve rimkazol'ün U87MG glioblastoma hücrelerinde sfingosin kinaz sinyal yolağı üzerinden antikanser etkisinin araştırılması. Yüksek lisans tezi, 1-92.
- Graner, M. W., Cumming, R. I., & Bigner, D. D. (2007). The heat shock response and chaperones/heat shock proteins in brain tumors: surface expression, release, and possible immune consequences. *Journal of Neuroscience*, 27(42), 11214-11227.
- Greenberg M.S (2019). Primary Tumors of the Nervous and Related Systems. In: Handbook of Neurosurgery. 9th ed. Thieme; 2019. p. 589–736
- Grimm, D., Bauer, J., Schoenberger, J. Blockade of neoangiogenesis, a new and promising technique to control the growth of malignant tumors and their metastases. *Curr. Vasc. Pharmacol.*, 2009, 7(3), 347-357.
- Guo JY, Li CY, Ruan YP, Sun M, Qi XL, Zhao BS, Luo F (2009) Chronic treatment with celecoxib reverses chronic unpredictable stress-induced depressive-like behavior via reducing cyclooxygenase-2 expression in rat brain. *Eur J Pharmacol* 612(1–3):54–60.
- Guo, H., Choudhury, Y., Yang, J., Chen, C., Tay, F. C., Lim, T. M., vd. (2011). Antiglioma effects of combined use of a baculoviral vector expressing wildtype p53 and sodium butyrate. *J. Gene Med.* 13, 26–36. doi: 10.1002/jgm.1522
- Haier, J., Nasralla, M., & Nicolson, G. L. (2000). Cell surface molecules and their prognostic values in assessing colorectal carcinomas. *Ann Surg.* 231 (1): 11-24
- Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 2002; 62:1676–1681.
- Ham SW, Jeon HY, Jin X, Kim EJ, Kim JK, Shin YJ vd. TP53 gain-of-function mutation promotes inflammation in glioblastoma. *Cell Death Differ* 2019; 26: 409-425.
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996;86:353-64
- Hansen S, Rasmussen, B K, Laursen R J, Kosteljanetz M, Schultz H, Nørgård B M, Guldberg R, & Gradel K. O. (2018). Treatment and survival of glioblastoma patients in Denmark: The Danish Neuro-Oncology Registry. *Journal of Neuro-Oncology*, 139(2), 479–489.

- Hao J.Q., Li Q., Xu S.P., Shen Y.X., Sun G.Y. (2008). Effect of lumiracoxib on proliferation and apoptosis of human nonsmall cell lung cancer cells in vitro. *Chinese Medical Journal*, 121(7): 602-7
- Hara, A. and Okayasu, I. (2004) Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in human astrocytic gliomas: correlation with angiogenesis and prognostic significance. *Acta Neuropathol.* 108, 43–48
- Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer* 2008;8:880-887.
- Harris, R. E., Beebe-Donk, J., & Alshafie, G. A. (2006). Reduction in the risk of human breast cancer by selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *BMC cancer*, 6, 1-5.
- Harris, R. E., Casto, B. C., & Harris, Z. M. (2014). Cyclooxygenase-2 and the inflammogenesis of breast cancer. *World journal of clinical oncology*, 5(4), 677
- Hartmann JT, Haap M, Kopp HG, Lipp HP. (2009). Tyrosine kinase inhibitors - a review on pharmacology, metabolism and side effects. *Curr Drug Metab.*; 10: 470–81.
- Hasanzadeh, N., & Niknejad, A. (2021). Cerebral Glioblastoma: A Review on Genetic Alterations, Signaling Pathways, and Clinical Managements. *Jentashapir Journal of Cellular and Molecular Biology*, 12(4).
- Hashemi Goradel, N., Najafi, M., Salehi, E., Farhood, B., & Mortezaee, K. (2019). Cyclooxygenase-2 in cancer: a review. *Journal of cellular physiology*, 234(5), 5683-5699.
- Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., De Tribolet, N., Weller, M., ... & Stupp, R. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 997-1003.
- Hickey, E. J., Raje, R. R., Reid, V. E., Gross, S. M., & Ray, S. D. (2001). Diclofenac induced in vivo nephrotoxicity may involve oxidative stress-mediated massive genomic DNA fragmentation and apoptotic cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(2), 139-152.
- Hirano A, Matsui T. (1975). Vascular structures in brain tumors. *Hum Pathol* 6:611–621, 1975
- Hirano A: Fine structural alterations of small vessels in the nervous system, in Cervós-Navarro J (ed): *Pathology of Cerebral Microcirculation*. Berlin: DeGruyter, 1974, pp 203–217
- Hiroko Ohgak, Paul Kleihues: The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clin Cancer Res*; 19(4) February 15, 2013
- Hixson, L. J., Alberts, D. S., Krutzsch, M., Einsphar, J., Brendel, K., Gross, P. H., ... & Pamukcu, R. (1994). Antiproliferative effect of nonsteroidal antiinflammatory

- drugs against human colon cancer cells. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 3(5), 433-438.
- Ho JN, Byun SS, Lee SE, Youn JI, Lee S. Multikinase inhibitor motesanib enhances the antitumor effect of cisplatin in cisplatin-resistant human bladder cancer cells via apoptosis and the PI3K/Akt pathway. *Oncol Rep* 2019;41:2482-2490.
- Holland, E. C. (2001). Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nature Reviews Genetics*, 2(2), 120-129.
- Holmqvist, K.; Cross, M.J.; Rolny, C.; Hägerkvist, R.; Rahimi, N.; Matsumoto, T.; Claesson-Welsh, L.; Welsh, M. The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(21), 22267-22275.
- Hosomi, Y., Yokose, T., Hirose, Y., Nakajima, R., Nagai, K., Nishiwaki, Y., & Ochiai, A. (2000). Increased cyclooxygenase 2 (COX-2) expression occurs frequently in precursor lesions of human adenocarcinoma of the lung. *Lung cancer*, 30(2), 73-81.
- Hu B, Chen R, Jiang M, Xiong S, Xie A, Liu X, Fu B. (2023). MTX-211 Inhibits GSH Synthesis through Keap1/NRF2/GCLM Axis and Exerts Antitumor Effects in Bladder. *Cancer. Int. J. Mol. Sci.*, 24:7608
- Huang, K., Andersson, C., Roomans, G.M.; Ito, N., Claesson-Welsh, L. (2001). Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo and heterodimers. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2001, 33(4), 315- 324.
- Huang, P. H., Mukasa, A., Bonavia, R., Flynn, R. A., Brewer, Z. E., Cavenee, W. K., ... & White, F. M. (2007). Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(31), 12867-12872
- Hunt, P. J. M. (2000). Cancer Nursing (Book). *Journal of Advanced Nursing*, 31(3), 732-732
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;350:2335-42]
- Ignéy, F. H., & Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 2(4), 277-288.
- Intini, F. P., Zajac, J., Novohradsky, V., Saltarella, T., Pacifico, C., Brabec, V., ... & Kasparkova, J. (2017). Novel antitumor platinum (II) conjugates containing the nonsteroidal anti-inflammatory agent diclofenac: synthesis and dual mechanisms of antiproliferative effects. *Inorganic chemistry*, 56(3), 1483-1497.
- Isenberg JS, Jia Y, Field L, Ridnour L.A., Sparatore A, Del Soldato P, Sowers A.L., Yeh G.C., Moody T.W., Wink D.A., Ramchandran R, Roberts D.D. (2007).

- Modulation of angiogenesis by dithiolethionemodified NSAIDs and valproic acid. *British Journal of Pharmacology*, 151: 142–151.
- Jain, S., Ghanghas, P., Rana, C., & Sanyal, S. N. (2017). Role of GSK-3 β in regulation of canonical Wnt/ β -catenin signaling and PI3-K/Akt oncogenic pathway in colon cancer. *Cancer investigation*, 35(7), 473-483.
- Jana, N. R. (2008). NSAIDs and apoptosis. *Cellular and molecular life sciences*, 65, 1295-1301.
- Jennbacken, K.; Vallbo, C.; Wang, W.; Damberg, J.E. Expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF receptor-3 in human prostate cancer is associated with regional lymph node metastasis. *Prostate*, 2005, 65(2), 110-116.
- Joe, A. K., Liu, H., Xiao, D., Soh, J. W., Pinto, J. T., Beer, D. G., & Bernard Weinstein, I. (2003). Exisulind and CP248 induce growth inhibition and apoptosis in human esophageal adenocarcinoma and squamous carcinoma cells. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*, 3(2), 83-94.
- Johnsen, J. I., Lindskog, M., Ponthán, F., Pettersen, I., Elfman, L., Orrego, A., ... & Kogner, P. (2004). Cyclooxygenase-2 is expressed in neuroblastoma, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis and inhibit tumor growth in vivo. *Cancer research*, 64(20), 7210-7215.
- Johnson SD, De Costa AMA, Young MRI. (2014). Effect of the premalignant and tumor microenvironment on immune cell cytokine production in head and neck cancer. *Cancer*, 6(2):756–770.
- Joki, T. vd. (2000) Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human glioma and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *Cancer Res.* 60, 4926–4931.
- Juarez-Moreno, K., Gonzalez, E. B., Girón-Vazquez, N., Chávez-Santoscoy, R. A., Mota-Morales, J. D., Perez-Mozqueda, L. L., ... & Bogdanchikova, N. (2017). Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines. *Human & experimental toxicology*, 36(9), 931-948.
- Kacan T, Altun A, Altun G, Kacan S , Sarac B , Seker M , Bahceci A , Babacan N.(2014). Investigation of Antitumor Effects of Sorafenib and Lapatinib Alone and in Combination on MCF-7 Breast Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15 (7), 3185-3189
- Kant Lomesh S, Bala M, Dinesh Kumar D, Kumar I. (2019). Investigation of molecular interactions of the drug Diclofenac Sodium Salt in water and aqueous sorbitol systems at different temperatures (305.15 K–315.15 K). *J. Mol. Liq.*2019;289: 109479
- Karakuş, E. (2016). Hücre kültürü teknikleri. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 133-178

- Kaur J and Sanyal SN (2010) PI3-kinase/Wnt association mediates COX-2/PGE2 pathway to inhibit apoptosis in early stages of colon carcinogenesis: chemoprevention by diclofenac *Tumor Biol* 31(6) 623–631
- Kaya, T. T., Altun, A., Turgut, N. H., Ataseven, H., & Koyluoglu, G. (2016). Effects of a multikinase inhibitor motesanib (AMG 706) alone and combined with the selective DuP-697 COX-2 inhibitor on colorectal cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(3), 1103-1110.
- Kerbel RS, Kamen BA. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:423-436.
- Khasraw M, Lassman AB. (2010). Advances in the treatment of malignant gliomas. *Curr Oncol Rep*. 2010;12:26–33.
- Khurana VG, Teo C, Kundi M, Hardell L, Carlberg M. Cell phones and brain tumors: a review including the long-term epidemiological data. *Surgical neurology* 2009;72(3):205-14
- Kinnersley, B., Kamatani, Y., Labussière, M., Wang, Y., Galan, P., Mokhtari, K., ... & Houlston, R. S. (2016). Search for new loci and low-frequency variants influencing glioma risk by exome-array analysis. *European Journal of Human Genetics*, 24(5), 717-724.
- Kisselev, P. A., Panibrat, O. V., Sysa, A. R., Anisovich, M. V., Zhabinskii, V. N., & Khripach, V. A. (2017). Flow-cytometric analysis of reactive oxygen species in cancer cells under treatment with brassinosteroids. *Steroids*, 117, 11-15.
- Kloosterhof, N. K., Bralten, L. B., Dubbink, H. J., French, P. J., & van den Bent, M. J. (2011). Isocitrate dehydrogenase-1 mutations: a fundamentally new understanding of diffuse glioma?. *The lancet oncology*, 12(1), 83-91.
- Kolawole, O. R., & Kashfi, K. (2022). NSAIDs and cancer resolution: new paradigms beyond cyclooxygenase. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1432
- Konturek PC, Kania J, Burnat G, Hahn EG, Konturek SJ. Prostaglandins as mediators of COX-2 derived carcinogenesis in gastrointestinal tract. *J. Physiol. Pharmacol.* 2005;56:S57–73.
- Konukoğlu, D., & Turhan, M. (2005). Anjiyojenezin Temel Moleküler Mekanizmaları Ve Tümör Anjiyojenezi. *Cerrahpaşa tıp dergisi*, 36(1), 42-48.
- Kornblith, P. K., Welch, W. C., & Bradley, M. K. (1993). The future of therapy for glioblastoma. *Surgical neurology*, 39(6), 538-543.
- Koul D. (2008). PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biol Ther*, 7:1321-5.
- Krysko DV, Vanden Berghe T, D’Herde K, Vandenabeele P (2008). Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*. 2008, 44(3):205-221.

- Kubota K, Ichinose Y, Scagliotti G, Spigel D, Kim JH, Shinkai T, vd. (2014). Phase III study (MONET1) of motesanib plus carboplatin/paclitaxel in patients with advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer (NSCLC): Asian subgroup analysis. *Ann. Oncol.* 2014;25:529–536.
- Kusuhara, H., Komatsu, H., Sumichika, H., & Sugahara, K. (1999). Reactive oxygen species are involved in the apoptosis induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cultured gastric cells. *European journal of pharmacology*, 383(3), 331-337.
- Kusuhara, H., Komatsu, H., Sumichika, H., & Sugahara, K. (1999). Reactive oxygen species are involved in the apoptosis induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cultured gastric cells. *European journal of pharmacology*, 383(3), 331-337.
- Laffaire, J., Everhard, S., Idbaih, A., Criniere, E., Marie, Y., de Reynies, A., ... & Ducray, F. (2010). Methylation profiling identifies 2 groups of gliomas according to their tumorigenesis. *Neuro-oncology*, 13(1), 84-98.
- Lalier, L., Cartron, P. F., Pedelaborde, F., Olivier, C., Loussouarn, D., Martin, S. A., ... & Vallette, F. M. (2007). Increase in PGE2 biosynthesis induces a Bax dependent apoptosis correlated to patients' survival in glioblastoma multiforme. *Oncogene*, 26(34), 4999-5009.
- Lampugnani, M. G., Orsenigo, F., Gagliani, M. C., Tacchetti, C., & Dejana, E. (2006). Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *The Journal of cell biology*, 174(4), 593-604.
- Lan, T., Chen, L., & Wei, X. (2021). Inflammatory cytokines in cancer: comprehensive understanding and clinical progress in gene therapy. *Cells*, 10(1), 100.
- Le Bitoux, M. A., & Stamenkovic, I. (2008). Tumor-host interactions: the role of inflammation. *Histochemistry and cell biology*, 130, 1079-1090.
- Lee JA, Ko Y, Kim DH, Lim JS, Kong CB, Cho WH, Jeon DG, Lee SY and Koh JS. (2012). Epidermal growth factor receptor: is it a feasible target for the treatment of osteosarcoma? *Cancer Res Treat.* 2012; 44:202-209.
- Lee SY, Choi HK, Lee KJ. (2009). The immune tolerance of cancer is mediated by IDO that is inhibited by COX-2 inhibitors through regulatory T cells. *J immunother*, 32(1):22–28.
- Leidgens V, Seliger C, Jachnik B. (2015). Ibuprofen and diclofenac restrict migration and proliferation of human glioma cells by distinct molecular mechanisms. *PLoS One*, 10(10):e0140613.
- Levitzi, A.; Mishani, E. Tyrosine kinase inhibitors and other tyrosine kinase inhibitors. *Annu. Rev. Biochem.*, 2006, 75(1), 93-109

- Li YG and Geng X. (2010). A meta-analysis on the association of HER-2 overexpression with prognosis in human osteosarcoma. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2010; 19:313-316;
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., ... & Parsons, R. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *science*, 275(5308), 1943-1947.
- Lim, H. Y., Joo, H. J., Choi, J. H., Yi, J. W., Yang, M. S., Cho, D. Y., ... & Kim, H. C. (2000). Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in human gastric carcinoma. *Clinical cancer research*, 6(2), 519-525.
- Lin, M. T., Lee, R. C., Yang, P. C., Ho, F. M., & Kuo, M. L. (2001). Cyclooxygenase-2 inducing Mcl-1-dependent survival mechanism in human lung adenocarcinoma CL1. 0 cells: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 276(52), 48997-49002.
- Linkous AG, Yazlovitskaya EM. (2011). Angiogenesis in glioblastoma multiforme: navigating the maze. *Anticancer Agents Med Chem*. 2011 Oct;11(8):712-8.
- Lomesh, S. K., Bala, M., Kumar, D., & Kumar, I. (2019). Investigation of molecular interactions of the drug Diclofenac Sodium Salt in water and aqueous sorbitol systems at different temperatures (305.15 K–315.15 K). *Journal of Molecular Liquids*, 289, 109479
- Long, D. M. (1970). Capillary ultrastructure and the blood-brain barrier in human malignant brain tumors. *Journal of neurosurgery*, 32(2), 127-144.
- Lopez-Acevedo, M., Grace, L., Teoh, D., Whitaker, R., Adams, D. J., Jia, J., ... & Secord, A. A. (2014). Dasatinib (BMS-35482) potentiates the activity of gemcitabine and docetaxel in uterine leiomyosarcoma cell lines. *Gynecologic oncology research and practice*, 1, 1-10
- Louis, D. N., Giannini, C., Capper, D., Paulus, W., Figarella-Branger, D., Lopes, M. B., ... & Wesseling, P. (2018). cIMPACT-NOW update 2: diagnostic clarifications for diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant and diffuse astrocytoma/anaplastic astrocytoma, IDH-mutant. *Acta neuropathologica*, 135(4), 639-642.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., ... & Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*, 114(2), 97-109.
- Louis, D. N., Perry, A., Burger, P., Ellison, D. W., Reifenberger, G., von Deimling, A., ... & Wesseling, P. (2014). I nternational S ociety of N europathology-H aarlem C onsensus G uidelines for N ervous S ystem T umor C lassification and G rading. *Brain pathology*, 24(5), 429-435.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., ... & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta neuropathologica*, 131(6), 803-820.

- Lönnroth C, Andersson M, Arvidsson A. (2008). Preoperative treatment with a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) increases tumor tissue infiltration of seemingly activated immune cells in colorectal cancer. *Cancer Immun*, 8:5.
- Lu, C., Ward, P. S., Kapoor, G. S., Rohle, D., Turcan, S., Abdel-Wahab, O., ... & Thompson, C. B. (2012). IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*, 483(7390), 474-478.
- Lu-Emerson, C., Duda, D. G., Emblem, K. E., Taylor, J. W., Gerstner, E. R., Loeffler, J. S., ... & Jain, R. K. (2015). Lessons from anti-vascular endothelial growth factor and anti-vascular endothelial growth factor receptor trials in patients with glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 33(10), 1197-1213.
- Mac Gabhann, F.; Popel, A.S. Dimerization of VEGF receptors and implications for signal transduction: A computational study. *Biophys. Chem.*, 2007, 128(2-3), 125-139
- MacKenzie, D. J. (1926). A classification of the tumours of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis. *Canadian Medical Association Journal*, 16(7), 872.
- Maehama, T., & Dixon, J. E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 273(22), 13375-13378.
- Maharaj, A. S., Saint-Geniez, M., Maldonado, A. E., & D'Amore, P. A. (2006). Vascular endothelial growth factor localization in the adult. *The American journal of pathology*, 168(2), 639-648.
- Mäkelä, A., Kuusi, T., & Schröder, T. (1997). Inhibition of serum phospholipase-A2 in acute pancreatitis by pharmacological agents in vitro. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 57(5), 401-407.
- Mäkinen, T., Veikkola, T., Mustjoki, S., Karpanen, T., Catimel, B., Nice, E. C., ... & Alitalo, K. (2001). Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *The EMBO journal*.
- Malmer, B., Iselius, L., Holmberg, E., Collins, A., Henriksson, R., & Grönberg, H. (2001). Genetic epidemiology of glioma. *British journal of cancer*, 84(3), 429-434.
- Marinov, L., Georgieva, A., Voynikov, Y., Toshkova, R., Nikolova, I., & Malchev, M. (2021). Cytotoxic and antiproliferative effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac in human tumour cell lines. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1), 1118–1126
- Markovic-Mueller, S.; Stutfeld, E.; Asthana, M.; Weinert, T.; Bliven, S.; Goldie, K.N.; Kisko, K.; Capitani, G.; Ballmer-Hofer, K. Structure of the Full-length VEGFR-1 extracellular domain in complex with VEGF-A. *Structure.*, 2017, 25(2), 341-352.

- Martin, M., Roche, H., Pinter, T., Crown, J., Kennedy, M. J., Provencher, L., ... & Mackey, J. R. (2011). Motesanib, or open-label bevacizumab, in combination with paclitaxel, as first-line treatment for HER2-negative locally recurrent or metastatic breast cancer: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *The lancet oncology*, 12(4), 369-376.
- Martinez-Lage, M., Lynch, T. M., Bi, Y., Cocito, C., Way, G. P., Pal, S., ... & Dahmane, N. (2019). Immune landscapes associated with different glioblastoma molecular subtypes. *Acta neuropathologica communications*, 7, 1-12.
- Masunaga, R., Kohno, H., Dhar, D. K., Ohno, S., Shibakita, M., Kinugasa, S., ... & Nagasue, N. (2000). Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients. *Clinical Cancer Research*, 6(10), 4064-4068.
- Maurya, S. K., Tewari, M., Sharma, B., & Shukla, H. S. (2013). Expression of procaspase 3 and activated caspase 3 and its relevance in hormone-responsive gallbladder carcinoma chemotherapy. *The Korean journal of internal medicine*, 28(5), 573.
- Mavrou, A., & Oltean, S. (2016). SRPK1 inhibition in prostate cancer: A novel anti-angiogenic treatment through modulation of VEGF alternative splicing. *Pharmacological research*, 107, 276-281.
- Mayorek, N., Naftali-Shani, N., & Grunewald, M. (2010). Diclofenac inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer by modulation of VEGF levels and arginase activity. *PloS one*, 5(9), e12715
- McFaline-Figueroa, J. R., & Lee, E. Q. (2018). Brain tumors. *The American journal of medicine*, 131(8), 874-882.
- McGuire, V. A., & Arthur, J. S. C. (2015). Subverting toll-like receptor signaling by bacterial pathogens. *Frontiers in immunology*, 6, 607.
- Meade EA, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem* 1999; 274:8328–8334.
- Mehnert JM, McCarthy MM, Jilaveanu L, Flaherty KT, Aziz S, Camp RL, Rimm DL, Kluger HM. Quantitative expression of VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, and VEGF-R3 in melanoma tissue microarrays. *Hum Pathol* 2010;41:375-384.
- Melin, B. (2011). Genetic causes of glioma: new leads in the labyrinth. *Current opinion in oncology*, 23(6), 643-647.
- Mellai M, Caldera V, Patrucco A, Annovazzi L, Schiffer D. (2008). Survivin expression in glioblastomas correlates with proliferation, but not with apoptosis. *Anticancer Res.* 2008;28:109–18

- Mercurio, A. M., Lipscomb, E. A., & Bachelder, R. E. (2005). Non-angiogenic functions of VEGF in breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 10, 283-290.
- Meylan, E., Tschopp, J., Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*, 442(7098), 39-44.
- Miller, K. D., Chap, L. I., Holmes, F. A., Cobleigh, M. A., Marcom, P. K., Fehrenbacher, L., & Rugo, H. S. (2005). Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 23(4), 792-799.
- Ming M, He YY. (2012). PTEN in DNA damage repair. *Cancer Lett*, 319:125-9.
- Minniti, G., Traish, D., Ashley, S., Gonsalves, A., & Brada, M. (2005). Risk of second brain tumor after conservative surgery and radiotherapy for pituitary adenoma: update after an additional 10 years. *The Journal of clinical endocrinology & metabolism*, 90(2), 800-804.
- Mir, M. A., Bashir, M., & Jan, N. (2023). The Role of Interleukin (IL)-6/IL-6 Receptor Axis in Cancer. In *Cytokine and Chemokine Networks in Cancer* (pp. 137-164). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Mousavi, S. H., Tavakkol-Afshari, J., Brook, A., & Jafari-Anarkooli, I. (2009). Direct toxicity of Rose Bengal in MCF-7 cell line: role of apoptosis. *Food and chemical toxicology*, 47(4), 855-859
- Mukherjee, B., McEllin, B., Camacho, C. V., Tomimatsu, N., Sirasanagandala, S., Nannepaga, S., ... & Burma, S. (2009). EGFRvIII and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism for radioresistance in glioblastoma. *Cancer research*, 69(10), 4252-4259
- Nagarajan RP, Costello JF. (2009). Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme. *Semin Cancer Biol*. 19:188–97.
- Neglia, J. P., Robison, L. L., Stovall, M., Liu, Y., Packer, R. J., Hammond, S., ... & Inskip, P. D. (2006). New primary neoplasms of the central nervous system in survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(21), 1528-1537.
- Nystrom, S. (1960). Pathological changes in blood vessels of human glioblastoma multiforme. Comparative studies using plastic casting, angiography, light microscopy and electron microscopy, and with reference to some other brain tumours. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Supplement*, 49, 1-83.
- Obermajer N, Muthuswamy R, Odunsi K. (2011). PGE2 -induced CXCL 12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment. *Cancer Res*, 71(24):7463–7470.

- O'Farrell, A. M., Abrams, T. J., Yuen, H. A., Ngai, T. J., Louie, S. G., Yee, K. W., ... & Cherrington, J. M. (2003). SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 101(9), 3597-3605.
- Ogawa F, Amano H, Eshima K. (2014). Prostanoid induces premetastatic niche in regional lymph nodes. *J Clin invest*, 124(11):4882–4894.
- Ohgaki H, Kleihues P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*. 2007;170:1445–53.
- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P. L., ... & Kleihues, P. (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer research*, 64(19), 6892-6899.
- Okami, J., Yamamoto, H., Fujiwara, Y., Tsujie, M., Kondo, M., Noura, S., ... & Monden, M. (1999). Overexpression of cyclooxygenase-2 in carcinoma of the pancreas. *Clinical cancer research*, 5(8), 2018-2024.
- Olar A, Aldape KD. (2014). Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *J Pathol. an*;232(2):165-77.
- Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J., & Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling? In control of vascular function. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(5), 359-371.
- Omuro, A. M., Faivre, S., & Raymond, E. (2007). Lessons learned in the development of targeted therapy for malignant gliomas. *Molecular cancer therapeutics*, 6(7), 1909-1919.
- Ortega-Molina, A., & Serrano, M. (2013). PTEN in cancer, metabolism, and aging. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(4), 184-189.
- Ostrom, QT, Gittleman, H., Farah, P., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., ... & Barnholtz-Sloan, J. S. (2013). CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-oncology*, 15(suppl_2), ii1-ii56.
- Ostrom QT, Gittleman H, Stetson L, Virk SM, Barnholtz-Sloan JS. Epidemiology of gliomas. In: Ahluwalia JS, editor. *Current Understanding and Treatment of Gliomas*. Vol. 163. Springer; 2015. p. 1–14.
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Truitt, G., Boscia, A., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2018). CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro-oncology*, 20(suppl_4), iv1-iv86.
- Önay Uçar, E., & Şengelen, A. (2019). Resveratrol and siRNA in combination reduces Hsp27 expression and induces caspase-3 activity in human glioblastoma cells. *Cell Stress and Chaperones*, 24(4), 763-775.

- Palanichamy K, Erkkinen M, Saia G, Chakravarti A. (2007). Molecular and genetic profiling in human gliomas. *Discov Med.* 2007;7:75–81
- Palit, S., Kar, S., Sharma, G., & Das, P. K. (2015). Hesperetin induces apoptosis in breast carcinoma by triggering accumulation of ROS and activation of ASK1/JNK pathway. *Journal of cellular physiology*, 230(8), 1729-1739.
- Pani, G., Colavitti, R., Bedogni, B., Fusco, S., Ferraro, D., Borrello, S., & Galeotti, T. (2004). Mitochondrial superoxide dismutase: a promising target for new anticancer therapies. *Current medicinal chemistry*, 11(10), 1299-1308.
- Pantziarka, P., Sukhatme, V., Bouche, G., Meheus, L., & Sukhatme, V. P. (2016). Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)—diclofenac as an anti-cancer agent. *Ecancermedicalscience*, 10
- Paschos, K. A., Canovas, D., & Bird, N. C. (2009). The role of cell adhesion molecules in the progression of colorectal cancer and the development of liver metastasis. *Cell Signal.* 21 (5): 665-674
- Patel H, Nilendu P, Jahagirdar D, Pal J.K., Sharma N.K. (2018). Modulating secreted components of tumor microenvironment: A masterstroke in tumor therapeutics. *Cancer Biol Ther*, 19(1):3-12
- Patti, R., Gumired, K., Reddanna, P., Sutton, L. N., Phillips, P. C., & Reddy, C. D. (2002). Overexpression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human primitive neuroectodermal tumors: effect of celecoxib and rofecoxib. *Cancer letters*, 180(1), 13-21.
- Pédeboscq, S., L’Azou, B., Passagne, I., De Giorgi, F., Ichas, F., Pometan, JP., Cambar, J., (2008) Cytotoxic and apoptotic effects of bortezomib and gefitinib compared to alkylating agents on human glioblastoma cells. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*, 99-111
- Piazza, G. A., Rahm, A. K., Finn, T. S., Fryer, B. H., Li, H., Stoumen, A. L., ... & Ahnen, D. J. (1997). Apoptosis primarily accounts for the growth-inhibitory properties of sulindac metabolites and involves a mechanism that is independent of cyclooxygenase inhibition, cell cycle arrest, and p53 induction. *Cancer research*, 57(12), 2452-2459.
- Pillay, V., Allaf, L., Wilding, A. L., Donoghue, J. F., Court, N. W., Greenall, S. A., ... & Johns, T. G. (2009). The plasticity of oncogene addiction: implications for targeted therapies directed to receptor tyrosine kinases. *Neoplasia*, 11(5), 448-459
- Polverino, A., Coxon, A., Starnes, C., Diaz, Z., DeMelfi, T., Wang, L., ... & Kendall, R. (2006). AMG 706, an oral, multikinase inhibitor that selectively targets vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and kit receptors, potently inhibits angiogenesis and induces regression in tumor xenografts. *Cancer research*, 66(17), 8715-8721.

- Prager, B. C., Bhargava, S., Mahadev, V., Hubert, C. G., & Rich, J. N. (2020). Glioblastoma stem cells: driving resilience through chaos. *Trends in cancer*, 6(3), 223-235.
- Preston, D. L., Ron, E., Yonehara, S., Kobuke, T., Fujii, H., Kishikawa, M., ... & Mabuchi, K. (2002). Tumors of the nervous system and pituitary gland associated with atomic bomb radiation exposure. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(20), 1555-1563.
- Price, R. L., & Chiocca, E. A. (2014). Evolution of malignant glioma treatment: from chemotherapy to vaccines to viruses. *Neurosurgery*, 61(CN_suppl_1), 74-83.
- Price, R. L., Song, J., Bingmer, K., Kim, T. H., Yi, J. Y., Nowicki, M. O., ... & Kwon, C. H. (2013). Cytomegalovirus contributes to glioblastoma in the context of tumor suppressor mutations. *Cancer research*, 73(11), 3441-3450.
- Price, T. J., Lipton, L., Williams, J., McGreivy, J., McCoy, S., Sun, Y., ... & Rosenthal, M. A. (2007). Safety and pharmacokinetics (PK) of AMG 706 in combination with gemcitabine for the treatment of patients (pts) with solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 25(18_suppl), 14005-14005.
- Pritchard-Jones, R. O., Dunn, D. B. A., Qiu, Y., Varey, A. H. R., Orlando, A., Rigby, H., ... & Bates, D. O. (2007). Expression of VEGF_{xxx}b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. *British journal of cancer*, 97(2), 223-230.
- Qiu J, Shi Z and Jiang J (2016). Cyclooxygenase-2 in glioblastoma multiforme. Drug Discovery Today. 1359-6446 Elsevier Ltd. All rights reserved.
- Rafii, S., Lyden, D., Benezra, R., Hattori, K., & Heissig, B. (2002). Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy?. *Nature Reviews Cancer*, 2(11), 826-835.
- Raghav, K. P. S., & Blumenschein Jr, G. R. (2011). Motesanib and advanced NSCLC: experiences and expectations. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 20(6), 859-869
- Ralph, S. J., Rodríguez-Enríquez, S., Neuzil, J., Saavedra, E., & Moreno-Sánchez, R. (2010). The causes of cancer revisited: “mitochondrial malignancy” and ROS-induced oncogenic transformation—why mitochondria are targets for cancer therapy. *Molecular aspects of medicine*, 31(2), 145-170.
- Rana, C., Vaish, V., Piplani, H., Nehru, B., & Sanyal, S. N. (2012). Nuclear Factor- κ B is expressed in early colon cancer and its down-regulation by Curcumin and Diclofenac is associated with the suppression of proliferation and the induction of apoptosis. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2(4), 228-238.
- Rao, C. V., & Reddy, B. S. (2004). NSAIDs and chemoprevention. *Current cancer drug targets*, 4(1), 29-42.

- Rao, S. K., Edwards, J., Joshi, A. D., Siu, I. M., & Riggins, G. J. (2010). A survey of glioblastoma genomic amplifications and deletions. *Journal of neuro-oncology*, 96(2), 169-179.
- Reese, D. M. Fundamentals--Rudolf Virchow and modern medicine. *Western journal of medicine*, 1998;169(2), 105
- Reifenberger, G., Szymas, J., & Wechsler, W. (1987). Differential expression of glial- and neuronal-associated antigens in human tumors of the central and peripheral nervous system. *Acta neuropathologica*, 74(2), 105-123.
- Reisser D, Pance A, Jeannin J.F. (2002). Mechanism of the antitumoral effect of the lipid A. *BioEssays*, 24:284.
- Reitman, Z. J., & Yan, H. (2010). Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(13), 932-941.
- Renner, K., Seilbeck, A., Kauer, N., Ugele, I., Siska, P. J., Brummer, C., ... & Kreutz, M. (2018). Combined metabolic targeting with metformin and the NSAIDs diflunisal and diclofenac induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Frontiers in Pharmacology*, 2018;9, 1258.
- Rérole, A. L., Jegou, G., & Garrido, C. (2011). Hsp70: anti-apoptotic and tumorigenic protein. In *Molecular Chaperones* (pp. 205-230). Humana Press.
- Rijavec, E., Genova, C., Barletta, G., Biello, F., Dal Bello, M. G., Coco, S., ... & Grossi, F. (2014). Efficacy of motesanib diphosphate in non-small-cell lung cancer. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 15(12), 1771-1780.
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386(6626), 671-674.
- Rivera, A. L., & Pelloski, C. E. (2010). Diagnostic and prognostic molecular markers in common adult gliomas. *Expert review of molecular diagnostics*, 10(5), 637-649.
- Robertson, T., Koszyca, B., & Gonzales, M. (2011). Overview and recent advances in neuropathology. Part 1: Central nervous system tumours. *Pathology*, 43(2), 88-92.
- Rodrigues, P., Bangali, H., Hammoud, A., Mustafa, Y. F., Al-Hetty, H. R. A. K., Alkhafaji, A. T., & Alsalamy, A. (2024). COX 2-inhibitors; a thorough and updated survey into combinational therapies in cancers. *Medical Oncology*, 41(1), 41.
- Ron, E., Modan, B., Boice Jr, J. D., Alfandary, E., Stovall, M., Chetrit, A., & Katz, L. (1988). Tumors of the brain and nervous system after radiotherapy in childhood. *New England Journal of Medicine*, 319(16), 1033-1039.
- Rosen, L. S. (2002). Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer control*, 9(2_suppl), 36-44

- Rosen, L. S., Kurzrock, R., Mulay, M., Van Vugt, A., Purdom, M., Ng, C., ... & Herbst, R. S. (2007). Safety, pharmacokinetics, and efficacy of AMG 706, an oral multikinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 25(17), 2369-2376.
- Rugo, H. S., Herbst, R. S., Liu, G., Park, J. W., Kies, M. S., Steinfeldt, H. M., ... & Wilding, G. (2005). Phase I trial of the oral antiangiogenesis agent AG-013736 in patients with advanced solid tumors: pharmacokinetic and clinical results. *Journal of Clinical Oncology*, 23(24), 5474-5483.
- Sakamoto, K. M. (2004). Su-11248 Sugen. *Current Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000)*, 5(12), 1329-1339.
- Sampson, V. B., Gorlick, R., Kamara, D., & Anders Kolb, E. (2013). A review of targeted therapies evaluated by the pediatric preclinical testing program for osteosarcoma. *Frontiers in oncology*, 3, 132.
- Sanai, N., Polley, M.Y., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Berger, M.S., (2011), An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas, *Journal of Neurosurgery*, 115 (1), 3-8
- Sandler, A., Gray, R., Perry, M. C., Brahmer, J., Schiller, J. H., Dowlati, A., ... & Johnson, D. H. (2006). Paclitaxel–carboplatin alone or with bevacizumab for non–small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 355(24), 2542-2550.
- Santosh V, Arivazhagan A, Sreekanthreddy P, Srinivasan H, Thota B, Srividya MR, Vrinda M, Sridevi S, Shailaja BC, Samuel C, Prasanna KV, Thennarasu K, Balasubramaniam A, Chandramouli BA, Hegde AS, Somasundaram K, Kondaiah P, Rao MR. (2010). Grade-specific expression of insulin-like growth factor-binding proteins-2, -3, and -5 in astrocytomas: IGFBP-3 emerges as a strong predictor of survival in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19:1399–408.
- Sasaki A, Ishiuchi S, Kanda T, Hasegawa M, Nakazato Y. (2001). Analysis of interleukin-6 gene expression in primary human gliomas, glioblastoma xenografts, and glioblastoma cell lines. *Brain Tumor Pathol.*, 18:13-21.
- Sasaki A, Tamura M, Hasegawa M, Ishiuchi S, Hirato J, Nakazato Y. (1998). Expression of interleukin-1B mRNA and protein in human gliomas assessed by RT-PCR and immunohistochemistry. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 57: 653-663.
- Schack, A., Fransgaard, T., Klein, M. F., & Gögenur, I. (2019). Perioperative use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs decreases the risk of recurrence of cancer after colorectal resection: a cohort study based on prospective data. *Annals of surgical oncology*, 26(12), 3826-3837
- Scherer, H. J. (1940). The forms of growth in gliomas and their practical significance. *Brain*, 63(1), 1-35.

- Schlumberger MJ, Elisei R, Bastholt L, Wirth LJ, Martins RG, Locati LD, vd. (2009). Phase II study of safety and efficacy of motesanib in patients with progressive or symptomatic, advanced or metastatic medullary thyroid cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009;27:3794–3801.
- Schwartzberg, L. S., Hurwitz, H., Stephenson Jr, J., Kotasek, D., Goldstein, D., Tebbutt, N., & Burris, H. (2007). Safety and pharmacokinetics (PK) of AMG 706 with panitumumab plus FOLFIRI or FOLFOX for the treatment of patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). *Journal of Clinical Oncology*, 25(18_suppl), 4081-4081.
- Scotlandi K. (2006). Targeted therapies in Ewing's sarcoma. *Adv Exp Med Biol.* 587:13-22.
- Seed, M. P., Brown, J. R., Freemantle, C. N., Papworth, J. L., Colville-Nash, P. R., Willis, D., & Willoughby, D. A. (1997). The inhibition of colon-26 adenocarcinoma development and angiogenesis by topical diclofenac in 2.5% hyaluronan. *Cancer research*, 57(9), 1625-1629
- Serrano M. (1997). The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* 237: 7–13
- Sharma P, Aaroe A, Liang J, Puduvalli V. (2023). Tumor microenvironment in glioblastoma: Current and emerging concepts. *Neuro-Oncology Advances*, Volume 5, Issue 1, vdad009
- Shenouda, G., Souhami, L., Petrecca, K., Panet-Raymond, V., Owen, S., Diaz, R. J., ... & Abdulkarim, B. S. (2020). A Phase 2 Study of Neo-adjuvant Metformin and Temozolomide followed by Hypofractionated Accelerated RadioTherapy (HART) with Concomitant and Adjuvant Metformin and Temozolomide (TMZ) in Patients with Glioblastoma. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 108(3), S21.
- Sherman SI, Wirth LJ, Droz J, Hofmann M, Bastholt L, Martins RG, vd. (2008). Motesanib Diphosphate in Progressive Differentiated Thyroid Cancer. *N. Engl. J. Med.* 359:31–42
- Sherr CJ, Roberts JM. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13: 1501-1502.
- Shibuya M. (1995). Role of VEGF-Flt receptor system in normal and tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res.* 1995;67:281-316
- Shibuya, M. (2006). Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): A dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis.* 9(4), 225-230.
- Shiraishi H, Yoshida H, Saeki K. (2008). Prostaglandin E2 is a major soluble factor produced by stromal cells for preventing inflammatory cytokine production from dendritic cells. *Int Immunol*, 20(9):1219–1229.
- Shono, T. vd. (2001) Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Res.* 61, 4375–4381

- Shukla S, Chen ZS, Ambudkar SV. (2012). Tyrosine kinase inhibitors as modulators of ABC transporter-mediated drug resistance. *Drug Resist Updat.* 2012;15:70–80
- Slee E.A., Adrain C, Martin S.J., (2001). Executioner caspases-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis, *The Journal of Biological Chemistry*, 276(10):7320-7326.
- Smakman, N., Kranenburg, O., Vogten, J. M., Bloemendaal, A. L., van Diest, P., & Borel Rinkes, I. H. (2005). Cyclooxygenase-2 is a target of krasd12, which facilitates the outgrowth of murine c26 colorectal liver metastases. *Clin Cancer Res.* 11 (1): 41-48
- Smirnova, A. V., Lazebnik, L. B., Trubitsina, I. E., Tkachenko, E. V., Varvarina, G. G., Drozdov, V. N., ... & Sokolova, Z. A. (2012). Antiproliferative activity of diclofenac at tumor cell cultures. *Eksperimental'naia i Klinicheskaia Gastroenterologiya= Experimental & Clinical Gastroenterology*, (5), 66-69
- Smith, R. A., Andrews, K. S., Brooks, D., Fedewa, S. A., Manassaram-Baptiste, D., Saslow, D. and Wender, R. C. (2019). Cancer screening in the United States, 2019: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. *CA: a cancer journal for clinicians*, 69(3), 184-210
- Sombroek CC, Stam AGM, Masterson AJ. (2002). Prostanoids play a major role in the primary tumor-induced inhibition of dendritic cell differentiation. *J Immunol*, 168(9):4333–4343.
- Song MS, Salmena L & Pandolfi PP (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature reviews. Molecular cell biology* 13, 283–296, doi: 10.1038/nrm3330 (2012).
- Song, X., Lin, H. P., Johnson, A. J., Tseng, P. H., Yang, Y. T., Kulp, S. K., & Chen, C. S. (2002). Cyclooxygenase-2, player or spectator in cyclooxygenase-2 inhibitor-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(8), 585-591.
- Soo, E. T., Yip, G. W., Lwin, Z. M., Kumar, S. D., & Bay, B. H. (2008). Heat shock proteins as novel therapeutic targets in cancer. *In vivo*, 22(3), 311-315.
- Soslow, R. A., Dannenberg, A. J., Rush, D., Woerner, B. M., Khan, K. N., Masferrer, J., & Koki, A. T. (2000). COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *cancer*, 89(12), 2637-2645.
- Söderberg-Nauclér, C., Rahbar, A., & Stragliotto, G. (2013). Survival in patients with glioblastoma receiving valganciclovir. *New England Journal of Medicine*, 369(10), 985-986.
- Squatrino, M., & Holland, E. C. (2011). DNA Damage Response and Growth Factor Signaling Pathways in Gliomagenesis and Therapeutic Resistance DNA Damage Response in Gliomagenesis and Therapy Resistance. *Cancer research*, 71(18), 5945-5949.

- Stommel, J. M., Kimmelman, A. C., Ying, H., Nabioullin, R., Ponugoti, A. H., Wiedemeyer, R., ... & DePinho, R. A. (2007). Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science*, 318(5848), 287-290
- Storz, P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Front biosci*, 10(1-3), 1881-1896.
- Stoyanov GS, Dzhenkov D, Ghenev P, Iliev B, Enchev Y, Tonchev AB. Cell biology of glioblastoma multiforme: from basic science to diagnosis and treatment. *Med Oncol*. 2018 Jan 31;35(3):27.
- Stupp, R., Hegi, M. E., Gilbert, M. R., & Chakravarti, A. (2007). Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *Journal of Clinical Oncology*, 25(26), 4127-4136.
- Stupp, R., Mason, W. P., Van Den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., ... & Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England journal of medicine*, 352(10), 987-996.
- Sturm, D., Witt, H., Hovestadt, V., Khuong-Quang, D. A., Jones, D. T., Konermann, C., ... & Pfister, S. M. (2012). Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer cell*, 22(4), 425-437
- Sun, P., Dong, P., Dai, K., Hannon, G.J., Beach, D., (1998). p53-independent role of Mdm2 in TGF- β 1 resistance. *Science* 282, 2270–2272.
- Sweeney, C. J., Miller, K. D., Sissons, S. E., Nozaki, S., Heilman, D. K., Shen, J., & Sledge Jr, G. W. (2001). The antiangiogenic property of docetaxel is synergistic with a recombinant humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor or 2-methoxyestradiol but antagonized by endothelial growth factors. *Cancer research*, 61(8), 3369-3372.
- Szatrowski, T. P., & Nathan, C. F. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer research*, 51(3), 794-798.
- T.C. Sağlık Bakanlığı HSGM. (2015) Türkiye Kanser istatistikleri. In Ankara; 2018. Available from: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2015.pdf
- Taatjes DJ, Sobel BE, Budd RC. (2008). Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem Cell Biol* 2008, 129(1):33-43
- Takahashi, T.; Yamaguchi, S.; Chida, K.; Shibuya, M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-Adependant activation of PLC- γ and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.*, 2001, 20(11), 2768-2778.

- Taketo, M. M. (1998). Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *Journal of the National Cancer Institute*, 90(20), 1529-1536.
- Tangrea, J. A., Albert, P. S., Lanza, E., Woodson, K., Corle, D., Hasson, M., ... & Schatzkin, A. (2003). Non-steroidal anti-inflammatory drug use is associated with reduction in recurrence of advanced and non-advanced colorectal adenomas (United States). *Cancer Causes & Control*, 14, 403-411.
- Taniura S, Kamitani H, Watanabe T, Eling T.E. (2008). Induction of cyclooxygenase-2 expression by interleukin -1B in human glioma cell line, U87MG. *Neurol Med Chir.*, 48:500-505.
- Terrero, M.N. and Li, S. (2004). Growth factor receptors: targets for gene therapy and immunotherapy for cancer treatment. *Gene Ther Mol Biol* Vol 8, 175-180.
- Tewary, P., Gunatilaka, A. L., & Sayers, T. J. (2017). Using natural products to promote caspase-8-dependent cancer cell death. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 66(2), 223-231
- Tobelem, G. (2007). VEGF: a key therapeutic target for the treatment of cancer-insights into its role and pharmacological inhibition. *Targeted Oncology*, 2(3), 153-164
- Tolba, R. H., Fet, N., Yonezawa, K., Taura, K., Nakajima, A., Hata, K., ... & Yamamoto, Y. (2014). Role of preferential cyclooxygenase-2 inhibition by meloxicam in ischemia/reperfusion injury of the rat liver. *European Surgical Research*, 53(1-4), 11-24
- Torack RM (1961). Ultrastructure of capillary reaction to brain tumors. *Arch Neurol* 5:416–428.
- Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J., & Hiai, H. (1995). Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS letters*, 358(1), 1-3.
- Tsai M.J., Chang W.A., Huang M.S., Kuo P.L. (2014). Tumor microenvironment: A new treatment target for cancer. *ISRN Biochem*, 2014:1-8.
- Udono, H., & Srivastava, P. K. (1993). Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *The Journal of experimental medicine*, 178(4), 1391-1396.
- Ulrich, C. M., Bigler, J., & Potter, J. D. (2006). Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. *Nature Reviews Cancer*, 6(2), 130-140.
- Umetani N, Hoon DS. (2004). Frequent LOH at chromosome 12q22-23 and Apaf-1 inactivation in glioblastoma. *Brain Pathol.* 2004;14:224
- Urbańska K, Sokołowska J, Szmidt M, Sysa P. (2014). Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2014;18(5):307-12.

- Urbańska, K., Sokołowska, J., Szmidt, M., & Sysa, P. (2014). Glioblastoma multiforme—an overview. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*, 18(5), 307-312.
- Vaish, V., Tanwar, L., Kaur, J., & Sanyal, S. N. (2011). Chemopreventive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs in early neoplasm of experimental colorectal cancer: an apoptosome study. *Journal of gastrointestinal cancer*, 42(4), 195-203.
- Valle, B. L., D'Souza, T., Becker, K. G., Wood III, W. H., Zhang, Y., Wersto, R. P., & Morin, P. J. (2013). Non-steroidal anti-inflammatory drugs decrease E2F1 expression and inhibit cell growth in ovarian cancer cells. *PLoS One*, 8(4), e61836.
- Valtola, R., Salven, P., Heikkilä, P., Taipale, J., Joensuu, H., Rehn, M., ... & Alitalo, K. (1999). VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *The American journal of pathology*, 154(5), 1381-1390.
- Van Hecken A, Schwartz JI and Depré M vd (2000) Comparative inhibitory activity of rofecoxib, meloxicam, diclofenac, ibuprofen, and naproxen on COX-2 versus COX-1 in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*, 40(10):1109–20.
- Van Hecken, A., Schwartz, J. I., Depré, M., De Lepeleire, I., Dallob, A., Tanaka, W., ... & De Schepper, P. J. (2000). Comparative inhibitory activity of rofecoxib, meloxicam, diclofenac, ibuprofen, and naproxen on COX-2 versus COX-1 in healthy volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 40(10), 1109-1120.
- Van Meir, E. G., Hadjipanayis, C. G., Norden, A. D., Shu, H. K., Wen, P. Y., & Olson, J. J. (2010). Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA: a cancer journal for clinicians*, 60(3), 166-193.
- Van Trappen, P. O., Steele, D., Lowe, D. G., Baithun, S., Beasley, N., Thiele, W., ... & Jacobs, I. J. (2003). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D, and their receptor VEGFR-3, during different stages of cervical carcinogenesis. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 201(4), 544-554.
- Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., & Cancer Genome Atlas Research Network. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer cell*, 17(1), 98-110
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 408(6810), 307–310 (2000).
- Walker, M. D., Alexander, E., Hunt, W. E., MacCarty, C. S., Mahaley, M. S., Mealey, J., ... & Strike, T. A. (1978). Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas: a cooperative clinical trial. *Journal of neurosurgery*, 49(3), 333-343.

- Walker, M. D., Green, S. B., Byar, D. P., Alexander Jr, E., Batzdorf, U., Brooks, W. H., ... & Strike, T. A. (1980). Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *New England Journal of Medicine*, 303(23), 1323-1329.
- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., & Heldin, C. H. (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 269(43), 26988-26995.
- Wang, X., Baek, S. J., & Eling, T. (2011). COX inhibitors directly alter gene expression: role in cancer prevention?. *Cancer and Metastasis Reviews*, 30, 641-657.
- Wasserman J, Blomgren H, Rotstein S. (1989). Immunosuppression in irradiated breast cancer patients: in vitro effect of cyclooxygenase inhibitors. *B New York Acad Med*, 65(1):36–44
- Watanabe, K., Sato, K., Biernat, W., Tachibana, O., von Ammon, K., Ogata, N., ... & Ohgaki, H. (1997). Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 3(4), 523-530.
- Weller, M., Wick, W., Hegi, M. E., Stupp, R., & Tabatabai, G. (2010). Should biomarkers be used to design personalized medicine for the treatment of glioblastoma?. *Future Oncology*, 6(9), 1407-1414.
- Wiedemeyer WR, Dunn IF, Quayle SN, Zhang J, Chheda MG, Dunn GP, Zhuang L, Rosenbluh J, Chen S, Xiao Y, Shapiro GI, Hahn WC, Chin L. (2010). Pattern of retinoblastoma pathway inactivation dictates response to CDK4/6 inhibition in GBM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:11501–6
- Wona E.K., Zahnera M.C., Grantb E.A., Gorea P, Chicoinea M.R. (2003).Analysis of the antitumoral mechanisms of lipopolysaccharide against glioblastoma multiforme. *Anti-Cancer Drugs*, 14:457–466.
- Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M., & Berger, M. S. (2002). Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro-oncology*, 4(4), 278-299.
- Wu, D., & Yotnda, P. (2011). Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (57), e3357.
- Wu, G., Luo, J., Rana, J. S., Laham, R., Sellke, F. W., & Li, J. (2006). Involvement of COX-2 in VEGF-induced angiogenesis via P38 and JNK pathways in vascular endothelial cells. *Cardiovascular research*, 69(2), 512-519.
- Xu K, Shu HK. EGFR activation results in enhanced cyclooxygenase-2 expression through p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the Sp1/Sp3 transcription factors in human gliomas. *Cancer Res*. 2007; 67:6121–6129.

- Xu, N., Zhang, C., Jing, L., Mou, S., Cao, X., & Yu, Z. (2021). Protective effect and mechanism of rebamipide on NSAIDs associated small bowel injury. *International Immunopharmacology*, 90, 107136.
- Xu, X., Farach-Carson, M. C., & Jia, X. (2014). Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation. *Biotechnology advances*, 32(7), 1256-1268.
- Xu, X., Zhao, J., Xu, Z., Peng, B., Huang, Q., Arnold, E., & Ding, J. (2004). Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. *Journal of Biological Chemistry*, 279(32), 33946-33957.
- Vousden, K. H. (2005). p53 and PUMA: a deadly duo. *Science*, 309(5741), 1685-1686.
- Yagi, K., Kawasaki, Y., Nakamura, H., Miura, T., Takeda, T., Esumi, S., & Sendo, T. (2014). Differential combined effect of COX inhibitors on cell survival suppressed by sorafenib in the HepG2 cell line. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(7), 1234-1240.
- Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., ... & Bigner, D. D. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *New England journal of medicine*, 360(8), 765-773.
- Yang, A. D., Camp, E. R., Fan, F., Shen, L., Gray, M. J., Liu, W., & Ellis, L. M. (2006). Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer research*, 66(1), 46-51.
- Yang, L., Li, J., Li, Y., Zhou, Y., Wang, Z., Zhang, D., & Zhang, X. (2021). Diclofenac impairs the proliferation and glucose metabolism of triple-negative breast cancer cells by targeting the c-Myc pathway. *Experimental and therapeutic medicine*, 21(6), 1-9.
- Yaqub S, Henjum K, Mahic M. (2008). Regulatory T cells in colorectal cancer patients suppress anti-tumor immune activity in a COX-2 dependent manner. *Cancer Immunol Immunother*, 57(6):813–821.
- Yar, A.T. (2012). Kolon Kanser Hücre Hatlarında Reseptör Tirozin Kinaz Ve Jak-Stat İnhibitörlerinin Apoptotik Ve Anti-Proliferatif Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Yildiz-Ozer, M., Oztopcu-Vatan, P., & Kus, G. (2018). The investigation of ceranib-2 on apoptosis and drug interaction with carboplatin in human non small cell lung cancer cells in vitro. *Cytotechnology*, 70, 387-396.
- Ymer, S. I., Greenall, S. A., Cvrljevic, A., Cao, D. X., Donoghue, J. F., Epa, V. C., ... & Johns, T. G. (2011). Glioma specific extracellular missense mutations in the first cysteine rich region of epidermal growth factor receptor (EGFR) initiate ligand independent activation. *Cancers*, 3(2), 2032-2049

- Yoshimura, R., Sano, H., Masuda, C., Kawamura, M., Tsubouchi, Y., Chargui, J., & Wada, S. (2000). Expression of cyclooxygenase-2 in prostate carcinoma. *Cancer*, 89(3), 589-596.
- Zappavigna, S., Cossu, A. M., Grimaldi, A., Bocchetti, M., Ferraro, G. A., Nicoletti, G. F., & Caraglia, M. (2020). Anti-inflammatory drugs as anticancer agents. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2605.
- Zarghi, A., & Arfaei, S. (2011). Selective COX-2 inhibitors: a review of their structure-activity relationships. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 10(4), 655
- Zawlik I, Kita D, Vaccarella S, Mittelbronn M, Franceschi S, Ohgaki H. (2009). Common polymorphisms in the MDM2 and TP53 genes and the relationship between TP53 mutations and patient outcomes in glioblastomas. *Brain Pathol*. 2009;19:188–94
- Zerbini, L. F., Tamura, R. E., Correa, R. G., Czibere, A., Cordeiro, J., Bhasin, M., ... & Libermann, T. A. (2011). Combinatorial effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs and NF- κ B inhibitors in ovarian cancer therapy. *PLoS One*, 6(9), e24285.
- Zhang, H., & Sun, X. F. (2002). Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with advanced stages of colorectal cancer. *Am J Gastroenterol*. 97 (4): 1037-1041
- Zhang, J., Yang, P. L., & Gray, N. S. (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature reviews cancer*, 9(1), 28-39
- Zhang, W., Zhu, C., Wu, Y., Ye, D., Wang, S., Zou, D., & Jiang, X. (2014). VEGF and BMP-2 promote bone regeneration by facilitating bone marrow stem cell homing and differentiation. *Eur Cell Mater*, 27(12), 1.
- Zhao Y, Gao J.L., Ji J.W., Gao M, Yin Q.S., Qiu Q.L., Wang C, Chen S.Z., Xu J, Liang R.S., Cai Y.Z., Wang X.F. (2014). Cytotoxicity enhancement in MDA-MB 231 cells by the combination treatment of tetrahydropalmatine and berberine derived. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 3(2):68-72.
- Zhong, H.; Bowen, J.P. (2007). Molecular design and clinical development of VEGFR kinase inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.*, 7(14), 1379-1393.
- Zhu Y, Shah K. (2014). Multiple lesions in receptor tyrosine kinase pathway determine glioblastoma response to panERBB inhibitor PF-00299804 and PI3K/mTOR dual inhibitor PF-05212384. *Cancer Biology & Therapy*, 15(6):815–822.
- Zhu, G.; Huang, Q.; Zheng, W.; Huang, Y.; Hua, J.; Yang, S.; Zhuang, J.; Wang, J.; Chang, J.; Xu, J.; Ye, J. (2016). LPS upregulated VEGFR-3 expression promote migration and invasion in colorectal cancer via a mechanism of increased NF- κ B binding to the promoter of VEGFR-3. *Cell. Physiol. Biochem*, 39(5), 1665-1678
- Zülch, K. J. (1978). Principles of the new WHO classification of brain tumors. In *Head Injuries. Tumors of the Cerebellar Region* (pp. 279-284). Springer, Berlin, Heidelberg.

ÖZGEÇMİŞ

Uyruğu : T.C.

Eğitim Durumu

İlk orta ve lise öğrenimini Halep te tamamladım.

Lisans : Alhwash Üniversitesi Eczacılık Fakültesi- 2013 (5 yıllık)

Yüksek Lisans :Gaziantep üniversitesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı.Ağustos 2017

Doktora :Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı. Şubat 2025

Yabancı Dil : İngilizce, Arapça

Yayınlar

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. Taysi, S., Alafandi, N., Demir, E., & Çınar, K. (2021). Propolis attenuates nitrosative stress in the brain tissue of rats exposed to total head irradiation. *European Journal of Therapeutics*, 27(4), 281-285.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. Taysı, S., Alafandi, N., Demir, E., Çınar, K., & Tarakçıoğlu, M. (2018). The investigation of the effect of propolis on nitrosative stress in the brain tissue of rats exposed to total head irradiation. *Journal of Cellular Neuroscience & Oxidative Stress*, 10(2).