



**MTX-211'İN NONSTEROİDAL ANTİENFLAMATUAR BİR İLAÇ İLE
KOMBİNASYONUNUN ANTİKANSER, ANTİENFLAMATUAR VE
ANTİANJİYOJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Züleyha BARAN

Eskişehir 2024

**MTX-211'İN NONSTEROİDAL ANTİENFLAMATUAR BİR İLAÇ İLE
KOMBİNASYONUNUN ANTİKANSER, ANTİENFLAMATUAR VE
ANTİANJİYOJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Züleyha BARAN

DOKTORA TEZİ

Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Lisanüstü Eğitim Enstitüsü

Ocak 2024

*Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen ID-2126 (proje kodu 2207S150)
proje kapsamında desteklenmiştir.*

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Züleyha BARAN'ın "MTX-211'in Nonsteroidal Antienflamatuar Bir İlaç ile Kombinasyonunun Antikanser, Antienflamatuar ve Antianjiyojenik Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tezi 22/01/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakoloji Anabilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Miriş DİKMEN	
Üye	: Prof. Dr. Rana ARSLAN	
Üye	: Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK	
Üye	: Doç. Dr. Semra YİĞİTASLAN	
Üye	: Doç. Dr. Gözde AYDOĞAN KILIÇ	

.....

Enstitü Müdürü

ÖZET

MTX-211'İN NONSTEROİDAL ANTİENFLAMATUAR BİR İLAÇ İLE KOMBİNASYONUNUN ANTİKANSER, ANTİENFLAMATUAR VE ANTİANJİYOJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Züleyha BARAN

Farmakoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisanüstü Eğitim Enstitüsü, Ocak 2024

Danışman: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Glioblastoma multiforme, tümör heterojenitesi, kemoterapötiklerin kan beyin bariyerinden geçişlerinin zorluğu, tedavide kullanılan ilaçlara hızlıca direnç gelişmesi ile tedavilerin başarısızlıkla sonuçlandığı en agresif beyin tümörüdür.

Tez çalışmamızda glioblastomada aşırı eksprese edilen EGFR ve PI3Kinaz'ı inhibe eden MTX-211 ve glioblastomanın gelişmesinde ve ilerlemesinde önemli rol oynayan COX-2/PGE2'yi inhibe eden diklofenak dietilaminin THP-1, HUVEC ve U87MG hücrelerinde sitotoksik etkileri ile kombin uygulamaların sinerjistik/antagonist etkileri, U87MG ve THP-1 ko-kültürde apoptotik, antienflamatuar, antimetastatik etkileri ve HUVEC ve THP-1 ko-kültürde antianjiyojenik etkileri incelenmiştir.

MTX-211 ve diklofenak dietilamin ile THP-1 hücre hattında kayda değer bir sitotoksik etki gözlenmezken, HUVEC hücre hattında zaman ve konsantrasyona bağlı sitotoksik etkilerin olduğu, U87MG hücre hattında güçlü sitotoksik etkilerin meydana geldiği ve U87MG hücre hattında kombinasyon uygulamasının sinerjistik etkili olduğu belirlenmiştir. MTX-211 ve diklofenak dietilamin kombinasyonları ile apoptoz indüklenmiş, LPS ile indüklenen IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF α proinflamatuar sitokin ekspresyonları inhibe edilmiş, U87MG ve HUVEC hücre migrasyonları güçlü bir şekilde inhibe edilerek güçlü antimetastatik ve antianjiyojenik etkiler meydana gelmiştir.

Sağlıklı hücreler ve kanser hücrelerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilen deneyler sonucunda, prelinik aşamada bir madde olan MTX-211, nonsteroidal antienflamatuar bir ilaç olan diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının kanser tedavisi için umut vaat eden özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: MTX-211, Diklofenak, Glioblastoma, Antikanser



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ANTI-CANCER, ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIANGIOGENIC EFFECTS OF MTX-211 COMBINATION WITH A NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUG

Züleyha BARAN

Department of Pharmacology

Anadolu University, Graduate School of Education, January 2024

Supervisor: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Glioblastoma multiforme is the most aggressive brain tumor where treatments fail due to tumor heterogeneity, difficulty in passing chemotherapeutics through the blood-brain barrier and rapid development of resistance to the drugs used in treatment.

In our thesis study, we examined the cytotoxic effects of MTX-211, which inhibits EGFR and PI3Kinase, which are overexpressed in glioblastoma and diclofenac diethylamine, which inhibits COX-2/PGE₂, which plays an important role in the development and progression of glioblastoma and the synergistic/antagonist effects of combined applications on THP-1, HUVEC and U87MG cells and apoptotic, anti-inflammatory, antimetastatic effects in U87MG and THP-1 co-culture and antiangiogenic effects in HUVEC and THP-1 co-culture were examined.

While no significant cytotoxic effect was observed with MTX-211 and diclofenac diethylamine on the THP-1 cell line, it was determined that there were time- and concentration-dependent cytotoxic effects in the HUVEC cell line, strong cytotoxic effects occurred in the U87MG cell line and the combination application was synergistic in the U87MG cell line. Apoptosis was induced with MTX-211 and diclofenac diethylamine combinations, LPS-induced IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF α proinflammatory cytokine expressions were inhibited, U87MG and HUVEC cell

migrations were strongly inhibited, resulting in strong antimetastatic and antiangiogenic effects occurred.

As a result of experiments conducted using healthy cells and cancer cells, it was determined that MTX-211, a preclinical substance, diclofenac diethylamine, a nonsteroidal anti-inflammatory drug and their combinations had promising properties for cancer treatment.

Keywords: MTX-211, Diclofenac, Glioblastoma, Anticancer



TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım boyunca gösterdiği paha biçilemez rehberliği, sabrı, engin bilgisi ve tecrübeleri, yapıcı eleştirileri ve geri bildirimleri ile tezimi şekillendirmemde çok önemli rolü olan, doktora sürecimi tamamlamam ve daha iyisini başarabilmem için beni yönlendiren, ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan, kendisine daima minnettar olacağım çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Miriş DİKMEN'e,

Hem akademik hem sosyal desteğini gördüğüm, akım sitometrisi alanında gelişmem için bana cömertçe zaman ayıran, her türlü bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, sıcaklığını ve samimiyetini her daim hissettiğim sevgili hocam Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK'e,

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,

Doktora sürecim boyunca manevi desteğini asla esirgemeyen bana hem evini hem de yüreğini açan canım dostum Hacer CİNTOSUN'a, motivasyonumu yüksek tutmam için her türlü çabayı gösteren, daima yanımda olan ve sevgisini her zaman hissettiğim canım dostum Şebnem Ceren ERTEK'e, laboratuvar çalışmalarımızı birlikte sürdürüp doktoradan birlikte mezun olduğumuz, farmakolojideki en büyük kazanımlarımdan biri olan canım arkadaşım Ayşe KÖSE'ye,

Doktora sürecime katkısını, büyük bir fedakârlıkla bana sağlığını kazandırarak sağlayan çok değerli hocam Prof. Dr. Nurullah AKKOÇ'a,

Hayatımın tüm aşamalarında sevgi, ilgi ve fedakârlıklarıyla bugünlere gelmemi sağlayan, hayallerime ulaşmamda desteklerini her zaman hissettiğim, sonsuz sevgiyle bağlı olduğum ve tezimi ithaf ettiğim çok sevgili annem Ayten BARAN'a, babam Mehmet Vechettin BARAN'a ve kardeşlerime en içten teşekkürlerimi sunarım.

22.01.2024

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

Züleyha BARAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kanser.....	2
2.2. Glioblastoma Multiforme (GBM).....	4
2.3. Glioblastoma Epidemiyolojisi.....	6
2.4. Glioblastoma Etiyolojisi.....	7
2.4.1. Çevresel faktörler.....	7
2.4.2. Alerji hikayesi.....	7
2.4.3. Ailesel kalıtım.....	7
2.5. Glioblastomada Genetik Patogenez.....	8
2.5.1. EGFR (Epidermal büyüme faktörü reseptörü).....	12
2.5.1.1. Glioblastomada EGFR'nin onkojenik sinyal oluşturmasına neden olan mekanizmalar.....	17
2.5.1.1.1. EGFR overekspresyonu.....	18
2.5.1.1.2. Otokrin ligand üretimi.....	18
2.5.1.1.3. Heterodimerizasyon ve crosstalk.....	18
2.5.1.1.4. EGFR downregülasyonunun bozulması....	18
2.5.1.1.5. EGFR mutasyonları.....	19
2.6. Glioblastoma ve Tümör Mikroçevresi.....	19
2.6.1. Tümör ilişkili makrofajlar ve inflamasyon.....	21
2.6.1.1. COX ve PGE2.....	22
2.7. MTX-211.....	25

2.8. Diklofenak Dietilamin.....	26
3. GEREÇLER.....	30
3.1. Deneylerde Kullanılan Hücreler.....	30
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar.....	30
3.3. Kullanılan Malzemelerin Steril Edilmesi.....	32
3.4. Kullanılan Kimyasal Maddelerin ve İlaçların Hazırlanması.....	32
4. YÖNTEMLER.....	33
4.1. U87MG, THP-1 ve HUVEC Hücrelerinin Kültür Ortamında Çoğaltılması, Hücre Sayımı ve Deneylere Hazırlık.....	34
4.2. 2D Hücre Kültürü Çalışmaları.....	35
4.2.1. CellTiter-Blue ile U87MG, THP-1 ve HUVEC hücrelerinde sitotoksitenin belirlenmesi.....	35
4.2.2. MTX-211 (5 µM, 10 µM, 20 µM) ve diklofenak dietilaminin (50 µM, 100 µM ve 300 µM) kombinasyonlarının U87MG, HUVEC ve THP-1 hücreleri üzerinde sinerjistik sitotoksik etkilerinin belirlenmesi.....	37
4.2.3. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) ile U87MG hücrelerinde MTX-211'in antiproliferatif etkilerinin belirlenmesi.....	37
4.2.4. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) ile U87MG hücre migrasyonunun incelenmesi.....	38
4.3. Ko-Kültür Çalışmaları.....	39
4.3.1. THP-1 hücrelerinin LPS ile aktive edilme çalışmaları.....	39
4.3.2. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) ile THP- 1 ve U87MG ko-kültür ortamlarında hücre proliferasyonunun belirlenmesi.....	39
4.3.3. Antikanser etkinin belirlenmesi.....	40
4.3.3.1. U87MG ve THP-1 ko-kültürde (insertli) akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi.....	40
4.3.3.2. U87MG ve THP-1 ko-kültürde (insertli) akış sitometride kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkinin belirlenmesi.....	41

4.3.4. Antienflamatuar etkinin belirlenmesi.....	42
4.3.4.1. U87MG ve THP-1 ko-kültürde (insertsüz) akış sitometride interlökin-1 beta (IL-1 β) seviyelerinin belirlenmesi.....	42
4.3.4.2. U87MG ve THP-1 ko-kültürde (insertsüz) akış sitometride interlökin -6, -8, -10 (IL-6, IL-8, IL-10) ve tümör nekroz faktörü α (TNF α) seviyelerinin belirlenmesi.....	42
4.3.5. Çizik deneyi ile U87MG ve THP-1, HUVEC ve THP-1 ko-kültürde (insertli) migrasyonun incelenmesi.....	43
4.4. İstatistiksel Değerlendirmeler.....	44
5. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	45
5.1. 2D Hücre Kültürü Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	45
5.1.1. MTX-211 ve diklofenak dietilaminin tekli ve kombinasyonlarının CellTiter-Blue ile THP-1 hücrelerinde 24. ve 48. saat sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.....	45
5.1.2. MTX-211 ve diklofenak dietilaminin tekli ve kombinasyonlarının CellTiter-Blue ile HUVEC hücrelerinde 24. ve 48. saat sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.....	47
5.1.3. MTX-211 ve diklofenak dietilaminin tekli ve kombinasyonlarının CellTiter-Blue ile U87MG hücrelerinde 24. ve 48. saat sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.....	50
5.1.4. MTX-211 (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) ve diklofenak dietilaminin (50 μ M, 100 μ M, 300 μ M) kombinasyonlarının U87MG, HUVEC ve THP-1 hücreleri üzerinde sinerjistik sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.....	52
5.1.5. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) ile U87MG hücrelerinde MTX-211'in antiproliferatif etkilerinin değerlendirilmesi.....	61
5.1.6. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) ile U87MG hücre migrasyonunun değerlendirilmesi.....	63
5.2. Ko-kültür Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	63
5.2.1. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) ile U87MG ve THP-1 ko-kültür ortamında hücre	

proliferasyonunun değ erlendirilmesi.....	63
5.2.2. Akış sitometride Annexin V-PI yönt emi ile apoptotik etkinin değ erlendirilmesi.....	65
5.2.3. Akış sitometride kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkinin değ erlendirilmesi.....	69
5.2.4. U87MG ve THP-1 ko-kültürde (insertsüz) akış sitometride IL-1β seviyelerinin değ erlendirilmesi.....	72
5.2.5. U87MG ve THP-1 ko-kültürde (insertsüz) akış sitometride IL-6, IL-8, IL-10 ve TNFα seviyelerinin değ erlendirilmesi.....	75
5.2.6. U87MG ve THP-1 ko-kültürde (insertlü) U87MG hücrelerinin migrasyonunun değ erlendirilmesi.....	88
5.2.7. HUVEC ve THP-1 ko-kültürde (insertlü) HUVEC hücrelerinin migrasyonunun değ erlendirilmesi.....	92
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	97
KAYNAKÇA.....	104
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.1. Yapılan çalışmalar ve uygulanan yöntemlerin şematik olarak gösterilmesi.....	33
Tablo 4.2. Kontrol, MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının 96 kuyucuklu plakalara uygulanma düzeni..	36
Tablo 5.1. THP-1 hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının 24. saatteki % hücre canlılık oranları (Ortalama $\pm$ Standart sapma) ve CDI değerleri.....	53
Tablo 5.2. THP-1 hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının 48. saatteki % hücre canlılık oranları (Ortalama $\pm$ Standart sapma) ve CDI değerleri.....	54
Tablo 5.3. HUVEC hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının 24. saatteki % hücre canlılık oranları (Ortalama $\pm$ Standart sapma) ve CDI değerleri.....	55
Tablo 5.4. HUVEC hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının 48. saatteki % hücre canlılık oranları (Ortalama $\pm$ Standart sapma) ve CDI değerleri.....	55
Tablo 5.5. U87MG hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının 24. saatteki % hücre canlılık oranları (Ortalama $\pm$ Standart sapma) ve CDI değerleri.....	56
Tablo 5.6. U87MG hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının 48. saatteki % hücre canlılık oranları (Ortalama $\pm$ Standart sapma) ve CDI değerleri.....	56
Tablo 5.7. U87MG hücrelerinde MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinlerinin Annexin-PI apoptoz sonuçları (%)..	66
Tablo 5.8. U87MG hücrelerinde MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının kaspaz-3 sonuçları (%).	71
Tablo 5.9. U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının IL-1 β seviyelerine etkisi (%).	73
Tablo 5.10. U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının TNF α	

seviyelerine etkisi (%).....	76
Tablo 5.11. U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının IL-6 seviyelerine etkisi (%).....	79
Tablo 5.12. U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının IL-8 seviyelerine etkisi (%).....	82
Tablo 5.13. U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının IL-10 seviyelerine etkisi (%).....	85



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Primer ve sekonder GBM'nin en sık görülen ve ilgili moleküler anormallikleri	4
Şekil 2.2. TC sağlık bakanlığı 2015 verilerine göre yaşa özel beyin ve sinir sistemi kanserleri (C70-72) hızları.....	5
Şekil 2.3. Kanser kök hücrelerinin PTEN aracılı mekanizmaları	12
Şekil 2.4. EGFR'nin hücre içi sinyal ileti yolları ve etkileri	13
Şekil 2.5. Reseptör tirozin kinazlarının Ras aracılı etkileri.....	14
Şekil 2.6. Ras aracılı hücre içi etkiler.....	15
Şekil 2.7. Membran reseptörleri aracılı STAT aktivasyonu	16
Şekil 2.8. Glioblastomada EGFR'nin onkojenik sinyal oluşturmaya neden olan mekanizmalar.....	17
Şekil 2.9. EP Reseptörleri aracılığıyla PGE2 sinyalleme sisteminin gliomagenездеki rolü.....	23
Şekil 2.10. GBM TMÇ'deki COX-2/PGE2 otokrin ve parakrin geri besleme döngüleri	24
Şekil 2.11. MTX-211 kimyasal yapısı.....	25
Şekil 2.12. EGFR ve PI3K'a bağlı MTX-211'in X-ışını kristal yapısı.....	26
Şekil 2.13. Diklofenak ve diklofenak dietilamin kimyasal yapısı.....	27
Şekil 2.14. Diklofenakın etki mekanizmaları.....	28
Şekil 4.1. Canlı hücreler tarafından resazurinin resorufine indirgenmesi..	35
Şekil 4.2. RTCA DP cihazı, elektrotların yerleştiği 3 plaka yuvası ve elektrotların tabanlarına yapışan hücre sayısına göre değişen empedans değeri arasındaki ilişki.....	38
Şekil 4.3. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) modeli ve CIM-16 kodlu plakanın parçaları.....	39
Şekil 5.1. THP-1 hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombin konsantrasyonlarının 24. saatte CellTiter-Blue testi ile hesaplanan % canlılık değerleri ve bu değerlerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	46
Şekil 5.2. THP-1 hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombin konsantrasyonlarının 48. saatte CellTiter-Blue testi ile	

	hesaplanan % canlılık değerleri, bu değerlerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	47
Şekil 5.3.	HUVEC hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombin konsantrasyonlarının 24. saatte CellTiter-Blue testi ile hesaplanan % canlılık değerleri ve bu değerlerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	48
Şekil 5.4.	HUVEC hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombin konsantrasyonlarının 48. saatte CellTiter-Blue testi ile hesaplanan % canlılık değerleri ve bu değerlerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	49
Şekil 5.5.	U87MG hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombin konsantrasyonlarının 24. saatte CellTiter-Blue testi ile hesaplanan % canlılık değerleri ve bu değerlerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	51
Şekil 5.6.	U87MG hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombin konsantrasyonlarının 48. saatte CellTiter-Blue testi ile hesaplanan % canlılık değerleri ve bu değerlerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	52
Şekil 5.7.	MTX-211 konsantrasyonlarının 48 saatlik U87MG hücre proliferasyon eğrileri	61
Şekil 5.8.	RTCA DP sisteminde U87MG hücrelerinde MTX-211'in 48. saatteki hücre indeks değerlerine göre IC50 değerinin hesaplandığı konsantrasyon-hücre indeksi eğrisi (IC50: 9.187 μ M).....	62
Şekil 5.9.	Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) ile MTX-211 bileşiğinin U87MG hücrelerinin migrasyonu üzerine etkilerinin zaman ve konsantrasyona bağlı değişim grafikleri.....	63
Şekil 5.10.	MTX-211 konsantrasyonlarının 48 saatlik U87MG ve THP-1 ko-kültür ortamında U87MG hücre proliferasyon eğrileri	64
Şekil 5.11.	U87MG hücrelerinde MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinlerinin apoptotik etkilerinin akış sitometride belirlenmesi.....	65

Şekil 5.12.	U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının toplam apoptotik hücre ölümü yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	66
Şekil 5.13.	U87MG hücrelerinde MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki ışık mikroskop görüntüsü.....	67
Şekil 5.14.	U87MG hücrelerinde MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının kaspaz-3 seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi.....	70
Şekil 5.15.	U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının % kaspaz-3 seviyelerindeki değişim yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	71
Şekil 5.16.	U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının IL-1β seviyelerine etkisi.....	73
Şekil 5.17.	U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının IL-1β pozitif hücre yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi..	74
Şekil 5.18.	U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının TNFα seviyelerine etkisi.....	75
Şekil 5.19.	U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının TNFα pozitif hücre yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi..	76
Şekil 5.20.	U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının IL-6 seviyelerine etkisi.....	78
Şekil 5.21.	U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının IL-6 pozitif hücre yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi..	79

Şekil 5.22.	U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının IL-8 seviyelerine etkisi.....	81
Şekil 5.23.	U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının IL-8 pozitif hücre yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi..	82
Şekil 5.24.	U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 µM) ve diklofenak dietilamin (100 µM) konsantrasyonları IL-10 seviyelerine etkisi.....	85
Şekil 5.25.	U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 µM) ve diklofenak dietilamin (100 µM) konsantrasyonları IL-10 pozitif hücre yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi..	86
Şekil 5.26.	MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının U87MG hücre migrasyonu üzerindeki etkilerinin 0., 24. ve 48. saat görüntüleri	89
Şekil 5.27.	MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının U87MG hücre migrasyonu üzerindeki etkilerinin 0., 24. ve 48. saatteki % çizik genişlikleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	90
Şekil 5.28.	MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının HUVEC hücre migrasyonu üzerindeki etkilerinin 0., 24. ve 48. saat görüntüleri.....	93
Şekil 5.29	MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının HUVEC hücre migrasyonu üzerindeki etkilerinin 0., 24. ve 48. saatteki % çizik genişlikleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	94

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ANOVA	: Varyans analizi
APC	: Antijen sunucu hücre
ASA	: Asetilsalisilik asit
ATCC	: American Type Culture Collection
ATRX	: Alfa talasemi X'e bağlı zihinsel gerilik sendromu
BRAF ^{MT}	: BRAF mutant
Cbl	: Casitas B-soylu lenfoma protoonkogen
CDI	: İlaç etkileşim katsayısı
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CI	: Hücre indeksi
COX-1/2	: Siklooksijenaz 1/2
DC	: Dendritik hücre
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ECM	: Ekstraselüler matriks
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT	: Epitelyal mezenkimal değişim
FBS	: Fötal sıgır serumu
FDA	: U.S. Food and Drug Administration
FGFR	: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü
FITC	: Floresein izotiyosiyanat
GATA4	: GATA-binding protein 4
GBM	: Glioblastoma multiforme
GH	: Büyüme hormonunun
HIF	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör
IC50	: Medyan inhibitör konsantrasyon
IDH	: İzositrat dehidrogenaz
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörleri

IL-10	: İnterlökin-10
IL-1 β	: İnterlökin-1 β
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
JAK	: Janus kinaz
KRAS ^{MT}	: KRAS mutant
LPS	: Lipopolisakkarit
MAPK	: Mitojenle aktive protein kinaz
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MEM	: Minimum essential medium
MGMT	: O6-metilguanin DNA metiltransferaz
MÖ	: Milattan önce
MS	: Milattan sonra
mTOR	: Rapamisinin memeli hedefi
n	: Tekrar sayısı
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NSAİ	: Nonsteroidal Antienflamatuar İlaçlar
p	: İstatistiksel anlamlılık
PBS	: Fosfat tamponlu salin solüsyonu
PG	: Prostaglandin
PI	: Propidyum iyodid
PI3K	: Fosfoinositid 3-kinaz
PKC	: Protein Kinaz C
PGE2	: Prostaglandin E2
PTEN	: Fosfataz ve tensin homolog
RTK	: Reseptör tirozin kinazlar
RF	: Radyofrekans
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RPM	: Dakikadaki dönme sayısı
RTCA DP	: Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi
SSS	: Santral sinir sistemi
STAT	: Sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü

TAM	: Tümör ilişkili makrofaj
TCA	: Trikarboksilik asit
TERT	: Telomeraz revers transkriptaz
TGF α	: Dönüřtürücü büyüme faktörü- α
TGF- β	: Dönüřtürücü büyüme faktörü- β
TM	: Tümör mikroçevresi
TNF α	: Tümör nekroz faktör α
TP53	: Tümör protein P53
TXA2	: Tromboksan A2
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WT1	: Wilms tümör geni

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, programlanmış hücre ölümünden kaçmayı, genom istikrarsızlığını ve mutasyonları teşvik etmeyi, proliferatif sinyalleme ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonları içeren kompleks bir hastalıktır (Sinkala, 2023). Tedavi edilmediği takdirde ölümle sonuçlanabilecek anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılması ile karakterizedir (American Cancer Society, 2023).

Glioblastoma multiforme (GBM), nöroglial kök veya progenitör hücreleri etkileyen genetik değişikliklerden kaynaklandığı düşünülen, her yaşta ortaya çıkabilen intrinsik bir beyin tümörüdür. 2005'ten bu yana cerrahi rezeksiyon ve ardından radyoterapi ve eş zamanlı idame temozolomid kemoterapisi bakım standardını tanımlamaktadır. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) antikoru bevacizumabın sağladığı uzun süreli progresyonsuz sağkalım dışında, hastalığın seyrini değiştirecek hiçbir farmakolojik ajan geliştirilememiştir. Glioblastomada spesifik olarak fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (AKT) /rapamisin'inin memeli hedefi (mTOR) veya epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) gibi hücresel yollar hedeflenmiş ancak telafi edici mekanizmalar, kısmen kan beyin bariyeri ile ilgili yetersiz hedef kapsamı, zayıf tolere edilebilirlik ve güvenlik nedeniyle başarısız olunmuştur (Rhuna vd., 2019).

GBM'nin kemoterapiye dirençli ve agresif olması ve hastaların ortalama yaşam süresinin kısa olması, yeni tedavi yöntemlerine ve tedavide kullanılacak yeni kemoterapötiklerin araştırılmasına yol açmıştır.

Bu tez çalışmasında, PI3Kinaz ve EGFR inhibitörü olan MTX-211 ve COX inhibitörü diklofenak dietilaminin tekli ve kombine uygulamaları ile U87MG, THP-1 ve HUVEC hücrelerinde sitotoksik etkilerinin belirlenmesi, MTX-211 ve diklofenak dietilamin kombinasyonlarının CDI hesaplamaları ile sinerjistik/antagonistik etkilerinin belirlenmesi, MTX-211'in U87MG glioblastoma hücrelerinde medyan inhibitör konsantrasyon (IC50) değerinin belirlenmesi, MTX-211'in migrasyon üzerindeki etkisinin belirlenmesi, MTX-211'in diklofenak dietilamin ile sinerjistik etki gözlemlediğimiz konsantrasyonların kombinasyonunun ko-kültür modellerinde antiproliferatif, apoptotik, antienflamatuar ve çizik deneyleri ile hücre migrasyonuna etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, tarihte ilk kez ‘tıbbın babası’ olarak da bilinen Yunan tıp doktoru Hipokrat (MÖ 460-370) tarafından ‘karkinos’ kelimesi ile tanımlanmış ve vücut yüzeyinde ortaya çıkan, büyüyen, ağrılı, kızarık şişkinliklere bu isim verilmeye başlanmıştır. ‘Karkinos’ Yunancada yengeç anlamına gelmektedir ve şişliklerin neden olduğu ağrı, yengeç ısırığında ortaya çıkan ağrıya benzetildiğinden ve ayrıca kanser şekil olarak yengece de benzetildiğinden dolayı kullanılmıştır. Hipokrat’tan sonra Romalı tıp doktoru olan Celsus (MÖ 28-50) ‘karkinos’ yerine Latinceye yengeç anlamına gelen ‘cancer’ i ve daha sonra Romalı tıp doktoru olan Galen (MS 130-200) de Yunancada şişlik anlamına gelen ‘oncos’ kelimesini kullanmaya başlamıştır. Günümüzde kanser bilimine verilen ‘onkoloji’ ismi Yunancada şişlik anlamına gelen ‘oncos’ kelimesinin kökenine dayanmaktadır (Baran ve Kiraz, 2018).

Günümüze kadar yapılan bilimsel araştırmalar ışığında, kanserin temel olarak DNA’da meydana gelen değişikliklerden (mutasyon) kaynaklandığı ortaya konmuştur. Çeşitli nedenlerle oluşan bu mutasyonlar ile kanser hücreleri, normal hücrelerden farklı olarak (Hanahan ve Weinberg, 2000) büyüme faktörlerine ihtiyaç duymadan büyüebilme, sınırsız bölünme potansiyeli ve ölümsüzlük, apoptotik sinyallerden kaçma, büyümeyi baskılayan sinyallerden kaçma, anjiyogenez, invazyon ve metastaz, bağışıklık sisteminden kaçma, kanserleşmeyi destekleyen inflamasyon, genetik mutasyonlar ve enerji metabolizmasını değiştirme özelliklerine sahiptir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Kansere başlıca DNA mutasyonları neden olmaktadır. Normalde sağlıklı hücrelerde de mutasyonlar meydana gelmekte ancak DNA tamir mekanizmaları tarafından düzeltilmektedir (Stratton vd., 2009). Hücre döngüsünde yer alan farklı kontrol noktaları ile DNA hasarının varlığı kontrol edilmekte ve hasarın yavru hücrelere geçişi engellenmektedir. Hücre döngüsünde bu regülasyonu sağlayan anahtar proteinler siklinler ve siklin bağımlı kinazlardır (CDK). Siklin ve siklin bağımlı kinazlarda meydana gelen bir mutasyon, kontrol noktalarında tutulması gereken mutant hücrelerin hücre döngüsünü bitirmesine ve sonuç olarak aynı mutasyonu taşıyan 2 yeni hücre oluşmasına neden olmaktadır (Park ve Lee, 2003). Tümör baskılayıcı bir protein olan

p53 proteini de mutant hücreyi kontrol noktalarında tutmakta ve hücrenin apoptoz mekanizmalarında görev almaktadır. P53 gen mutasyonu da tümör baskılama aktivitesinde düşüş meydana getirmekte, mutant hücrenin hayatta kalma ve büyüme potansiyelinde artışa neden olmaktadır (Rivlin vd., 2011).

Diyet, alkol, enfeksiyonlar, iyonize radyasyon, kronik inflamasyona neden olan diyet bileşenleri ve obezite, arsenik gibi ağır metaller, kontraseptifler ve diğer hormonların kullanılması ile hormon regülasyonundaki değişimin de karsinogenezde rol oynayan çevresel faktörler olduğu belirlenmiştir (Burrell vd., 2013; Rappaport, 2012; Yadav ve Lowenfels, 2013).

Kanser metabolizmasının kökeni, normal dokularla karşılaştırıldığında, kanser dokusunun oksijen varlığında bile laktat üretmek için bol miktarda glikoz kullandığını gözlemleyen (Warburg Etkisi) ve farklılaşmış bir hücrenin proliferatif bir kanser hücresine dönüşmesi için bir ön koşulun "solunum hasarı" olduğunu tahmin eden (Warburg, 1956), mitokondriyal solunum zinciri kompleksi IV'ü keşfeden ve 1931 yılında Nobel Tıp veya Fizyoloji Ödülünü alan Otto Warburg tarafından yapılan gözlemlere dayanmaktadır (Koppenol vd., 2011).

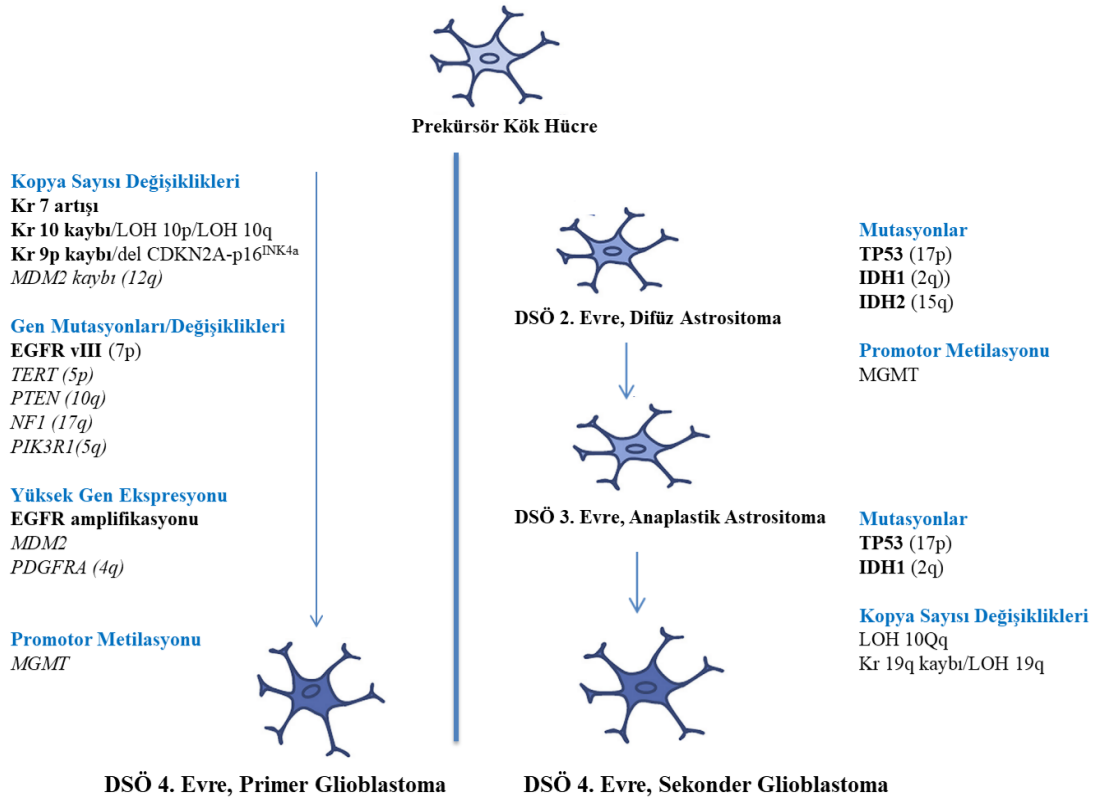
Tümör hücreleri, disfonksiyonel vaskülarite ve yüksek besin tüketim oranlarına bağlı olarak tümör mikroçevresinde besin ve oksijen miktarı az olan, metabolik plastisite ile metabolik yolları tekrar yapılandırarak, alternatif besinler kullanarak ve diğer hücreler ile etkileşime girerek bu stres ortamını yöneten ve hayatta kalıp çoğalmaya devam eden hücrelerdir (Ada vd., 2021).

Kanser hücrelerinin çoğunun, tümör büyümesi için gerekli metabolitleri sağlamak üzere trikarboksilik asit (TCA) döngüsünü kullandığı (Cardaci, 2015), piruvattan TCA döngüsü metaboliti olan oksaloasetatı üreten piruvat karboksilazın birincil ve metastatik tümör büyümesi için gerekli olduğu (Sellers, 2015; Christen, 2016; Davidson, 2016), hem kanserli fare modellerinde hem de kanserli hastalarda tümör büyümesini destekleyen önemli bir anabolik merkez olduğu (Krall, 2021; Martinez-Reyes, 2020; Ghergurovich, 2021) ve sonuç olarak günümüzde hem glikoliz hem de TCA döngüsünün, metabolit biyosentezi yoluyla tümör büyümesini desteklediği tespit edilmiştir (DeBerardinis ve Chandel, 2020; Ghergurovich, 2021).

2.2. Glioblastoma Multiforme (GBM)

İlk olarak 1865 yılında Alman patolog Rudolf Virchow tarafından keşfedilen glioblastoma (DeAngelis vd., 2011) en sık görülen, son derece hızlı seyreden, ölüme neden olan, klinik ve cerrahideki ilerlemelere rağmen prognozları kötü olmaya devam eden (Ohgaki vd., 2004), astrositik glial hücrelerden kaynaklanan (Perry ve Wesseling, 2016) beyin tümörüdür.

Primer ve sekonder glioblastoma olmak üzere 2 farklı şekli vardır (Şekil 2.1). Primer glioblastomalar, kısa bir klinik öyküden hemen sonra, öncü lezyon olmaksızın hızlı bir şekilde ve tipik olarak yaşlı hastalarda ortaya çıkarken, sekonder glioblastomalar, daha yavaş bir şekilde düşük dereceli (DSÖ evre II) veya anaplastik astrositomdan (DSÖ evre III) ilerleme ile orta yaşlı hastalarda gelişmektedir (Ohgaki vd., 2004; Filippini vd., 2008).

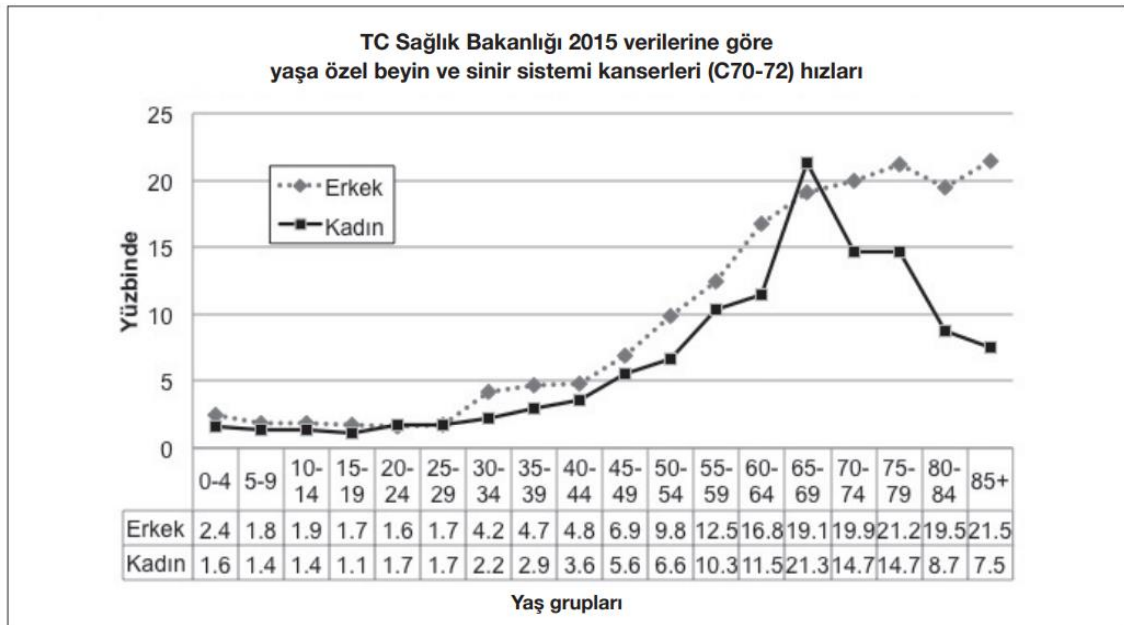


Şekil 2.1: Primer ve sekonder GBM'nin en sık görülen ve ilgili moleküler anormallikleri (Crespo vd., 2015)

GBM özellikle ileri yaşlarda teşhis edilmekte ve çocuklarda çok nadir görülmektedir (Ostrom vd., 2013). Ortalama sağkalımı 6-9 ay olan yüksek dereceli gliomalı genç hastalar iyi prognozlu olarak sınıflandırılırken, ortalama sağkalımı 12-24 ay olan yaşlı ve daha düşük performanslı hastalar kötü prognozlu hastalar olarak sınıflandırılmaktadır (Gupta ve Sarin, 2002).

Hansen ve ark. GBM'li hastaların %83'ünün 50 yaş üzeri (Hansen vd., 2018), Cheo ve ark. ile Gosh ve ark. hastaların yaygın olarak 60'lı yaşlarda olduğunu (Cheo vd., 2017; Ghosh vd., 2017), Li ve arkadaşları hastaların %47.9'unun 65 yaş üzeri olduğunu, hastalığın özellikle 70'li yaşlarda pik yaptığını ve 80 yaş sonrasında düşüş yaşandığını bildirmişlerdir (Li vd., 2018).

Dünyada GBM görülme sıklığının en yüksek olduğu ülke ABD'dir. Bu sıklığın 100.000 nüfusta 3.2 olduğu tahmin edilmekte ve özellikle yaşlı hastalarda (75 ile 84 yaş hastalarda) 100.000 nüfusta 15.24 ile en yüksek insidansa ulaşmaktadır (Ostrom vd., 2015). GBM, Avrupalı Amerikalılarda, Afrikalı Amerikalılara göre 2.5 kat daha yüksek oranda görülmekte ve GBM'nin özellikle beyaz ırkta siyah ırka oranla daha yaygın olduğu bildirilmektedir (Thakkar vd., 2014; Song vd., 2009).



Şekil 2.2: TC sağlık bakanlığı 2015 verilerine göre yaşı özel beyin ve sinir sistemi kanserleri (C70-72) hızları

TC Sağlık Bakanlığı 2015 verilerine göre (Şekil 2.2) GBM görülme sıklığı her iki cinsten de genç erişkinlikte artmaya başlar. Kadınlarda 65 yaşta pik yapıp daha ileri yaşlarda azalırken, erkeklerde yaşa bağlı olarak sürekli artmaktadır. Erkeklerde görülme sıklığı kadınlara oranlara daha yüksektir (Özduman vd., 2019).

Tüm merkezi sinir sistemi tümörlerinin %14.5'ini, malign merkezi sinir sistemi tümörlerinin %48.6'sını oluşturan en agresif malignitelerden biri olan GBM'li hastalarda (Grochans vd., 2022) tümör en yaygın olarak supratentoryal bölgede (frontal, temporal parietal ve oksipital loblarda) gözlemlenmekte, (Chakrabarti vd., 2005) omurilik ve beyincikte nadiren görülmektedir (Engelhard vd., 2010; Adams vd., 2013).

2.3. Glioblastoma Epidemiyolojisi

Merkezi sinir sisteminin primer malign bir tümörü olan GBM'nin görülme sıklığı diğer merkezi sinir sistemi tümörlerine oranla (her 100.000 kişi de 4.40 (Gittleman vd., 2018) son derece yüksektir. Farklı ülkelerde yapılan çalışma sonuçları ile elde edilen veriler ABD'de her 100.000 kişi de 3.20 (Ostrom vd., 2017), Kanada'da 4.06 (Walker vd., 2019), Fransa'da 4.17 (Fabbro-Peray vd., 2019) ve İngiltere'de 4.64 (Brodelt vd., 2015) ile GBM insidansının düşük olduğunu göstermektedir.

İnsan organizmasının işleyişi üzerinde önemli bir etkiye sahip olan cinsiyet, çeşitli hastalıklara karşı duyarlı veya dirençli olmaya neden olabilmektedir. Örneğin kadın cinsiyet osteoporoz ve kardiyovasküler hastalıklar için bir risk faktörü iken, yapılan çalışmalar GBM prevalansının erkeklerde yüksek olduğunu göstermektedir (Siminska vd., 2021).

Mevcut çalışmalar beden kitle indeksi ve obezitenin GBM hastalarında morbidite veya mortalite riskini etkilemediğini, dolayısıyla GBM ile herhangi bir korelasyonunun olmadığını göstermektedir (Helseth vd., 1989; Jones vd., 2010; Wiedmann vd., 2017). Ancak küçük yaşlarda beden kitle indeksinin yüksek olması (>30) ileri yaşlarda GBM görülme sıklığını artırmaktadır (Moore vd., 2009; Little vd., 2013).

GBM için bir başka risk faktörü ise boyun uzamasından sorumlu genlerin, sinyal yollarının ve ilgili hormonların, özellikle insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF) ve büyüme hormonunun (GH) kanser gelişimine olan katkısından dolayı uzun boylu olmaktır (Tripaldi vd., 2013; Perry vd., 2013; Watts vd., 2019; Boguszewski vd., 2019).

Yapılan alışmalar erkekler ve kadınlarda uzun boylu olmanın GBM riskini artırdığını (Helseth vd., 1989, Wiedmann vd., 2017, Cote vd., 2018) ancak erkeklerde bu riskin daha yüksek olduğunu göstermektedir (Jones vd., 2010).

2.4. Glioblastoma Etiyolojisi

2.4.1. Çevresel faktörler

Gliomların oluşumu konusunda en iyi bilinen çevresel faktör iyonize radyasyondur. Düşük ve yüksek doz radyasyon ve radyasyona maruziyet yaşının küçüklüğü GBM riskini artırmaktadır (Inskip vd., 2016). İyonize radyasyon DNA hasarı oluşturan bir etkidir ve GBM gelişiminde DNA tamir mekanizmalarındaki eksikliklerin önemli bir rolü olduğu tespit edilmiştir (Ulgen vd., 2019). İyonize radyasyonun yanı sıra analog, kablosuz, cep telefonu ve WİFİ kullanımı gibi radyofrekans (RF) radyasyonun da GBM riskini artırdığı (Carlberg ve Hardell, 2017; Vocht, 2016) ve bu riskin erken yaşta ve uzun süreli telefon kullanımı, uzun RF radyasyona maruz kalma süresi ile paralel olarak arttığı gösterilmiştir (Carlberg ve Hardell, 2017).

2.4.2. Alerji hikayesi

Atopik bünye ve solunum yolu alerjileri, astım ve egzamalar gibi alerji hikayesinin henüz bilinmeyen bir mekanizma ile GBM riskini azalttığına dair epidemiyolojik kanıtlar mevcuttur (Amirian vd., 2016).

2.4.3. Ailesel kalıtım

Kanserin genetik bir hastalık olduğu yüz yıldan uzun bir süredir bilinmekte olup (Boveri, 1914) kalıtılabileceğı fikri ilk defa Broca tarafından dile getirilmiştir (Broca, 1866). Bir tümörde gözlenen genetik bozukluklar ailesel olarak “kalıtılmış” (germline) ya da sonradan “kazanılmış” (somatik) olabilir (Broca, 1866). Ailesel genetik yatkınlığın GBM oluşumunda da büyük etkisi olduğu bilinmektedir (Rice, 2016).

Diğer önemli kalıtım şekli insanda birçok hastalığa yatkınlığı, hastalık gidişatını ve ilaçlara olan yanıtları belirleyen poligenik kalıttır. Gelişmiş moleküler genetik yöntemler kullanılarak tüm genomu kapsayan genetik asosiyasyon çalışmaları ile farklı genetik bölgedeki polimorfizmlerin gliom yatkınlığı konusunda insanlar arasında belirgin farklar oluşturduğu gösterilmiştir (Melin vd., 2017; Wrensch vd., 2009).

2.5. Glioblastomada Genetik Patogenez

Farklı yaşlarda ve farklı genetik yollar ile gelişen primer ve sekonder glioblastoma, EGFR, PTEN, TP53, IDH 1/2, 10q heterozigotluk kaybı, ATRX, TERT mutasyonları gibi genetik değişiklikler ile karakterizedir.

ATRX (Alfa talasemi X'e bağlı zihinsel gerilik sendromu), Xq21.1'de bulunan gen tarafından kodlanmakta ve histon varyantı H3.3'ün telomerik kromatine dahil edilmesini düzenleyerek normal telomer homeostazını sağlamaktadır. Kromatin remodelingde, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve histon proteinlerle etkileşerek genomik stabiliteyi korumak gibi önemli fonksiyonları olan ATRX, GBM'de inaktivedir. ATRX inaktivasyonuna mutasyonlar, delesyonlar, gen füzyonları neden olabilmekte, mutasyonlar özellikle astrositik tümörlerde sık görülmektedir. Sıklıkla yetişkin diffüz gliomalarda görülen ATRX değişiklikleri, sekonder GBM'lerin %80'inde ve primer GBM'lerin %7'sinde ve ayrıca IDH1/2 ve TP53 mutasyonları taşıyan astrositik tümörlerde görülmektedir (Nandakumar vd., 2017; Liu vd., 2012; Jiao vd., 2012; Schwartzenuber vd., 2012).

Telomerlerin korunmasına yol açarak tümörlerin yaşlanmasını önleyen telomeraz aktivitesi neredeyse bütün kanser türlerinde artmıştır ve telomeraz aktivitesinin artmasına neden olan TERT (Telomeraz revers transkriptaz) promotor mutasyonları, belli kanser türleri, özellikle de GBM ile önemli ölçüde ilişkilidir (Vinagre vd., 2013; Labussiere vd., 2014).

Replikasyon sırasında DNA zincirine 3'ucundan nükleotit eklemekten sorumlu bir enzim olan telomeraz, TERT geni tarafından kodlanmaktadır. TERT gen promotor mutasyonu, vakaların neredeyse %80'inde görülmekte ve en yaygın görülen mutasyonu sırasıyla 124 ve 146 baz çiftlerinde bulunan ve bu promotörü kodlayan C228T ve C250T'dir. Bu mutasyonlar telomeraz aktivitesini artırmakta, telomer uzamasına neden olmakta ve TERT ifadesinde dört kata kadar bir artışa neden olmaktadır (Killela vd., 2013; Vinagre vd., 2014; Nakahara vd., 2004).

Astrositomlarda yapılan genetik analizler, kromozomda tümör baskılayıcı gen olan TP53 (Tümör protein p53)'ü içeren 17p delesyonlarının veya GBM'nin %45'inde TP53 nokta mutasyonlarının olduğunu göstermiştir (Chung vd., 1991). Glioblastomalar sıklıkla TP53 mutasyonu ile ilişkilidir ve kötü prognoz, kemoradyoterapiye verilen kötü

yanıt, tedavi sırasında hastalığın ilerlemesi ve hastanın hayatta kalma süresi ile yakından ilişkilidir. TP53, yaşlanma, DNA onarımı, apoptoz ve hücre döngüsü dahil birçok hücreyel yanıtta yer alan transkripsiyonel hedef genleri düzenleyen, mutasyona uğramış veya hasar görmüş hücreleri seçici olarak ortadan kaldıran, kanser hücrelerinin çoğalmasını azaltan ve normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümünü engelleyen tümör baskılayıcı gendir (Lee vd., 2020).

Serin/treonin kinaz ailesinin bir üyesi olan B-Raf proteininin üretiminden sorumlu bir gen olan BRAF, hücre proliferasyonu, hücrenin hayatta kalması ve farklılaşmasında rolü olan mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) hücre sinyal yolağında rol oynayarak ERK yolağını aktive eden, en yaygın V600E mutasyonu ile kanserde sık görülen, sinyal kaskadı hiperaktivasyonuna ve kontrolsüz hücre bölünmesine ve ayrıca negatif geri besleme mekanizmalarına karşı duyarsızlığa neden olarak tümör oluşumuna neden olan kinazdır.

Santral sinir sistemi (SSS) tümörlerine sıklıkla neden olan BRAF V600E mutasyonu, pleomorfik ksantoastrositoma, ganglioglioma ve pilositik astrositom gibi bazı beyin tümörlerinde sıklıkla görülürken, epitelioid ve dev hücreli glioblastomada nadiren ortaya çıkmaktadır. Prevalansı GBM'de %69'dur ve pediatrik hastalarda (%7) yetişkin hastalara (%4) oranla daha sık görülmektedir (Andrews vd., 2021; Takahashi vd., 2015).

GATA4 (GATA-binding protein 4), GATA6 ailesinin bir üyesi olan, insan emrionik ve yetişkin nöron ve glialarında bulunan, tümör oluşumunu baskılayan, hücre proliferasyonu ve apoptozu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür (Vaitkiene vd., 2013). GBM'li hastaların yaklaşık %60'ında GATA4 ekspresyonu kaybolmakta, yokluğu GBM'de proliferasyonu artırıp, kemoterapi ve radyoterapiye direnç gelişmesine neden olmaktadır (Agnihotri vd., 2009; Agnihotri vd., 2011).

FGFR1 (Fibroblast büyüme faktörü reseptörü-1), tirozin kinaz işlevine sahip bir transmembran reseptör grubudur. GBM'de FGFR1 ekspresyon düzeyi yüksektir ve bu durum invazyon, progresyon, terapilere direnç ve kötü prognozla ilişkilidir. FGFR1 susturulmuş glioma hücrelerinin radyoterapiden sonra hayatta kalma süreleri kısalmakta, migrasyonları azalmakta, radyoterapiye olan duyarlılığı artmaktadır (Anderson vd., 2018; Gouaz vd., 2016; Kowalski-Chauvel vd., 2019).

Astrositik tümörlerin en malign olan GBM'nin karakteristik özelliği, neovaskülarizasyon için gerekli bir olay olan endotel hücre proliferasyonudur ve GBM'yi karakterize eden yüksek derecede vaskülarite ve invazivlik, anjiyojenik büyüme faktörlerinin veya büyüme faktörü reseptörlerinin anormal ekspresyonu ile ilgilidir. FGFR1, GBM'de aşırı eksprese edilmekte ve astrositik tümör davranışlarında kritik bir rol oynamaktadır (Morrison vd., 1994). Gliomada yalnızca FGFR1 mutasyonları veya overekspresyonu değil aynı zamanda gliomanın patogenezinde önemli rol oynayan FGFR1'in tirozin kinazları ve de FGFR1 ailesine bağlanan FGF reseptör ailesinin üyelerinde de değişiklikler görülmektedir. Astrositik tümörlerin yaklaşık %10'unda tirozin kinazları etkileyen FGFR1 nokta mutasyonları bildirilmiştir (Venneti ve Huse, 2015).

Guaninin O6 bölgesindeki metili sistein kalıntılarına aktararak hasarlı guanin nükleotitlerini onaran, O6-metilguanin-DNA metiltransferaz olarak bilinen MGMT (O6-metilguanin DNA metiltransferaz), alkilleyici ajanlara direnç gelişmesinde önemli rol oynayan bir DNA onarım enzimidir. Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler ışığında, kemoterapinin gliomalarda MGMT ekspresyonunu artırdığı, özellikle MGMT'nin overekspresyonunun GBM için gelecek vaat eden bir alkilleyici olan temozolamid vb ajanlar için hızla direnç gelişmesine neden olduğu, DNA metilasyonu transkripsiyonu inhibe edebildiğinden MGMT promotörünün metilasyonu alkilleyici ajanlara duyarlılığı artırdığı sonucuna varılmıştır (Yu vd., 2020).

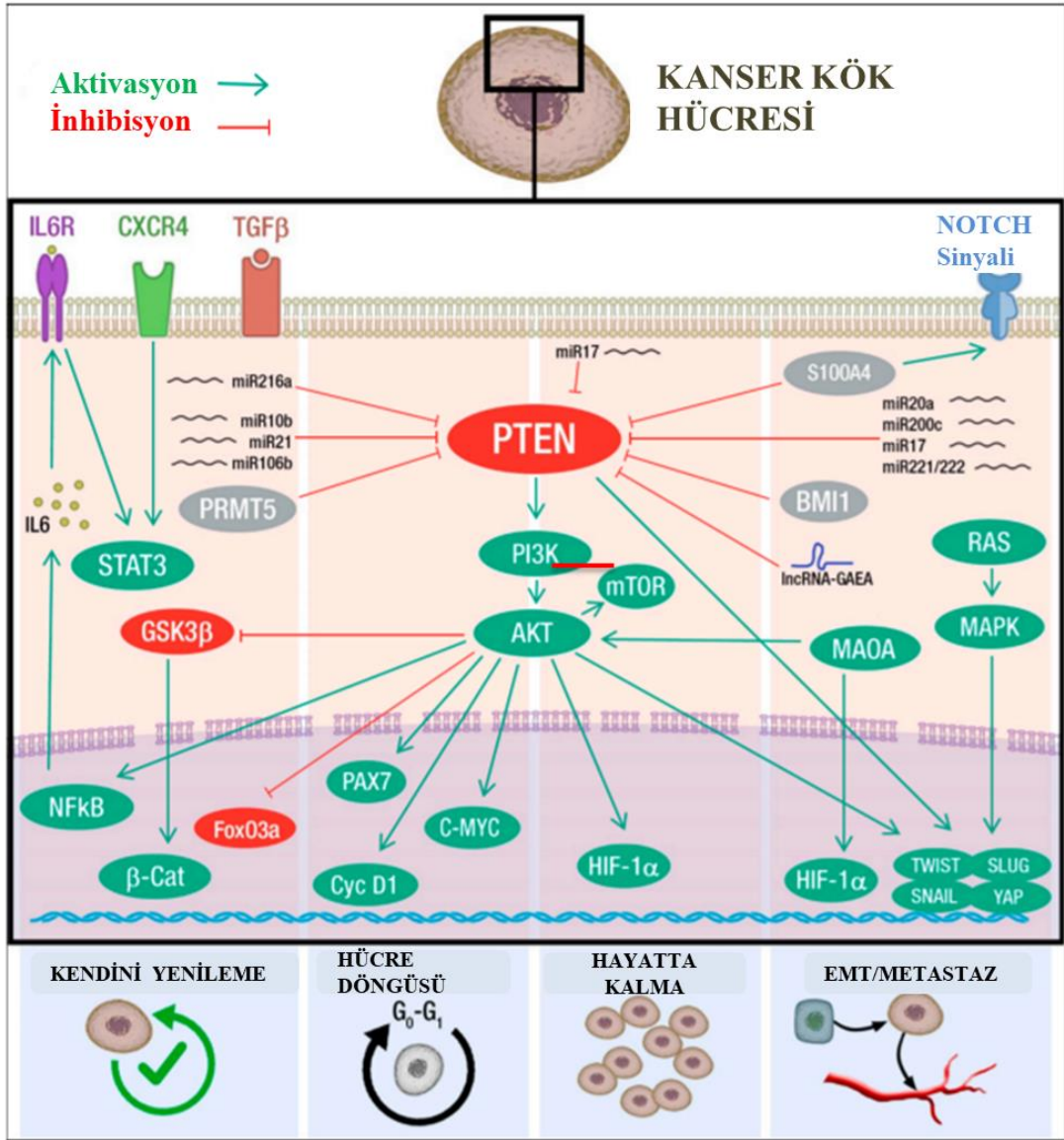
Çocukluk çağı böbrek tümörü olan 'Wilms tümör'ünden sorumlu gen olarak tanımlanan Wilms tümör geni (WT1), ilkin bir tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmış daha sonra çeşitli hematolojik malignitelerde, katı tümörlerde ve özellikle GBM'nin %94'ünde aşırı eksprese edildiği ve gliomagenizde önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. Son zamanlarda, WT1 proteini, bazı tümörlerde özellikle de son derece yüksek oranda eksprese edildiği GBM'de kanser immünoterapisinin yeni bir moleküler hedefi olarak kabul edilmektedir (Nakahara vd., 2004).

İzositratt dehidrogenaz (IDH) 1/2 enzimleri temelde sitoplazmada bulunan, izositrat 2-ketoglutarat dönüşümüne neden olan, hücrede yağ yıkımı yoluyla enerji üretimine neden olan NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) molekülü açığa çıkaran ve hücreyi reaktif oksijen türlerinden (ROS) koruyan enzimlerdir. Yapılan araştırmalarda evre 2-3 ve sekonder GBM'nin yaklaşık %80'inde IDH1 mutasyonlarına

rastlanmakta, IDH2 mutasyonları IDH1'e oranla daha az görülmekte ve genellikle IDH1 mutasyonlarına eşlik etmektedir. Mutasyon sonucu enzim işlevsiz hale gelmekte, hücrede α -ketoglutarat ve NADPH'da azalma görülmektedir. Böylece hücrede ROS biriktiğinden dolayı gerekli hücresel aktiviteler aksamaktadır. IDH genlerinde görülen mutasyonlar hücre proliferasyonuna ve koloni oluşumuna neden olan driver (başlatıcı) mutasyonlardır. Mutant enzimler α -ketoglutaratı bir onkometabolit olan 2-hidroksiglutarata çevirmekte aynı zamanda hipermetilasyon yoluyla epigenetik değişikliklere neden olarak bazı genlerin susturulmasına da neden olmaktadır (Bayram, 2022).

PTEN (Fosfataz ve tensin homolog), kromozomun 10q23 bölgesinde yer alan, tümör baskılayıcı özelliklerinin çoğu lipid fosfataz özelliklerinden kaynaklanan protein fosfataz ve lipid fosfataz işlevlerine sahip proteindir (Akdeniz vd., 2018). PTEN fosfataz aktivitesinin kanserdeki en önemli hedefi, tümör oluşumunda öneli rol oynayan hücre büyümesi ve kanser hücresinin hayatta kalmasını sağlayan PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağıdır (Luongo vd., 2019).

Tümör oluşumunda rol oynayan protein kinaz sinyalleme kaskadlarını negatif olarak düzenleyerek tümör baskılayıcı etki yaratan bir gen olan PTEN'deki heterozigotluk kaybı veya metilasyon mutasyonu gibi genetik değişiklikler, PTEN fonksiyon kaybına neden olmaktadır. Fonksiyonel PTEN kaybı önemli bir onkogenik sinyal yolağı olan PI3K/AKT/mTOR sinyal yollarının serbestleştirilmesine ve bunun doğal bir sonucu olarak hücre sağkalımı, hücre büyümesi ve çoğalmasının düzenlenmesinin bozulmasına neden olmaktadır (Şekil 2.3). PTEN fonksiyon kaybı glioblastoma vakalarının en az %60'ında görülmektedir. Tümör baskılayıcı bir gen olan PTEN'deki mutasyonlar ile gelişen inaktivasyon, düşük dereceli tümörlerde nadiren görülmesi tümörü başlatıcı bir etken olmadığını, hastalığın ileri evrelerinde çok yüksek düzeyde görülmesi tümörün ilerlemesine neden olan önemli bir etken olduğunu göstermektedir (Koul, 2008; Knobbe vd., 2002; Hopkins vd., 2014).



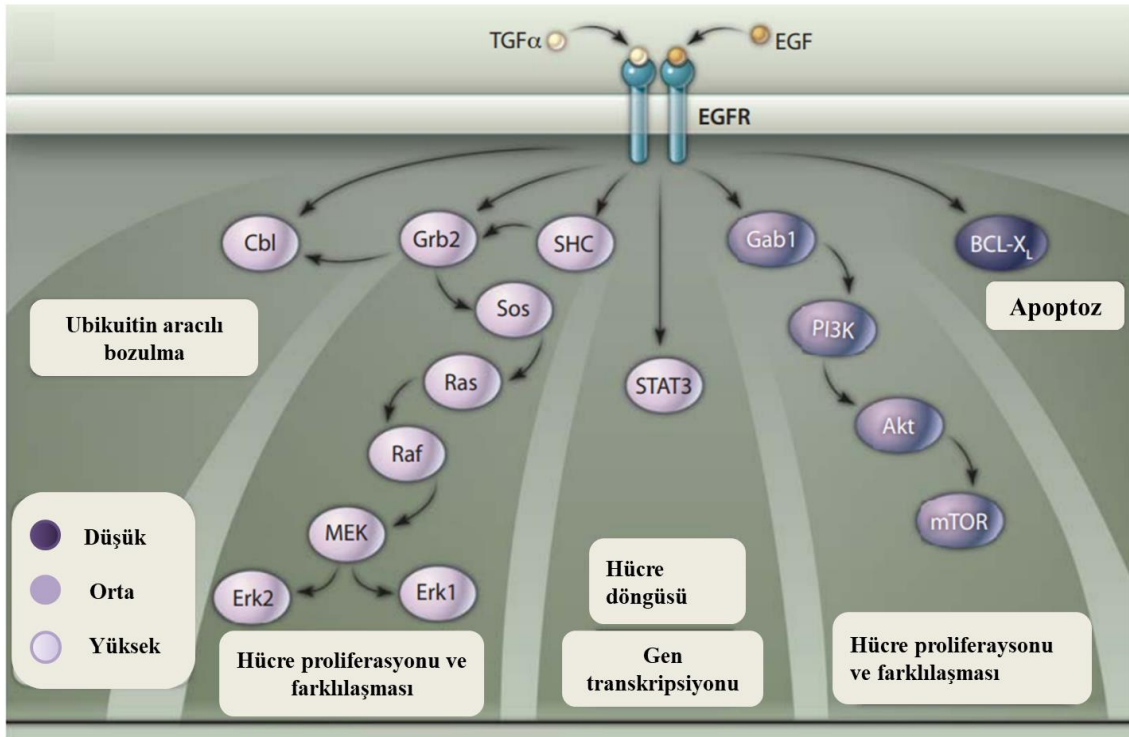
Şekil 2.3: Kanser kök hücrelerinin PTEN aracılı mekanizmaları (Luongo vd., 2019)

Primer glioblastomaların gelişmesinde en önemli sinyal ileti yolu EGFR/PTEN/AKT/mTOR'dur.

2.5.1. EGFR (Epidermal büyüme faktörü reseptörü)

Erb ailesinin bir üyesi olan, Erb1 ve HER1 olarak da bilinen EGFR, ekstraselüler domain ve sitoplazmik tirozin kinaz bölgelerinden oluşan transmembran tirozin kinaz reseptörüdür. ErbB/EGFR ailesinin üyeleri bir ligand tarafından uyarıldığında hücre büyümesi ve bölünmesi, migrasyon, adezyon, farklılaşma ve apoptoz gibi çeşitli hücresel süreçlerin gerçekleşmesine aracılık etmektedir. 1980'de avian eritroblastosis tumour virüs'te anormal kodlandığı tespit edilmiş ve kanserle ilk defa ilişkilendirilmiştir (Yarden vd., 2001).

EGFR'ye spesifik olarak EGF, TGF α ve Amfiregulin ligandları bağlanır (Hynes ve Lane, 2005) ve çok sayıda hücrel yanıtı düzenleyen PI3K, MAPK, STAT3 kaskadlarının aktivasyonuna yol açar (Şekil 2.4) (Hynes ve Lane, 2005). Ligand bağlanması reseptör aktivasyonu ve otofosforilasyon, hücrel proteinlerin fosforilasyonu ve protein-protein ağlarının oluşması gibi hücre içi bir dizi biyokimyasal olayları başlatır. Bunun yanı sıra aktive reseptör, dimerizasyon ve otofosforilasyona uğrayarak Cbl (Casitas B-soylu lenfoma protoonkogen)'i de aktive eder. Cbl aktivasyonu reseptör endositozunu destekleyerek negatif mekanizmaları aktive eder (Dikic, 2003).

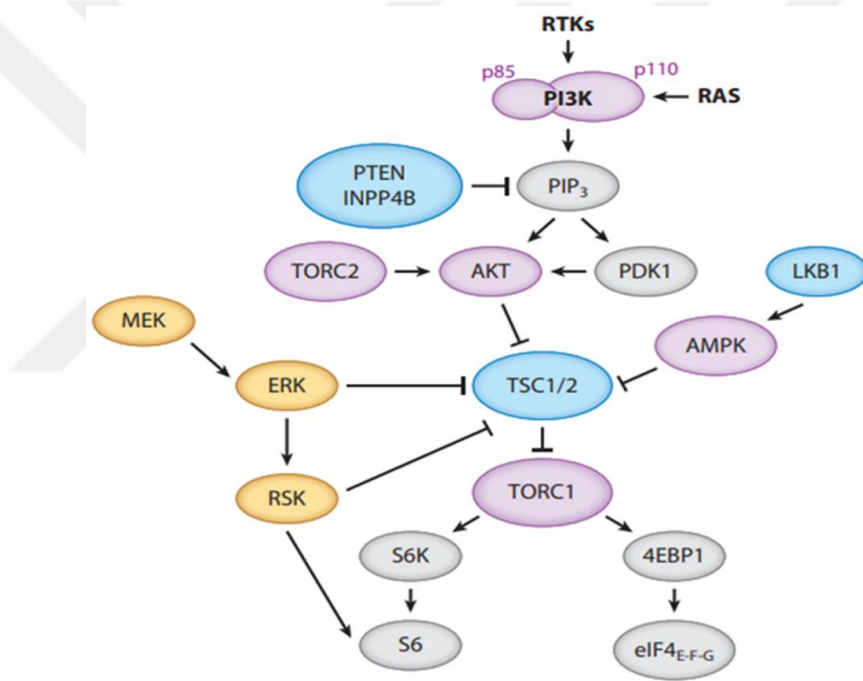


Şekil 2.4: EGFR'nin hücre içi sinyal ileti yolları ve etkileri (Huang vd., 2009)

EGFR aktivasyonu ve otofosforilasyonu, hücre içinde RAS/RAF/MEK/ERK yolağı, PI3K/AKT yolağı, JAK/STAT yolağı ve PKC yolağını aktive ederek hücre proliferasyonu ve farklılaşması gibi çeşitli hücrel süreçlerin başlamasında ve düzenlenmesinde merkezi bir rol oynamaktadır (An vd., 2018).

PI3K, p85 düzenleyici ve p110 katalitik alt birimlerden oluşan heterodimerdir. Reseptör aktive edildiğinde p85 alt birim reseptöre bağlanarak p110'u inhibe edici

etkisini azaltır ve p110 alt birim fosfatidilinositol 4,5-bifosfatı (PIP2) fosforile ederek fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfatı (PIP3) oluşturur (Şekil 2.5). p110 aynı zamanda bir Ras-bağlama alanı içerir ve bu bölüm RAS tarafından aktivasyona da aracılık eder. PTEN ve INPP4B, PI3K'ın negatif düzenleyicileridir ve PIP3'ü defosforile ederek PI3K sinyal çıkışını inhibe eder. AKT, SGK ve PDK1 gibi çeşitli plekstrin homoloji (PH) alanı içeren proteinler, plazma zarında PIP3'e bağlanır. PDK1, AKT'ı T308 de mTORC2 kompleksini de S473'de fosforile ederek aktive etmektedir. AKT, GSK3 α , GSK3 β , FoxO transkripsiyon faktörlerini ve MDM2, BAD ve p27KIP1 i fosforile ederek hücrenin hayatta kalmasını sağlar ve hücre döngüsüne girişi kolaylaştırır (Mayer ve Arteaga, 2016).

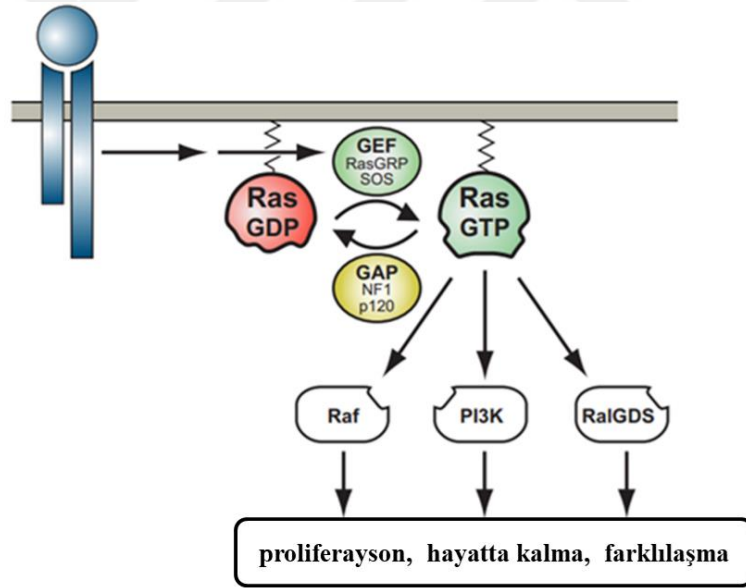


Şekil 2.5: Reseptör tirozin kinazlarının Ras aracılı etkileri

AKT, tuberini fosforile ederek inaktivasyonuna neden olur ve bu da mTORC1 birikmesine ve aktivasyonuna neden olmaktadır. Sonuç olarak protein sentezi, RNA translasyonu, hücre büyümesi ve otofaji düzenlenmiş olur. AKT ayrıca glikoz taşıyıcılarının ekspresyonunu ve membran lokalizasyonunu kolaylaştırarak metabolizmayı da teşvik etmektedir (Rathmell vd., 2003).

Reseptör ligandla aktive edildiğinde, Shc, Grb2, Gab2 ve SHP-2 gibi moleküller büyüme faktörü reseptörlerine alınır ve Ras guanin nükleotid değişim faktörlerini aktive eder. Guanin nükleotitlerinin Ras'tan ayrışmasını katalize eden GEF molekülleri (SOS1 ve SOS2, RasGRFS1 ve RasGRFS2 ve RasGRP1 ile RasGRP4), GDP yi GTP ye çevirerek Ras-GTP seviyelerini yükseltmektedir. Ras extraselüler stimulusları intraselüler sinyallere çevirmekte ve aktivitesi GTP hidrolizi (Ras negatif düzenleyicileri; Nörofibromin1; NF1 ve p120 RasGAP) ile sonlanmaktadır (Ward vd., 2012).

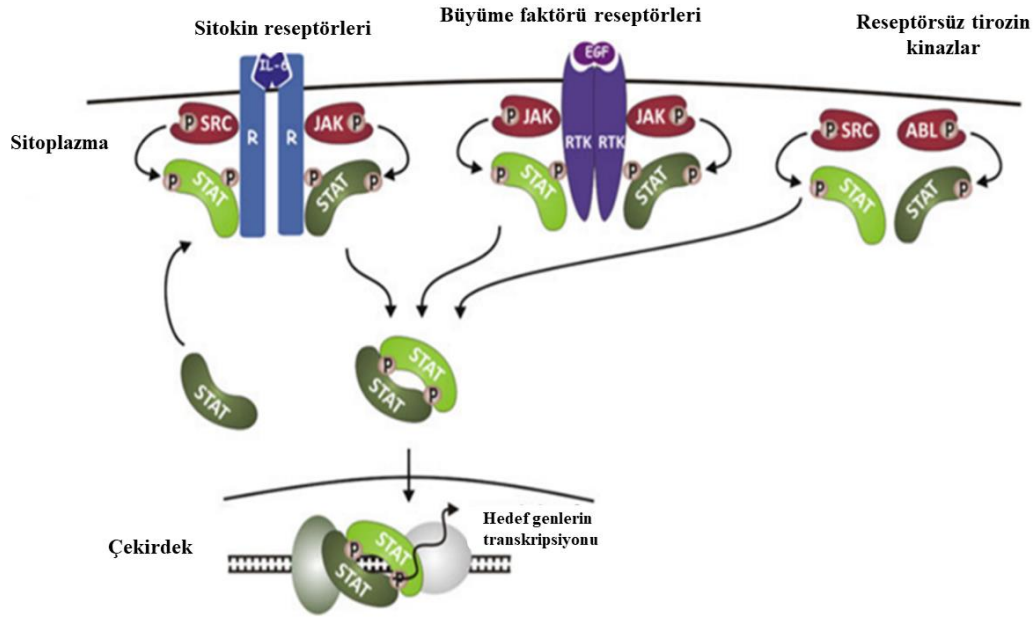
Ras-GTP Raf kinaz-1'i alarak Raf'ı aktive eder. Raf-1 öncelikle tirozin treonin kinaz olan MAPK (Erk kinaz)'ı VE MAPK'da Erk1 ve Erk2'yi fosforile etmektedir. Ras ile aktive edilen sadece MAPK-Erk yolağı değil ayrıca PI3K ve RalGDS yolakları da Ras ile aktive edilmektedir (Şekil 2.6). Böylece hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hücrenin hayatta kalma süresi gibi önemli fonksiyonlar düzenlenmektedir (Fehrenbacher vd., 2009).



Şekil 2.6: Ras aracılı hücre içi etkiler

STAT (sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktivatörleri), büyüme faktörü reseptör sinyallerinin hücre içindeki efektörleri ve sitoplazmik transkripsiyon faktörleridir. JAK/STAT sinyal yolu, Janus kinazlarının (JAK) veya büyüme faktörleri reseptör kinazlarının aktivasyonunu, STAT proteinlerinin fosforilasyonunu,

dimerizasyonunu ve STAT'ların transkripsiyon faktörleri olarak çekirdeğe translokasyonunu içerir (Şekil 2.7) (Swiatek-Machado ve Kaminska, 2020).



Şekil 2.7: Membran reseptörleri aracılı STAT aktivasyonu

Tanımlanmış 7 farklı STAT geni (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B ve STAT6) bulunmaktadır ve hücreler arası sinyalleşme, çok hücreli organizmalarda gelişimsel düzenleme, büyüme kontrolü ve homeostaz için kritik öneme sahiptir. STAT1, büyümeyi durduran ve apoptoza neden olduğu bilinen bir tümör supressör iken, STAT3 ve STAT5'in hücre döngüsünün ilerlemesini, hücresel transformasyonu ve apoptozu önlemede önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle özellikle STAT3 ve STAT5'in anormal aktivasyonu gliomalar dahil olmak üzere çok sayıda tümörde bulunmuştur (Aaronson ve Horvath, 2002).

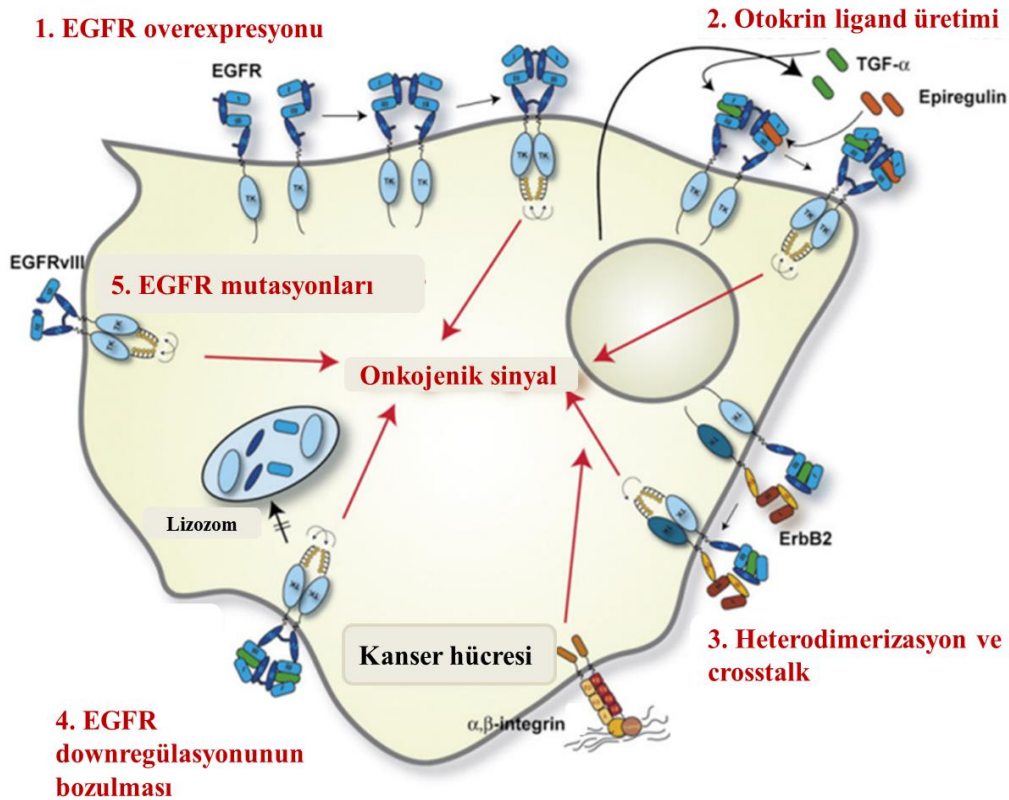
EGFR'ye ligand bağlanması, reseptörün internalizasyonuna ve bozulmasına neden olan bir protoonkogen olan Cbl'nin ubiquitin ligazları sürece dahil etmesi yoluyla negatif düzenleyici mekanizmaları da başlatır. Reseptör dimerizasyonu ve otofosforilasyonu ile Cbl, aktive EGFR'ye bağlanarak konformasyonel değişikliğe uğrar ve CIN85 ile etkileşimi artar. CIN85, endofilinleri EGFR-Cbl komplekslerine alarak plazma zarının eğriliğini değiştirmek suretiyle EGFR endositozunu düzenler. Bu nedenle Cbl, hem reseptör monoubikitinasyonuna aracılık eder hem de CIN85-endofilin

komplekslerini aktive edilmiş EGFR'lere alarak EGFR endositozunu destekler (Dikic, 2003).

BCL-XL, antiapoptotik BCL-2 ailesinin bir üyesidir. Normal şartlarda apoptoz ve hücre çoğalması denge halindeyken, EGFR overekspresyonu ve mutasyonları BCL-XL düzeylerinde artış meydana getirdiğinden hücre ölümsüzlüğüne neden olmaktadır (Huang vd., 2015).

Glioblastoma neredeyse tedavi edilemez durumda olan merkezi sinir sisteminin en yaygın, en agresif tümörüdür ve en tipik özelliklerinden biri de EGFR overekspresyonudur. Kan-beyin bariyeri penetrasyonun zayıflığı, tümör heterojenitesi, mutasyonlar ve telafi edici sinyal yolları gibi birçok faktör dirence katkıda bulunmakta ve direnç kemoterapide ciddi sıkıntılar oluşturmaktadır (Oprita vd., 2021).

2.5.1.1. Glioblastomada EGFR'nin Onkojenik Sinyal Oluşturmasına Neden Olan Mekanizmalar



Şekil 2.8: Glioblastomada EGFR'nin onkojenik sinyal oluşturmaya neden olan mekanizmalar

2.5.1.1.1. EGFR overekspresyonu

EGFR gen amplifikasyonu, GBM'lerin yaklaşık 75%'inde görülmektedir (Frederick vd., 2000) ve normal fizyolojik durumda EGFR reseptör sayısı 4×10^4 - 6×10^4 iken (Carpenter ve Cohen, 1979) kanser hücrelerinde 10^6 'dan fazladır (Gullick vd., 1986). Hücre membranında artan EGFR konsantrasyonu hem büyüme uyarıcı sistemi aktive etmekte hem de normal sinir hücrelerinin tümör hücrelerine dönüşmesine ve hastalığın ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (Brennan vd., 2013).

2.5.1.1.2. Otokrin ligand üretimi

Primer GBM'lerde EGFR aşırı ekspresyonuna bazen EGF ve TGF α artışı da eşlik etmektedir (Singh ve Harris, 2005).

GBM'de hücre-hücre füzyonunda, hücre adezyonunda, hücre membranından protein atılmasında ve proteolizde yer alan çok işlevli bir molekül olan ADAM12 (bir disintegrin ve metalloproteaz 12) metaloproteinazın yüksek oranda eksprese edildiği ve ayrıca heparin bağlayıcı EGF benzeri büyüme faktörünün (HBEGF) artan salınımı tespit edilmiştir (Kodama vd., 2004). Bütün bu durumlar otokrin bir döngünün varlığını göstermekte ve düzensiz EGFR sinyali ile sonuçlanmaktadır.

2.5.1.1.3. Heterodimerizasyon ve crosstalk

EGFR, ErbB ailesinin üyeleri, diğer reseptör tirozin kinazlar (RTK), hücre adezyon molekülleri, sitokin reseptörleri, iyon kanalları ve G-protein bağlı reseptörler ile iletişiminden dolayı kanserde önemli fonksiyonel role sahiptir. EGFR, ErbB2 gibi ErbB ailesinin diğer üyeleriyle heterodimerler oluşturmakta ve bu heterodimerler hücrel transformasyonun ve mitojenik sinyalleşmenin en güçlü ve en etkili indükleyicisi olarak görünmektedir (Zandi vd., 2007).

2.5.1.1.4. EGFR downregülasyonunun bozulması

Defektif EGFR downregülasyonu, anormal EGFR sinyallerine ve sağlıklı hücrelerin tümör hücrelerine dönüşmesine neden olmaktadır. EGFR downregülasyonu, hücre içi sinyali zayıflatan bir olaydır ve özellikle mutant EGFR varlığıyla ilgilidir. EGFR downregülasyonunda rol oynayan c-Cbl, EGFR hücre içi alanındaki spesifik fosforile bölgelere bağlanarak ubiquitin ile etiketlemeye aracılık edip, aktive edilmiş reseptörü lizozomal bozunmaya yönlendirir. EGFR mutantları, c-Cbl bağlanmasından

yoksun olduklarından vahşi tip EGFR'den daha güçlü mitojenik sinyaller ortaya çıkarmaktadır (Zandi vd., 2007).

2.5.1.1.5. *EGFR* mutasyonları

Hücre içi alanda değişikliklere (delesyonlar ve ekzon duplikasyonları) yol açan mutasyonlar ve spesifik olarak hücre içi tirozin kinaz alanında değişikliklere yol açan mutasyonlar (ekzon insersiyonları ve duplikasyonları) mevcuttur. Hücre dışı alanda değişikliklere yol açan (hücre dışı alanın tamamını veya bir kısmını kodlayan spesifik eksonların silinmesi) en sık görülen mutasyonlardır ve en iyi karakterize edilen tip 2 ve 7 ekzonlarından yoksun EGFRvIII'tir. EGFR gibi, EGFRvIII de hücre içi sinyal yollarını RAS-RAF-MEK-ERK ve PI3K-AKT'yi etkinleştirebilir. Ligandla aktive olan EGFR'nin aksine, EGFRvIII'ün ayrıca PI3K yoluyla Jun Nterminal Kinaz'ı (JNK) aktive ettiği, ancak STAT1 ve STAT3 aktivatörlerini aktive edemediği gösterilmiştir (Zandi vd., 2007).

Tümör içi heterojenliğin tedaviye yanıt almayı güçleştiren bir etken olmasının yanı sıra, EGFR'yi hedefleyen tirozin kinaz inhibitörleri, aşılar ve monoklonal antikorlar gibi farklı sınıf EGFR inhibitörlerinin, tümör baskılayıcı bir gen olan PTEN üzerinde inaktive edici mutasyonlara neden olduğu belirlenmiş ve bu nedenle EGFR inhibitörlerinin tedaviye direnç geliştirebileceği Fenton ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur (Fenton vd., 2012).

EGFR inhibitörlerinin kullanıldığı durumlarda bile PI3K sinyal iletim yolunda, PI3K'yi aktifleştirebilecek EGFR dışında farklı tirozin kinazlar mevcut olduğundan, farklı sinyal iletim yolları arasındaki çapraz etkileşimler sonucu PI3K'nin aktivasyonu meydana gelmekte ve bu durum dirençle sonuçlanmaktadır. EGFR inhibitörleri kullanılmasına rağmen glioblastoma dahil olmak üzere farklı kanser türlerinde bu tür direnç gelişimi gözlenmiştir (Taylor vd., 2012; Clark vd., 2012; Turke vd., 2010).

2.6. Glioblastoma ve Tümör Mikroçevresi

Kanser hücreleri, tümör gelişimi ve metastaz için heterojen yapıda olan hücresel ve hücresel olmayan bileşenler içeren tümör mikroçevresine (TMÇ) ihtiyaç duymaktadır. TMÇ kanser metastazını kolaylaştıracak proliferatif sinyallerin sürdürülmesi, hücre ölümüne direnç gelişmesi, anjiogenezin indüksiyonu, immün

yıkımdan kaçma, hipoksik ve inflamasyonlu ortamından dolayı immünoterapinin etkinliğini azaltarak ilaç dirençliliği meydana getirmektedir (Baş Topcu, 2022).

TMÇ'nin hücresel olmayan bileşenleri

TMÇ'de tümör fenotipini ve ilaç tepkilerini şekillendirmede büyük öneme sahip olan hücresel olmayan bileşenlerle ilgili son zamanlarda hem biyomarker araçlar hem de potansiyel terapötik hedefler olarak kullanımı için çalışılmaktadır. Hücresel olmayan bileşenler ile hücresel etkileşimler, tümör metastazının yönlendirilmesinde önemli rol oynamakta ve tümör-stromal hücre etkileşimi büyüme faktörlerinin, sitokinlerin, kemokinlerin ve matriks metalloproteazların (MMP) üretimini artırarak tümör büyümesini ve anjiogenezi kolaylaştırmaktadır (Patel vd., 2018). Kanser hücreleri invazyon yapabilmek için laminin ve fibronektin gibi birçok protein içeren bazal membranı ve ekstraselüler matriks (ECM) kollajenini, MMP adı verilen proteolitik enzimler aracılığıyla degregasyona uğratmakta ve degradesyon sonucu hücresel göçün oluşması, büyüme faktörlerinin/sitokinlerin düzenlenmesi, apoptoz ve neovaskülarizasyon meydana gelmektedir (Azevedo vd., 2020).

TMÇ'nin hücresel olmayan bileşenleri arasında yer alan interlökinler, interferonlar, tümör nekroz faktör ailesi ve transforme edici büyüme faktörü β (TGF β) protein ailesi gibi farklı işlevlere sahip sitokinler, büyümeyi uyarıcı ajanlar olarak tümör hücrelerine doğrudan etki ederken, dolaylı olarak inflamatuvar hücreleri uyarıp tümör oluşumunu etkileyebilmektedirler (Patel vd., 2018).

Kapsamlı araştırmalar kanser ve tümör infiltre hücrelerden salınan bazı sitokinlerin, proliferasyon, invazyon ve epitel-mezenkimal geçiş (EMT) oluşumuna destek olmak suretiyle TMÇ'nin gelişimini kolaylaştırdığını (Tsai vd., 2014), MMP ekspresyonunu artırmak suretiyle anjiogenez ve invazyonu teşvik ettiğini ve böylece tümör gelişimine katkı sunduğunu göstermiştir (Xu vd., 2014).

TMÇ'nin hücresel bileşenleri

TMÇ, tümörün büyümesini ve ilerlemesini sağlayan farklı hücre tiplerinden oluşur. Bu farklı hücrelerin karakterleri ve ekstraselüler matriks, invazyon ve metastazı belirlemede merkezi rol oynar. TMÇ'nin hücresel bileşenleri bağışıklık hücreleri (T lenfositleri, (CD8+, CD4+, Treg) B lenfositleri, doğal öldürücü hücreler (NK), tümör

ilişkili makrofajlar (TAM), 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 (Mona, 2018).

2.6.1. Tümör ilişkili makrofajlar ve inflamasyon

Cerrahi rezeksiyonla elde edilen glioma dokusu incelendiğinde, kanser hücreleri dışında en yoğun bulunan hücre tipinin TAM olduğu tespit edilmiştir (Ghosh Anirban, 2010; Graeber vd., 2002; Watters vd., 2005).

TMÇ oldukça heterojen bir yapıya sahiptir ve bu oldukça karmaşık olan hücresel ağ sitokinlerin, kemokinlerin, biyoaktif lipidlerin ve hücre dışı matris bileşenlerinin üretimi yoluyla iletişim kurar, iletişim ve etkileşim yoluyla çevrelerini şekillendiren çeşitli proinflamatuvar ve antienflamatuvar yanıtları belirlerler (Giering vd., 2017).

Glioma mikroçevresindeki hücrelerin %30-50'sini oluşturan ve dolayısıyla en çok bulunan mikrogliya ve periferik makrofajlar (GAM), tümör üzerinde çok güçlü bir etkiye sahip olup tümör derecesi ile pozitif, hastanın sağkalımı ile ters bir ilişkiye sahiptir (Rossi vd., 1987; Hambardzumyan vd., 2015). Bu inflamatuvar hücrelerin TMÇ'deki varlığı hem düzensiz inflamasyona hem de immünsupresif etkiye neden olur ki bu durum, kanser ve inflamasyon arasındaki köklü ilişkiyle de tutarlıdır (Colotta vd., 2009).

Enfeksiyona karşı fagositik ve sitotoksik özelliklere sahip olan GAM'lar tümör büyümesini, immün baskılamayı ve anjiyogenezi teşvik eden sitokinler, büyüme faktörleri ve biyoaktif lipidler (IL-1, IL-6, TGF-B, Epidermal büyüme faktörü (EGF), Prostaglandin E2 (PGE2)) gibi inflamatuvar maddeleri üretir (Nakano vd., 2008; Mostofa vd., 2017).

İnflamasyon, kanserin güçlü bir tetikleyicisi ve ayırt edici özelliklerinden biri olarak kabul görmektedir (Colotta vd., 2009). Gliomada inflamasyon 4 temel aşamadan meydana gelen karmaşık bir süreçtir. İlk aşama, bağışıklık hücrelerinin tümör bölgesine toplanması ve infiltrasyonu; ikinci aşama, küçük moleküllerin salınımı ve komşu hücreler üzerindeki reseptörlerin aktivasyonu ile tümör hücreleri ile çok sayıda bağışıklık hücresi arasındaki karmaşık sinyallerin meydana gelmesi; üçüncü aşama,

çoğalma, transkripsiyonel düzenleme, göç ve farklılaşmayı içeren tümör hücresi yanıtları ve dördüncü aşama, bağışıklıktan kaçınma, neovaskülarizasyon ve doku yeniden yapılanması tarafından yönlendirilen tümör ilerlemesi.

GAM'lerin etkinleştirilmesi tümör büyümesine, anjiyogeneze ve bağışıklığın baskılanmasına neden olan sitokinlerin, büyüme faktörlerinin ve diğer inflamatuvar mediatörlerin salınmasına neden olmaktadır (Phillip vd., 2023). Gliomada bu etkilere aracılık eden temel madde PGE2 ve onun biyosentetik enzimi olan COX-2'dir ve TMÇ'de aşırı eksprese edilmektedir (Qiu vd., 2017; Ching vd., 2020).

2.6.1.1. COX ve PGE2

Sırasıyla Prostaglandin G/H sentaz 1/2 (PTGS1/2) olarak da bilinen siklooksijenaz 1/2 (COX-1/2), araşidonik asidi (AA) prostaglandin G2 (PGG2) ve PGH2'ye dönüştüren hız sınırlayıcı enzimlerdir. PGH2 prostanoidler olarak bilinen 5 biyoaktif lipit (PGE2, PGI2, PGD2, PGF2a, Tromboksan A2 (TXA2) oluşturmak üzere prostaglandin E sentaz (PGES) tarafından metabolize edilir (Qiu vd., 2017; Colquhoun., 2017).

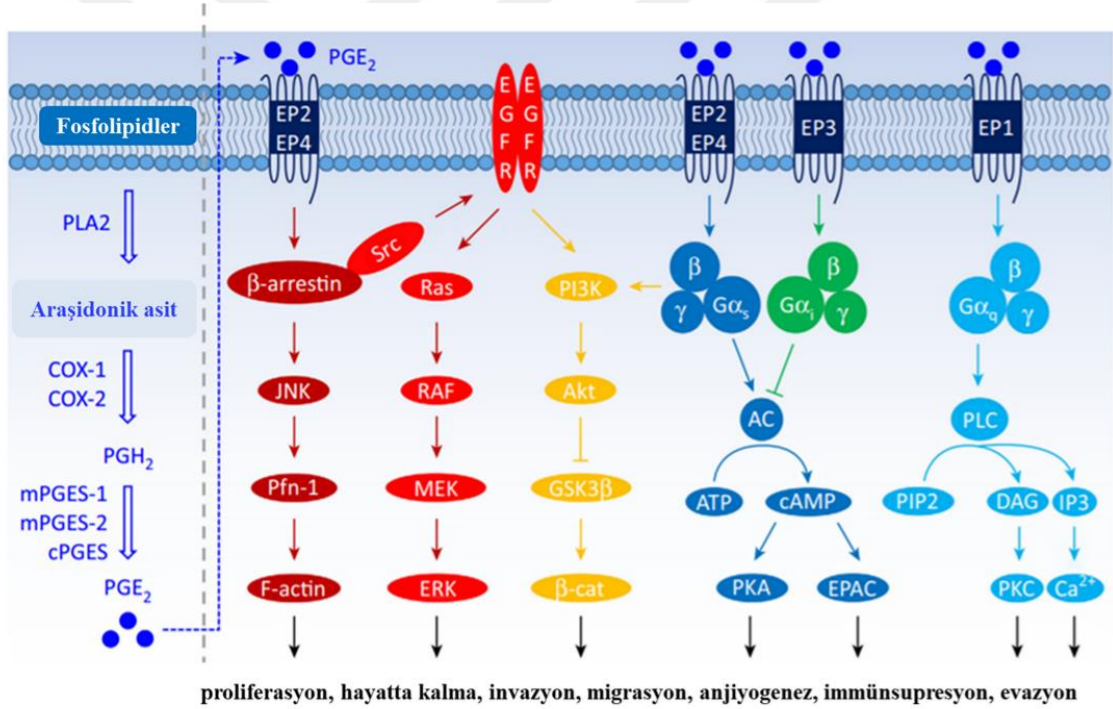
COX-1 çoğu dokuda yapısal olarak eksprese edilirken, COX-2 normal koşullarda çok düşük yapısal ekspresyona sahiptir ve patolojik ve inflamatuvar (sitokinler, büyüme faktörleri ve çeşitli tümör promotörleri gibi) uyarılarla hızlı ve güçlü bir şekilde indüklenmektedir (Qiu vd., 2017; Wang ve Dubois, 2006). COX aktivitesinin indüksiyonu ve COX ürünlerinin aşırı üretimi ateş, akut ağrı, lokal doku hasarı ve artrit gibi klasik inflamatuvar durumlara neden olmakta ve bu durumların tedavisinde kullanılan nonsteroidal antienflamatuvar ilaçlar (NSAİ) tarafından COX enzimi hedef alınmaktadır (Hinz vd., 2002).

PGE2, COX-2'nin baskın ürünüdür ve meme (Chen ve Smith, 2011), kolorektal (Sheng vd., 2020), akciğer (Harris, 2009) ve SSS (Qiu, 2017) gibi solid tümörlerin ilerlemesinde önemli rol oynar. 66 glioma hasta örneği üzerinde yapılan bir çalışma ile GBM tümör numunelerinin %71'inde %50'den fazla COX-2 pozitif hücre olduğu (Shono, 2001) ve bu oranın cerrahi rezeksiyon sonrası önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Loh, 2002).

PGE2, G proteini bağlı EP reseptör ailesi (EP1-4) üyelerine bağlanarak hücre içi sinyal yollarını aktive eder. Gq bağlı EP-1'in etkinleştirilmesi hücre içi Ca^{2+} u artıran

ve protein kinaz C'yi (PKC) aktive eden fosfolipaz C'nin aktivasyonuna; Gi-bağlı EP-3 reseptörü adenilat siklaz/cAMP sinyalinin inhibisyonuna; Gs bağli EP-2 ve EP-4'ün her ikisi de protein kinaz A'nın aktivasyonuna aracılık eden reseptörlerdir (Şekil 2.9). PGE₂ tarafından EP2 ve EP4 aktivasyonu, B-Arrestin ve protoonkogen olan tirozin-protein kinazın (c-Src) aktivasyonuna ve ardından EGFR transaktivasyonuna yol açarak hücre içi PI3K-AKT, RAS/RAF/MAPK ve JNK sinyal yollarını aktive edip hücre çoğalmasını, göçünü ve farklılaşmasını sağlamaktadır (Chun vd., 2010; Yun vd., 2011; Jiang ve Dingle, 2013; Oliver vd., 2016).

Çoklu moleküler sinyal yolları aktive eden PGE₂, glioblastoma hücresinin hayatta kalmasına, çoğalmasına, migrasyonuna, invazyonuna, anjiyogenezin gelişmesine, immünsupresyonun oluşmasına neden olmaktadır (Jiang vd., 2017).

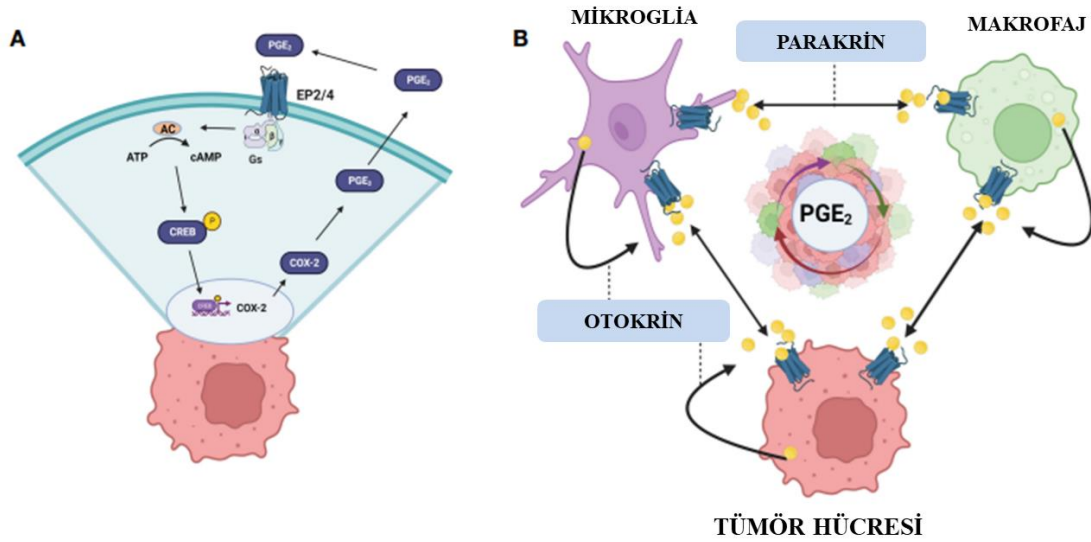


Şekil 2.9: EP Reseptörleri aracılığıyla PGE₂ sinyallemesinin gliomagenездеki rolü (Jiang vd., 2017)

PGE₂'nin COX-2 üretimi ve COX-2 ekspresyonunun PGE₂ regülasyonu ile ilgili farklı feedback mekanizmalar mevcuttur. PGE₂'nin EP2 ve EP4 reseptörlerini uarması ile CREB nükleer translokasyona uğrar ve sonrasında COX-2 promotörüne bağlanarak COX-2 ekspresyonunu artırır ve sonuç olarak daha fazla PGE₂ üretimi gerçekleşir.

(Şekil 2.10A). Makrofajlar, mikroglia ve tümör hücreleri, otokrin ve parakrin sinyaller aracılığıyla COX-2/PGE2 üretme ve bunlara yanıt verme yeteneğinin sürekliliği ile siklik inflamasyon fırtınası meydana getirir (Şekil 2.10B) (Dean ve Hooks, 2023). Bu döngünün şiddetlenmesi, TMÇ'de COX-2/PGE2'nin upregülasyonunu güçlü bir şekilde artırarak tümörü teşvik eden etkilere ve kötü prognoza yol açar (Dean ve Hooks, 2023).

GBM'nin geleneksel tedavilere direnç geliştirmesi, tedavisinde farklı hedeflere ve yaklaşımlara ihtiyaç duyulmasına neden olmaktadır. COX-2'nin kanser ilerlemesindeki çok yönlü ve önemli rolü GBM tedavisi için potansiyel bir hedef olabileceğini düşündürmektedir. COX-2'nin NSAİ tarafından inhibe edilmesi kanserlerin yaygın bir tedavisidir ve hastaların hayatta kalma süresini artırmıştır (Esbona vd., 2022).



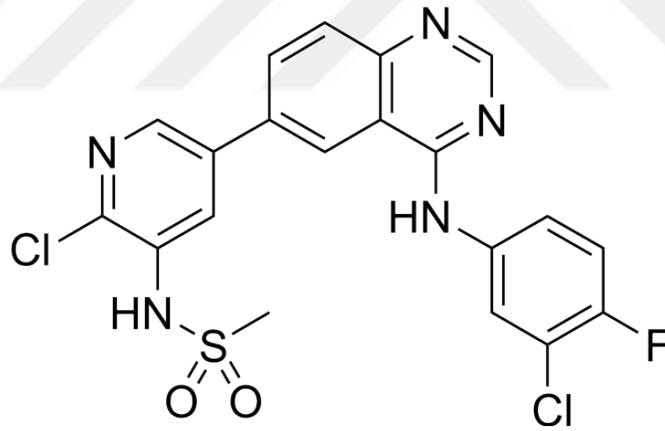
Şekil 2.10: GBM TMÇ'deki COX-2/PGE2 otokrin ve parakrin geri besleme döngüleri. (A) COX-2 ekspresyonu, EP-2/4'ün PGE2 tarafından aktivasyonu yoluyla indüklenmesi. (B) Tümör hücreleri ve glioma ilişkili makrofajlar (GAM), otokrin ve parakrin mekanizmaları yoluyla PGE2 aktivasyonu üzerine COX-2 ekspresyonunu yükseltmesi

Ancak NSAİ'nin COX-2 için seçici olmaması, COX-1 sentezini de inhibe etmesi ve bundan dolayı başta gastrointestinal sisteme bağlı yan etkiler olmak üzere çok sayıda yan etkiye neden olması kullanımlarını sınırlandırmaktadır (Goradel vd., 2019). Kanser tedavisinde terapötik potansiyelini koruyan ve daha az yan etkilere neden olan selektif

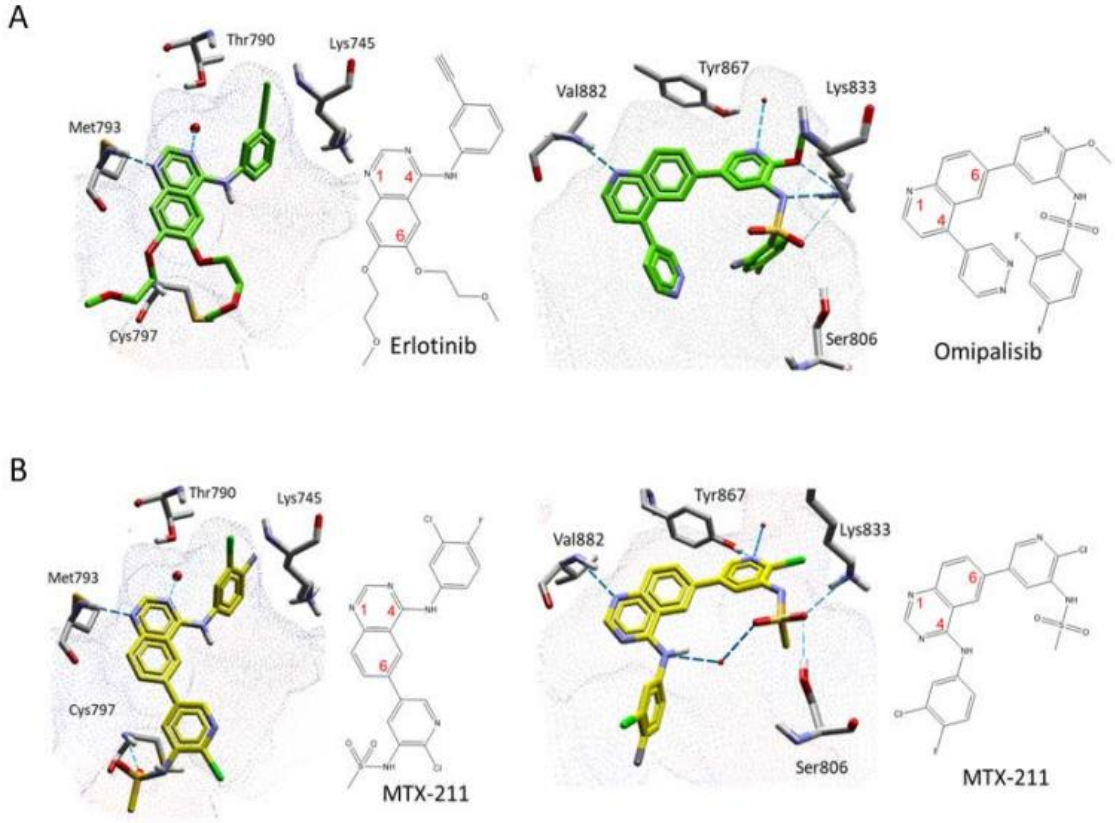
COX-2 inhibitörü olan ilaçların kullanılması hasta açısından büyük önem arz etmektedir.

2.7. MTX-211

MTX-211, Leopold laboratuvarında, EGFR ve PI3K'yı seçici ve eşzamanlı olarak inhibe edecek küçük moleküller tasarlamak için hesaplamalı modelleme kullanan bir ilaç tasarım kampanyasından ortaya çıkmış, EGFR inhibitörü erlotinib ve PI3K inhibitörü omipalisib kimyasal yapıları örnek alınarak sentezlenmiş (Şekil 2.11), iki hedef arasında ters çevrilmiş bağlanma moduyla bağlanarak her iki hedefi de inhibe eden dual etkili inhibitördür (Şekil 2.12). Tirozin, serin/treonin ve lipid kinaz dizisini kapsayan geniş bir kinaz panelinin taranmasıyla ortaya konduğu gibi HER ve PI3K ailesi üyeleri için oldukça seçici bir molekül olan MTX-211'in antiproliferatif aktivitesi, KRAS mutant ($KRAS^{MT}$) ve BRAF mutant ($BRAF^{MT}$) kolorektal kanserde, lösemi, melanoma (Abecunas vd., 2023), SSS tümörleri, meme ve prostat kanser modelleri için belirgindir (Maust, 2018).



Şekil 2.11: MTX-211 kimyasal yapısı

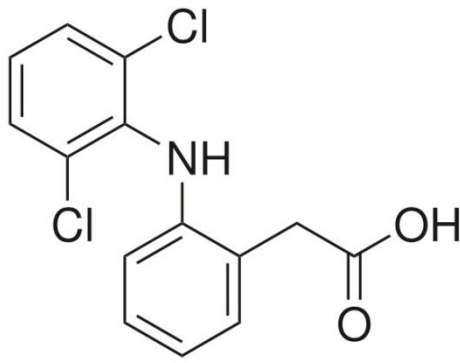


Şekil 2.12: EGFR ve PI3K'a bağlı MTX-211'in X-ışını kristal yapısı. (A) EGFR kinaz alanına (1M17) bağlı erlotinibin ve sol ve sağda sırasıyla PI3K gammaya (3L08) bağlı omipalisibin X-ışını kristal yapıları. (B) EGFR (sol) ve PI3K gama (sağ) kinaz alanına bağlı MTX-211'in x-ışını kristal yapıları (Maust, 2018).

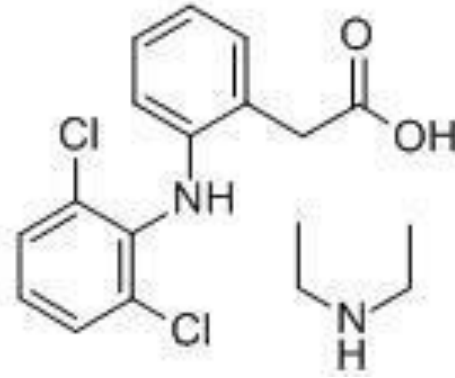
2.8. Diklofenak Dietilamin

Diklofenak, Ciba-Geigy tarafından geliştirilen (Joint Formulary Committee, 2015), analjezik, antienflamatuar ve antipiretik özelliklere sahip olduğu kanıtlanmış, çeşitli akut ve kronik ağrı ve inflamatuvar durumların tedavisinde kullanılmak üzere yaygın olarak reçete edilen nonsteroid antienflamatuar bir ilaçtır.

Diklofenak, COX-2'ye olan afinitesi daha yüksek olmakla beraber siklooksijenaz enziminin her iki izoformunun (COX-1 ve COX-2) seçici olmayan bir inhibitörüdür (Baigent vd., 2013).



Diklofenak



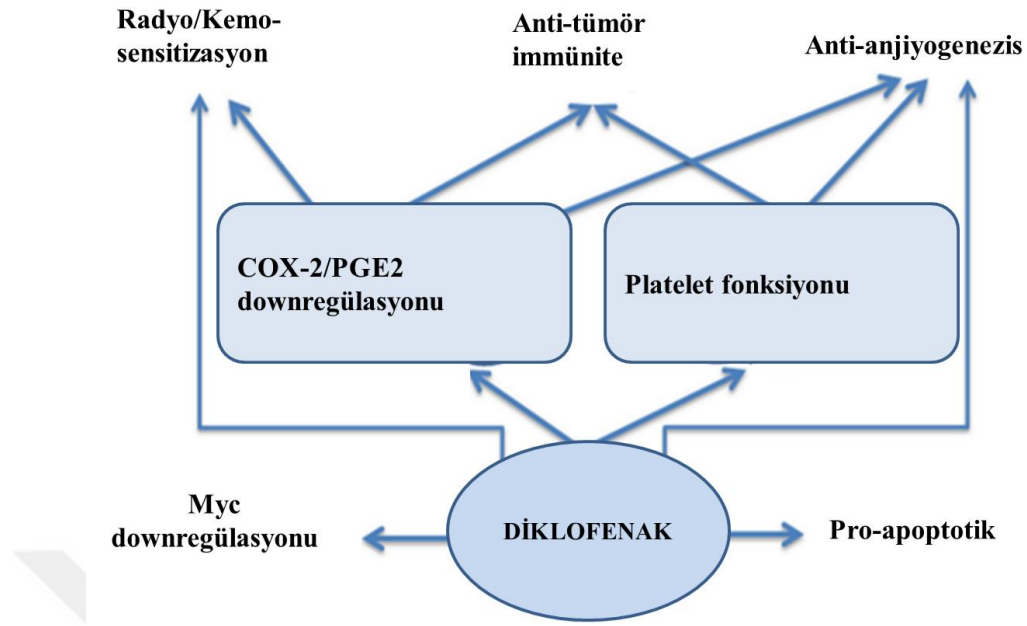
Diklofenak dietilamin

Şekil 2.13: Diklofenak ve diklofenak dietilamin kimyasal yapısı

Tüm NSAİ'de olduğu gibi diklofenak etkisini, COX-1 ve COX-2 enzimlerini inhibe ederek prostaglandin sentezini azaltarak göstermektedir. Yapılan kapsamlı araştırmalar, diklofenakın farmakolojik aktivitesinin sadece COX inhibisyonu değil kanser tedavisinde de düşünülmesini sağlayacak yeni etki mekanizmalarına sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 2.14) (Cryer ve Feldman, 1998).

Diklofenakın COX inhibisyonunun ötesinde anti-tümör etkisine ilişkin ilk kanıt, 1983 yılında bir sıçan modelinde implante edilmiş tümörlerde (fibrosarkom ve hepatom) Peterson tarafından gösterilmiş (Peterson, 1983) olup 2002 yılında Hoferova ve arkadaşları tarafından yapılan farelere implante edilmiş fibrosarkom tümörleri üzerindeki çalışmalar ile doğrulanmıştır (Hofer vd., 2002; Hoferova vd., 2003).

PGE2, EP1 ve EP4 reseptörleri aracılığıyla VEGF üretimini artırmak suretiyle anjiyogenezi tetiklediği (Ben-Av vd., 1995; Amano vd., 2003; Howe vd., 2013; Von Rahden vd., 2005), farklı kanser türlerinde COX-2 ekspresyonunun kemoterapi ve radyoterapiye duyarlılığı etkilediği, artan COX-2 ekspresyonunun kemoterapiye dirençle ilişkili olan çoklu ilaca dirençli gen (MDR1) ve P-glikoprotein (P-gp) ekspresyonu ile doğru orantılı olduğu (Surowiak vd., 2005) yapılan vaka analizleri ile belirlenmiştir. Diklofenak, COX-2 inhibisyonu aracılığıyla VEGF'yi azaltmak suretiyle antianjiyojenik etki meydana getirmekte ve kemoterapi/radyoterapiye duyarlılığı artırmaktadır.



Şekil 2.14: Diklofenakın etki mekanizmaları (Pantziarka vd., 2016).

Kanserde yaygın görülen trombositöz kötü prognozla ilişkilidir. Trombositler, proanjiyojenik faktörlerin salınması, tümör hücrelerinin NK hücrelerinden 'gizlenmesi' ve metastatik nişlerin hazırlanması gibi birçok süreçte önemli rolleri olan, tümör progresyonuna ve metastazına olumlu katkılar sağlayarak kanser yanlısı bir etki meydana getiren hücrelerdir (Gay vd., 2011; Digkila ve Voutsadaki, 2014; Rachidi vd., 2014; Kim vd., 2014). Diklofenak, COX-2 afinitesi daha yüksek olmasına rağmen COX-1'i de inhibe ederek antitrombotik etki meydana getirmektedir (Van Hecken vd., 2000; Bajaj vd., 2004). Trombosit inhibisyonu sonucu anti-anjiyojenik, immünmodülatör ve antimetastatik etkiler oluşturmaktadır.

COX-2/PGE2 ekspresyonunu immünsupresyon ile ilişkilendiren (Obermajer vd., 2011; Johnson vd., 2014; Baratelli vd., 2010) çok sayıda çalışma mevcuttur. COX-2 ve PGE2 seviyelerindeki artış, lenfosit popülasyonlarında mitojen yanıtında azalmaya (Wasserman vd., 1989; Blomgren vd., 1990), T-reg hücre sayılarında artışa (Kalinski, 2012; Baratelli vd., 2010; Baratelli vd., 2005; Cho vd., 2005) ve antijen sunucu hücrelerin (APC)/dendritik hücre (DC) indüksiyonu ve olgunlaşmasının inhibisyonuna neden olarak tümörle ilişkili immünsupresyon meydana getirmektedir (Sombroek vd., 2002; Shiraishi vd., 2008). Tümör kaynaklı PGE2 düzeylerinin selektif olmayan COX

inhibitörleri kullanılarak azaltılması T-reg popülasyonlarını ve aktivitesini azaltarak immünsupresyonu tersine çevirmektedir (Yağub vd., 2008; Lee vd., 2009; Lönnroth vd., 2008; Ogawa vd., 2014; Chirasani vd., 2013).

Diklofenak ve diğer NSAİ'nin DNA parçalanması ve kaspaz bağımlı bir yolak olan (Johnsen vd., 2004) AKT/PI3K sinyal yolağının inhibiyonu (Rana vd., 2015), hücre içi ROS düzeyindeki artış, kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün artması, Bcl-2/Bax oranının azalması ve sitokrom c'nin mitokondriyal salınımı ile ilişkili pro-apoptotik etki mekanizmalara sahip olduğunu (Albano vd., 2013) gösteren çalışmalar mevcuttur.

COX inhibitörü etkisinden bağımsız olarak diklofenak tümör metabolizmasını da etkilemektedir. *İn vitro* ve *in vivo* farklı kanser modellerinde Myc gen ekspresyonunu ve glukozu downregüle etmekte, Myc gen ekspresyonu üzerindeki etkiden bağımsız olarak hücrel laktat seviyelerinde artışa neden olmakta ve proliferasyon hızının azalmasına yol açmaktadır (Chirasani vd., 2013; Gottfried vd., 2013; Leidgens vd., 2015).

3. GEREÇLER

3.1. Deneylerde Kullanılan Hücreler

Çalışmamızda kullanılan hücreler ATCC (Amerikan Tissue Culture Collection)'den sağlanmıştır. THP-1 insan monosit hücresi (ATCC kodu: TIB-202), U87MG insan glioblastoma hücresi (ATCC kodu: HTB-14), HUVEC insan umbilikal ven endotel hücresi (ATCC kodu: PCS-100-013) deneylerde kullandığımız hücre hatlarıdır.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

MEM (Minimum Essential Medium)	Sigma–Aldrich, Almanya
F12K Medium	Sigma-Aldrich, Almanya
RPMI-1640 Medium	Thermo Scientific, ABD
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma–Aldrich, Almanya
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma–Aldrich, Almanya
L-glutamin	Sigma–Aldrich, Almanya
Penisilin/Streptomisin	Gibco, ABD
B-Merkaptoetanol	AppliChem, Almanya
EGFR	Sigma–Aldrich, Almanya
Trypsin-EDTA 10X	Pan Biotech, Almanya
Trypan mavisi	Roche, Almanya
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Invitrogen, Almanya
CellTiter-Blue reagent	Promega, ABD
MTX-211	Sigma–Aldrich, Almanya
Diklofenak dietilamin	Sigma–Aldrich, Almanya
Lipopolisakkarit (LPS)	Sigma–Aldrich, Almanya
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit	BD Pharmingen, ABD
PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit	BD Pharmingen, ABD
PE Anti-Human IL-6 Antibody	Biolegend, ABD
PE Anti-Human IL-10 Antibody	Biolegend, ABD
PE Anti-Human IL-1 β Antibody	Biolegend, ABD
PE Anti-Human TNF α Antibody	Biolegend, ABD
Anti-Hu IL-8 Antibody	Invitrogen, Almanya

10, 100, 1000 ve 5000 µL'lik pipetör	Eppendorf, Kanada
10, 200, 1000 µL'lik mikropipet ucu	Greiner bio-one, ABD
12 kanallı otomatik pipet	Axygen, İngiltere
15 ve 50 mL'lik santrifüj tüpleri	Isolab, Almanya
2 mL'lik Ependorf tüp	Greiner bio-one, ABD
24 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakası	TPP, İsviçre
Cedex Smart Slide	Roche, Almanya
Parafilm	Pechiney, Fransa
Şarjlı pipetör	Starlab, Almanya
Kryotüp (2mL)	Greiner Bio-One, ABD
Hücre kazıyıcı	Greiner Bio-One, ABD
96 kuyucuklu hücre kültür plakası	TPP, İsviçre
E-plate 16	Roche, Almanya
xCELLigence E-plate	16 Roche, Almanya
xCELLigence CIM-plate 16	Roche, Almanya
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences, ABD
24 kuyucuklu ko-kültür plakası	Corning, ABD
Otomatik pipetler	Eppendorf, Almanya
Thermo Flask, Filtreli Kapak (75 cm ²)	Thermo Scientific, ABD
Thermo Flask, Filtreli Kapak (25 cm ²)	Thermo Scientific, ABD
HERAcell 150 Steril CO ₂ inkübatörü	Thermo Scientific, ABD
Laminer flow kabini	Heal Force, Çin
Masaüstü soğutmalı santrifüj	Eppendorf, Almanya
Hücre sayımı için Cedex XS	Innovatis, ABD
Cytation 3 Multi-Mode Reader	Bio-Tek, ABD
RTCA DP	Roche, Almanya
Derin dondurucu buzdolabı	Altus, Türkiye
Hassas terazi	Ohaus, Avustralya
Inverted mikroskop	Leica, Almanya
Mikro santrifüj	Hettich, Almanya
NanoDrop 2000 Spektrofotometre	Thermo Scientific, ABD
Otoklav	Alp, Türkiye
Sterilizatör	Nüve, Türkiye

Su banyosu

Nüve, Türkiye

Vorteks

Daihan, Güney Kore

Akım sitometri cihazı

BD Acuri C6, ABD

3.3. Kullanılan Malzemelerin Steril Edilmesi

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

3.4. Kullanılan Kimyasal Maddelerin ve İlaçların Hazırlanması

Diklofenak dietilamin: DMSO içinde çözülerek 100 mM konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok, alikuatlanarak -20°C’de saklanmış, stok solüsyondan, kültür medyumunda çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak, gerekli deney konsantrasyonları taze olarak hazırlanmıştır.

MTX-211: DMSO ile çözülerek 10 mM ana stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok, alikuatlanarak -20°C’de saklanmış, stok solüsyondan, kültür medyumunda çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak, gerekli deney konsantrasyonları taze olarak hazırlanmıştır.

MEM (U87MG Hücre Hattı İçin): 10% FBS + 1% Penisilin+Streptomisin

RPMI-1640 (THP-1 Hücre Hattı İçin): 10% FBS + 1% Penisilin+Streptomisin + 0.37% Merkaptotanol

F12K (HUVEC Hücre Hattı İçin): 10% FBS + 1% Penisilin+Streptomisin + Epidermal Growth Factor (1.25 µL 50 mL)

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.

4. YÖNTEMLER

Tez çalışmamızda, U87MG, THP-1 ve HUVEC hücre kültürlerinde MTX-211 ve diklofenak dietilaminin antiproliferatif etkileri ve kombinasyonlarının sinerjistik sitotoksik etkileri, U87MG hücre kültüründe MTX-211'in hücre proliferasyonu, migrasyonu üzerindeki etkileri ve IC50 değeri, U87MG ve THP-1 ko-kültürde MTX-211, diklofenak dietilamin ve sinerjistik etki belirlediğimiz konsantrasyonlarının kombinasyonları ile apoptotik, antimetastatik ve antienflamatuar etkileri, HUVEC ve THP-1 ko-kültürde antianjiyogenik etkileri araştırılmıştır. Kullanılan yöntemler **Tablo 4.1**'de gösterilmektedir.

Tablo 4.1. Yapılan çalışmalar ve uygulanan yöntemlerin şematik olarak gösterilmesi

2D HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI	
Tekli Hücre Kültürü Çalışmaları	Ko-Kültür Çalışmaları
THP-1, U87MG ve HUVEC hücrelerinde CellTiter-Blue yöntemi ile MTX-211 ve diklofenak dietilaminin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi	THP-1 hücrelerinin LPS ile aktive edilmesi
MTX-211 (5 µM, 10 µM, 20 µM) ve diklofenak dietilaminin (50 µM, 100 µM, 300µM) kombinasyonlarının U87MG, HUVEC ve THP-1 hücreleri üzerinde sinerjistik sitotoksik etkilerinin belirlenmesi	Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) kullanılarak U87MG ve THP-1 ko-kültür ortamlarında hücre proliferasyonunun belirlenmesi
Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) ile U87MG hücrelerinde MTX-211'in antiproliferatif etkilerinin belirlenmesi	Antikanser Etkinin Belirlenmesi
Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) kullanılarak U87MG hücre migrasyonunun incelenmesi	Akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi
	Akış sitometride kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkinin belirlenmesi
	Antienflamatuar Etkinin Belirlenmesi
	U87MG ve THP-1 ko-kültürde akış sitometride interlökin 1 beta (IL-1β) seviyelerinin belirlenmesi
	U87MG ve THP-1 ko-kültürde akış sitometride IL-6, IL-8, IL-10 ve TNFα seviyelerinin belirlenmesi
	Çizik Deneyi ile U87MG ve THP-1 ve HUVEC ve THP-1 ko-kültürde Migrasyonun İncelenmesi

Tablo-4.1. (Devam) Yapılan çalışmalar ve uygulanan yöntemlerin şematik olarak gösterilmesi

U87MG ve THP-1 ko-kültürde U87MG hücrelerinin migrasyonunun incelenmesi
HUVEC ve THP-1 ko-kültürde HUVEC hücrelerinin migrasyonunun incelenmesi

4.1. U87MG, THP-1 ve HUVEC Hücrelerinin Kültür Ortamında Çoğaltılması, Hücre Sayımı ve Deneylere Hazırlık

Stoktan çıkarılan U87MG hücreleri, %10'luk FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren MEM (% 1 L-glutamin, %1 sodyum pirüvat) besiyeri içinde, flasklarda %95 bağıl nem ve %5 CO₂'li gaz ortamında ve 37°C'deki inkübatörde kültüre edilmiştir. Çoğalan hücreler yeni 25 cm²'lik flasklara pasajlanmıştır ve deneylerde kullanılmak üzere hücre stokları hazırlanmıştır.

Stoktan çıkarılan HUVEC hücreleri, %10'luk FBS, %1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin içeren F-12 Kaighn's modifiye medyum ile (1:50 endotel hücre büyüme faktörü (ECGF) besiyeri içine eklenmiştir) %95 bağıl nem ve %5 CO₂'li gaz ortamında 37°C'de inkübatörde kültüre edilmiştir. Çoğalan hücreler flasklara pasajlanarak deneysel çalışmalarda kullanılmıştır.

Stoktan çıkarılan THP-1 hücre hücreleri %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %0,37 merkaptotanol içeren RPMI-1640 besiyerinde belli yoğunluğa ulaşana kadar %5 CO₂ ve %95 bağıl nemli inkübatörde 37°C'de inkübe edilmiştir. Çoğalan hücreler flasklara pasajlanarak deneysel çalışmalarda kullanılmıştır.

Flasklarda çoğalan U87MG ve HUVEC hücreleri flask zeminine yapışan 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. 4 mL besiyeri eklendikten sonra santrifüj edilmiş süpernatant atıldıktan sonra pellet 1 mL besiyerinde çözölmüştür. THP-1 hücreleri süspanse hücreler olmaları sebebi ile flasktan direk santrifüj tüpüne alınarak süpernatant atılmış ve pellet 1 mL besiyerinde çözönmüştür.

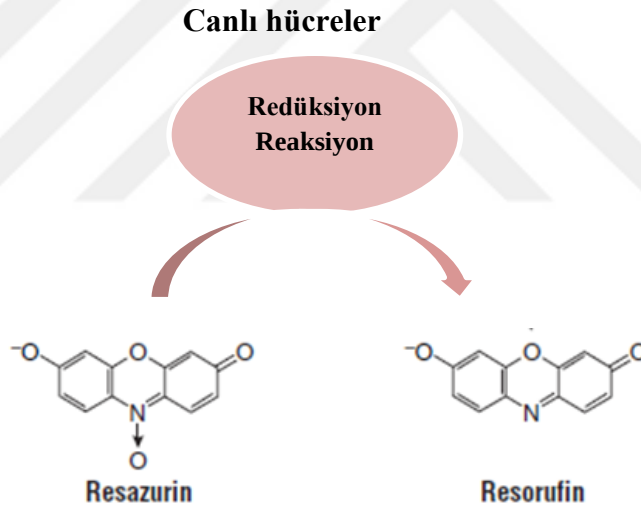
Hücreler gerçekleştirilecek olan yöntemler uygulanmadan önce 10 µL tripan mavisi ve 10 µL hücre çözeltisi karışımı sağlanarak ölü hücrelerin maviye boyanması sağlanmış, 10 µL boya-hücre karışımından alınarak hücre sayım cihazında (Cedex,

Roche) sayılmıştır. CellTiter-Blue testi için 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakaya hücre ekimi gerçekleştirilmiştir.

4.2. 2D Hücre Kültürü Çalışmaları

4.2.1. CellTiter-Blue ile U87MG, THP-1 ve HUVEC hücrelerinde sitotoksisitenin belirlenmesi

CellTiter-Blue testi, çok kuyucuklu plakalarda bulunan canlı hücrelerin sayısını tahmin etmek için kullanılan homojen ve florometrik bir yöntemdir. Hücre canlılığının bir göstergesi olan hücrelerin metabolik kapasitesini ölçmek için resazurin boyası kullanılmaktadır. Canlı hücreler, koyu mavi renkli resazurini oldukça floresan olan pembe renkli resorufine indirger (Şekil 4.1). İndirgemenin ardından resorufin, floresansta çarpıcı bir artışa uğrar ve çoğu deneysel durumda bu artış canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır.



Şekil 4.1: Canlı hücreler tarafından resazurinin resorufine indirgenmesi

Canlı olmayan hücreler hızla metabolik kapasitelerini kaybettiklerinden dolayı indikatör boyayı indirgeyemez ve bu nedenle floresan sinyali üretmezler. Kültür ortamında resorufin uyarımı ve emisyon zirveleri içeren serum sırasıyla yaklaşık 579 nm ve 584 nm'dir ve floresans ölçümlerine izin verir. CellTiter-Blue zaman kazandırması, test formatı (96 ve 384 kuyulu plakalarda) ve tespit yöntemi (florosan veya absorbans) seçimine izin vermesi, kullanışlı olması ve kullanılan reaktifin toksik

olmaması nedeni ile uzun inkübasyon sürelerine izin vermesi gibi avantajlara sahip olduğundan dolayı kullanılmaktadır (CellTiter-Blue cell viability assay protokolü).

96 kuyucuklu plakalara U87MG, THP-1 ve HUVEC hücreleri sayım yapılarak her bir kuyucukta 100 µL de 5×10^3 hücre olacak şekilde besiyeri ortamına ekilmiştir. THP-1 hücrelerine ekim yapıldıktan 4 saat sonra, U87MG ve HUVEC hücrelerinin plakaya yapışmaları için 24 saat inkübasyon süresi sonunda MTX-211'in 5 µM, 10 µM ve 20 µM ve diklofenak dietilamin (Dik) 50 µM, 100 µM ve 300 µM konsantrasyonları hücrelere tekli ve kombinasyonlar halinde uygulanarak (Tablo 4.2) 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol % 0.1'lik DMSO ile hazırlanmıştır.

Dik 300µM	MTX-211 5µM+ Dik 300µM	MTX-211 10µM+ Dik 300µM	MTX-211 20µM+ Dik 300µM
Dik 100µM	MTX-211 5µM+ Dik 100µM	MTX-211 10µM+ Dik 100µM	MTX-211 20µM+ Dik 100µM
Dik 50µM	MTX-211 5µM+ Dik 50µM	MTX-211 10µM+ Dik 50µM	MTX-211 20µM+ Dik 50µM
Kontrol	MTX-211 5µM	MTX-211 10µM	MTX-211 20µM

Tablo 4.2: Kontrol, MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının 96 kuyucuklu plakalara uygulanma düzeni

İnkübasyon süreleri tamamlanan 96 kuyucuklu plakalara 20µl/kuyu CellTiter-Blue reaktifi eklenmiş ve 10 saniye çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır. 3 saatlik inkübasyon süreleri sonunda plakalar inkübatörden alınarak 10 sn çalkalanmış ve Cytation 3 Cell Imaging MultiMode Reader'da floresan (exitasyon 560, emisyon 590) ve absorbans (570 nm) değerleri ölçülmüştür. Kontrol kuyularının absorbans değerleri ortalaması %100 kabul edilmiş ve maddelerin konsantrasyonları uygulanan grupların % hücre canlılık değerleri hesaplanmıştır.

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

Kontrolün absorbans değeri

4.2.2. MTX-211 (5 µM, 10 µM, 20 µM) ve diklofenak dietilaminin (50 µM, 100 µM ve 300 µM) kombinasyonlarının U87MG, HUVEC ve THP-1 hücreleri üzerinde sinerjistik sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

MTX-211 (5 µM, 10 µM, 20 µM) ve diklofenak dietilaminin (50 µM, 100 µM ve 300 µM) U87MG, HUVEC ve THP-1 hücreleri üzerinde antagonist/sinerjist etkileşimleri CDI formülüne göre, CellTiter-Blue testi absorbans sonuçlarının % hücre canlılık değerlerine dönüştürülmesiyle hesaplanmış ve değerlendirilmiştir. Buna göre;

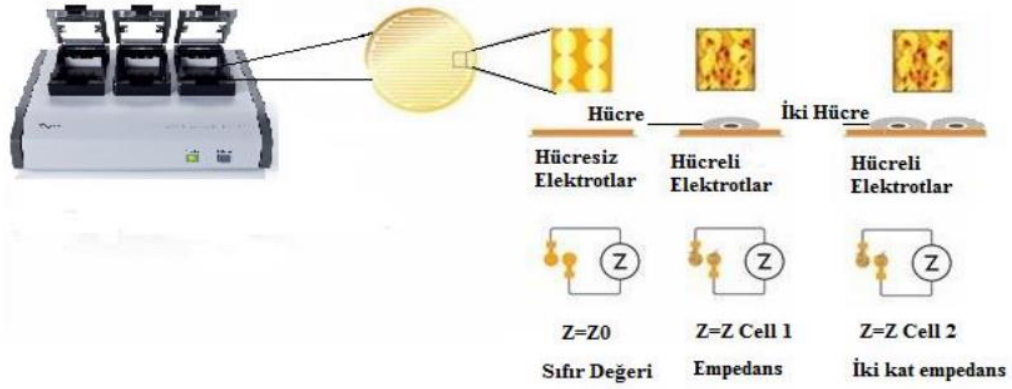
$$CDI = \frac{\text{Kombin (X+Y) \% Hücre Canlılığı}}{\text{X \% Hücre Canlılığı} \times \text{Y \% Hücre Canlılığı}} \times 100$$

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

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).

4.2.3. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) ile U87MG hücrelerinde MTX-211'in antiproliferatif etkilerinin belirlenmesi

Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA-DP), e-plaka altındaki altın plakalarda bulunan elektrotlarda, hücrelerin adhezyon miktarlarını ölçen hücresel bir biyosensördür (Kho vd., 2015). Altın plakalardaki elektrotlardan elde edilen elektronik empedans okumasına dayanarak işlev gören RTCA ile sitotoksosite, hücre proliferasyonu, invazyon, migrasyon ve ko-kültür çalışmaları yapılabilmektedir (Dikmen vd., 2017). Cihazdan elde edilen hücre indeks verileri, hücrelerin plaka yüzeyine tutunurken ve birbirinden ayrılırken meydana getirdiği empedans değişikliğinin matematiksel algoritmalar yoluyla hesaplanması sonucu elde edilmektedir. Hücre indeks değeri ile zemine tutunan hücre sayısı arasında paralel bir ilişki vardır (Şekil 4.2) (Moniri vd., 2015; Marlina vd., 2015).



Şekil 4.2: RTCA DP cihazı, elektrotların yerleştiği 3 plaka yuvası ve elektrotların tabanlarına yapışan hücre sayısına göre değişen empedans değeri arasındaki ilişki

Bu sistem ile MTX-211'in U87MG hücre proliferasyonu ve migrasyonuna etkileri hem gerçek zamanlı olarak kayıt altına alınmış hem de bilgisayar bağlantılı sistemle eş zamanlı olarak izlenmiştir. Gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde hücre proliferasyonunun analizi için CellTiter-Blue testi ile belirlediğimiz MTX-211 konsantrasyonları (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) U87MG hücreleri bulunan E-plaka kuyucuklarına 100 μ L medyum içinde uygulanmıştır. Konsantrasyonlar uygulandıktan 48 saat sonra cihaz durdurulmuş ve analiz aşamasına geçilmiştir. RTCA DP ile elde edilen hücre indeks değerlerine göre MTX-211'in IC50 değeri U87MG hücreleri için RTCA DP Software 1.2.1 programı kullanılarak hesaplanmıştır.

4.2.4. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) ile U87MG hücre migrasyonunun incelenmesi

MTX-211'in U87MG hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için RTCA DP ve bu sisteme uygun 16 kuyucuklu plakalar (CIM-16) kullanılmıştır. 2 bölüm ve 3 parçadan meydana gelen CIM-16 kodlu plakanın (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) en alttaki parçasına hücre medyum ve kemoatraktan (FBS vb.), altın kaplı elektrot içeren parçasına serumsuz medyumda hazırlanmış hücreler eklenmektedir. En üstte bulunan parça ise plakanın kapağı olarak görev görmektedir (Bird ve Kirstein, 2009).



Şekil 4.3: Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) modeli ve CIM-16 kodlu plakanın parçaları

MTX-211 (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) konsantrasyonlarının U87MG hücre migrasyonu üzerine etkileri, gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) kullanılarak 48 saat süresince 10 dakikalık periyotlar ile incelenmiştir.

4.3. Ko-Kültür Çalışmaları

4.3.1. THP-1 hücrelerinin LPS ile aktive edilme çalışmaları

Proliferasyon çalışmasında 16 kuyucuklu E-plaka insert kullanılmıştır. THP-1 hücreleri 250.000 hücre/200 μ L insert bölümüne ekilmiş 20 saat inkübasyon sonunda 2 μ L LPS ilave edilerek 6 saat inkübasyona bırakılmış ve LPS ile aktivasyonu sağlanmıştır.

4.3.2. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) ile THP-1 ve U87MG ko-kültür ortamlarında hücre proliferasyonunun belirlenmesi

16 kuyucuklu E-plaka insert kullanılarak U87MG hücre proliferasyonu belirlenmiştir. THP-1 hücreleri insert bölümüne ekilmiş ve LPS ilavesiyle aktivasyonu sağlanmıştır. E-plate'in alt alıcı kısmına U87MG hücreleri 50.000 hücre/100 μ L ekilmiş, zemine yapışmaları için 24 saat beklenmiş ve taze medyum içinde MTX-211 konsantrasyonları uygulanarak E-plate insert içinde LPS ile aktive edilmiş THP-1 ile birleştirilmiş ve ko-kültür oluşturulmuştur.

U87MG ve THP-1 ko-kültür ortamında, U87MG hücrelerinde LPS (-) Kontrol grubuna göre LPS (+) Kontrol ve MTX-211 (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) konsantrasyonlarının antiproliferatif etkileri gerçek zamanlı (10 dakikalık veri

alınmıştır) olarak 96 saat süresince incelenmiş ve RTCA DP Software 1.2.1 programı kullanılarak konsantrasyon-hücre indeksi eğrileri oluşturulmuştur.

4.3.3. Antikanser etkinin belirlenmesi

4.3.3.1. U87MG ve THP-1 ko-kültürde (insertli) akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi

Sağlıklı hücrelerde, hücre zarının sitoplazmik yüzü olan iç kısmındaki membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin, hücrenin apoptoza gitmesi durumunda hücre zarının dış yüzüne transloke olur. Hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı bu evre apoptozun erken evresidir.

Annexin V-PI yöntemi, apoptotik hücrelerde hücre zarının parçalanması sonucu hücre zarının iç kısmında yer alan fosfatidilserinin hücrenin dış kısmına çıkması esasına dayanır (Boğa, 2009). Annexin v, floresan bir madde olan FITC ile işaretlenerek, hücrenin dış yüzüne transfer olan fosfatidilserine bağlanarak apoptotik hücreyi görünür hale getirilebilirken (Gatti vd., 1998; Kopman vd., 1994; Overbeeke vd., 1998; Zhang vd., 1997) DNA ya da çift sarmallı RNA'ya bağlanan propidyum iyodid (PI) ise, membran yapısı bozulmuş geç apoptotik ve nekrotik hücreleri belirlemek için kullanılmaktadır (Boğa, 2009).

Annexin V'in hücre yüzeyindeki fosfatidilserine ve PI'nin hücrenin genetik materyaline bağlanma oranı akış sitometri ile ölçülebilmektedir. Annexin V-FITC (yeşil floresan) ve PI (kırmızı floresan) ile eş zamanlı boyanan hücreler canlı hücreler iken, sadece Annexin-V ile boyanan hücreler erken apoptotik hücreler, sadece PI ile boyanan hücreler nekrotik hücreler ve her iki boya ile boyanan hücreler ise geç apoptotik hücreler olup, akış sitometri ile bu ayırım sağlanabilmektedir (Overbeeke vd., 1998; Tesarik vd., 1998).

Bu çalışma için BD Pharmingen Annexin V Apoptosis Detection Kit protokolü uygulanmıştır. Her bir kuyucuğa 50.000 hücre/100 µL U87MG ve her bir inserte 250.000 hücre/200 µL THP-1 ekilmiştir. 1 insert hariç hepsine 2 µL LPS uygulanmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonra eski medyumlar atılmış ve her kuyucuğa 1mL hacimde ilaçlar uygulanmıştır. İnsertler (12 adet) üst 2 sıraya yerleştirilerek ko-kültür ortamı oluşturulmuş ve MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonları ile 48 saat

inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat inkübasyon süresi sonunda her kuyunun fotoğrafları çekildikten sonra U87MG hücreleri falkon tüplerde toplanmış, 1200 RPM'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan ve hücre pelleti 2 kez 2 mL soğuk PBS ile yıkandıktan sonra kalan pellet 100 µL PBS ile resüspanse edilmiş ve 100 µL Binding Bufffer (1x) ilave edilmiştir. Ependorf tüplere 5 µL Annexin ve 5 µL PI boyası eklenmiş ve 200 µL resüspanse hücreler tüplere eklenerek boyalarla karışması sağlanmış, karanlıkta ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 400 µL Binding Bufffer (1x) ilave edilerek akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) grupların apoptotik okumaları yapılmıştır.

4.3.3.2. U87MG ve THP-1 ko-kültürde (insertli) akış sitometride kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkinin belirlenmesi

Hücre iskeletine ait proteinlerin yıkımından, DNA fragmentasyonundan ve kromatin kondensasyonundan sorumlu olan kaspaz-3, dışsal ve içsel (mitokondriyal) apoptotik yolak üzerinden aktifleşebilen ve apoptozu sonlandırıcı kaspazlardan biridir. Bu fonksiyonlarından ötürü bir hücrenin apoptoza gittiğinin en önemli göstergelerinden biri kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesidir (Slee E.A vd., 2001).

Hücrelere önce geçirgen hale getirilmek üzere kit içeriğinde bulunan Cytofix/Cytoperm solüsyonları ilave edilmekte ve daha sonra PE Rabbit Anti-Aktif kaspaz-3 ile boyanarak akış sitometri cihazında analizi yapılarak aktif kaspaz-3 yüzdeleri belirlenmektedir.

Kaspaz-3 aktivasyonun belirlenmesinde PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit protokolü uygulanmıştır. Her bir kuyucuğa 50.000 hücre/100 µL U87MG ve her bir inserte 250.000 hücre/200 µL THP-1 ekilmiştir. 1 insert hariç hepsine 2 µL LPS uygulanmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonra eski medyumlar atılmış ve her kuyucuğa 1mL hacimde ilaçlar uygulanmıştır. İnsertler (12 adet) üst 2 sıraya yerleştirilerek ko-kültür ortamı oluşturulmuş ve MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonları ile 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda U87MG hücreleri falkon tüplerde toplanmış, 1200 RPM'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan ve hücre pelleti 2 kez 2 mL soğuk PBS ile yıkandıktan sonra kalan pellet 100 µL PBS ile resüspanse edilmiş ve hücre geçirgenliği ve fiksasyon sağlamak için 500 µL cytofix/cytoperm solüsyonu ilave edilerek 20 dk buzun içinde bekletilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda 1200 RPM'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra

pellet 2 kez 500 µL perm wash ile yıkanmış, 50 µL perm wash ile resüspanse edildikten sonra ependorf tüplere alınmış, 10 µL antibody (PE Rabbit Anti kaspaz-3) eklenmiş, 30 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) okutularak analiz edilmiştir.

4.3.4. Antienflamatuar etkinin belirlenmesi

4.3.4.1. U87MG ve THP-1 ko-kültürde (insertsüz) akış sitometride interlekin-1 beta (IL-1β) seviyelerinin belirlenmesi

IL-1β seviyesinin belirlenmesi için PE Anti-Human IL-1β Antibody Kit Protokolü uygulanmıştır. U87MG ve THP-1 (insertsüz) ko-kültür modeli oluşturulmuştur. 24 kuyucuklu plakanın her bir kuyusuna 50.000 hücre/500 µL U87MG ekilerek 24 saat inkübasyona bırakılmış, süre sonunda eski medyumlar atılarak her bir kuyucuğa 100.000 hücre/500 µL THP-1 eklenerek U87MG ve THP-1 ko-kültürü oluşturulmuş, LPS (+) kuyucuklara 2 µL LPS eklenmiştir.

Ko-kültür hücre grupları MTX-211 ve diklofenak dietilamin ile 48 saat inkübe edilmiş ve bu süre sonunda U87MG hücreleri falkon tüplerde toplanmış, 1200 RPM'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan ve hücre pelleti 500 mL soğuk PBS ile yıkandıktan sonra kalan pellet 100 µL PBS ile resüspanse edilmiş ve 400 µL cytofix/cytoperm solüsyonu ilave edilerek 20 dk buzun içinde bekletilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda 1200 RPM'de 5 dk santrifüj edildikten sonra pellet 2 kez 500 µL perm wash ile yıkanmış, 100 µL PBS ile resüspanse edildikten sonra ependorf tüplere alınmış, 5 µL antibody eklenmiş, 20 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) okutularak analiz edilmiştir.

4.3.4.2. U87MG ve THP-1 ko-kültürde (insertsüz) akış sitometride interlekin -6, -8, -10 (IL-6, IL-8, IL-10) ve tümör nekroz faktörü α (TNFα) seviyelerinin belirlenmesi

IL-6, IL-10 ve TNFα seviyelerinin belirlenmesi için PE Anti-Human IL-6 Antibody Kit protokolü, PE Anti-Human IL-10 Antibody Kit protokolü, PE Anti-Human TNFα Antibody Kit protokolü ve IL-8 seviyesinin belirlenmesi için İnvitrogen IL-8 Antibody Kit protokolü uygulanmıştır. U87MG ve THP-1 (insertsüz) ko-kültür modeli oluşturulmuştur. 24 kuyucuklu plakanın her bir kuyusuna 50.000 hücre/500 µL U87MG ekilerek 24 saat inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda eski medyumlar

atılarak her bir kuyucuğa 100.000 hücre/500 µL THP-1 eklenmiş ve U87MG ve THP-1 ko-kültürü oluşturulmuş, LPS (+) kuyucuklara 2 µL LPS eklenmiştir.

Ko-kültür hücre grupları MTX-211 ve diklofenak dietilamin ile 48 saat inkübe edilmiş ve bu süre sonunda U87MG hücreleri falkon tüplerde toplanmış, 1200 RPM’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan ve hücre pelleti 500 µL soğuk PBS ile yıkandıktan sonra kalan pellet 400 µL PBS ile resüspanse edilerek 400 µL hücre çözeltisi 4 sitokin analizi için, her bir ependorfa 100 µL hücre çözeltisi alınmıştır. Her bir ependorfa sitokin antibody’si 5 µL eklenmiş, karanlıkta ve oda sıcaklığında 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) okutularak analiz edilmiştir.

4.3.5. Çizik deneyi ile U87MG ve THP-1, HUVEC ve THP-1 ko-kültürde (insertli) migrasyonun incelenmesi

Hücre kültüründe U87MG ve HUVEC hücrelerinin migrasyonunun değerlendirilebilmesi amacıyla çizik deneyi yapılmıştır.

24 kuyucuklu plakalarda U87MG ve THP-1 ve HUVEC ve THP-1 ko-kültür oluşturmak üzere her kuyucuğuna 100.000 hücre/mL U87MG ve 100.000 hücre/mL HUVEC hücreleri ekilmiş ve 24 saat süresince 37°C, %5 CO₂ ve %95 bağıl nemli inkübatörde kültüre edilmiştir.

Her bir inserte 250.000 hücre/200 µL THP-1 ekildikten 20 saat sonra 2 µL LPS ilave edilerek 6 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, her bir kuyucuk tabanının hücrelerle yeterli yoğunlukta kaplandığı mikroskopta kontrol edildikten sonra, test bileşiklerinin migrasyon üzerindeki etkilerini incelemek üzere steril 200 µL mikropipet ucu ile kuyucuğun çapı doğrultusunda çizik yapılmıştır (Ho vd., 2016; Muniandy vd., 2018).

Kuyucuklardaki besiyeri pipetle çekilerek atılmış, hücre artıklarının ortamdan uzaklaştırılması için 1X PBS ile yıkama yapılmıştır. Kuyucuklara MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonları uygulanmış, 0. saat fotoğrafları Leica DM 300 invert mikroskop ile çekilmiştir. LPS ile stimüle edilmiş THP-1 hücrelerinin bulunduğu insertler 24 kuyucuklu plakanın 12 kuyusuna yerleştirilerek %5 CO₂’li etüvde, 37°C ve %95 bağıl nemde 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir. MTX-211 ve diklofenak dietilamin konsantrasyonlarının uygulanmasından 24. ve 48. saatlerde de

fotoğraflar çekilmiştir. Hücrelerin göreceli migrasyonunu belirlemek için görüntülerde çizilen alanlar ölçülerek Leica LAS Görüntü Analizi programı ile analiz edilmiştir.

4.4. İstatistiksel Değerlendirmeler

İstatistiksel değerlendirmeler ve grafiklerin çizilmesi için GraphPad Prism 10 programı kullanılmıştır. Elde edilen veriler tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak analiz edilmiştir. Anlamlılık değerleri; $p > 0.05$ fark yok, $p < 0.05^*$ fark var, $p < 0.01^{**}$ anlamlı fark var, $p < 0.001^{***}$ önemli fark var ve $p < 0.0001^{****}$ çok önemli fark var olarak değerlendirilmiştir.



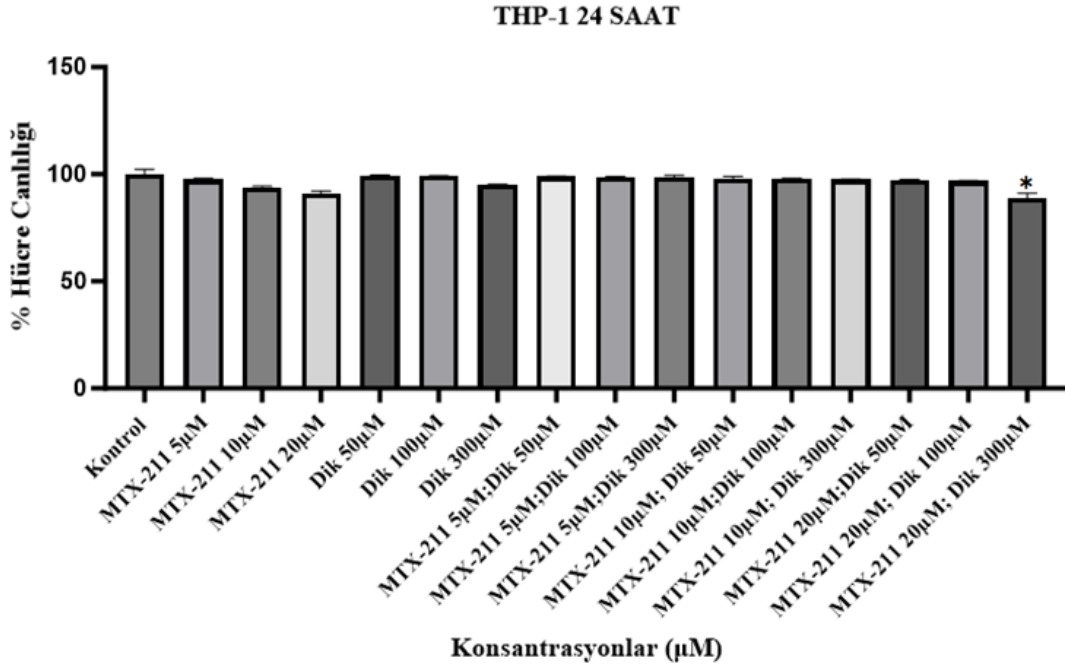
5. BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1. 2D Hücre Kültürü Çalışmalarının Değerlendirilmesi

5.1.1. MTX-211 ve diklofenak dietilaminin tekli ve kombinasyonlarının CellTiter-Blue ile THP-1 hücrelerinde 24. ve 48. saat sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi

THP-1 hücrelerinde MTX-211'in 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M konsantrasyonları ve diklofenak dietilaminin 50 μ M, 100 μ M ve 300 μ M konsantrasyonları tekli ve kombin uygulamalarının 24. ve 48. saatte % hücre canlılığı üzerine etkileri **Şekil 5.1** ve **Şekil 5.2**'de verilmiştir.

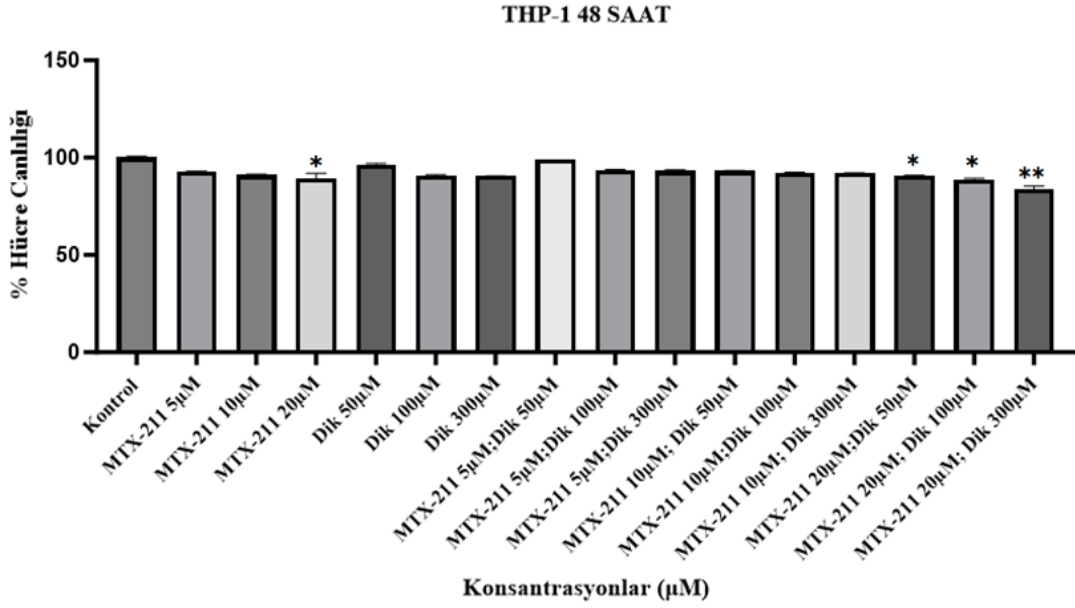
Şekil 5.1'de görüldüğü gibi MTX-211 ve diklofenak dietilamin konsantrasyonları uygulanan THP-1 hücrelerinde % hücre canlılık değerleri 24. saatte kontrole göre MTX-211'in 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M konsantrasyonları, diklofenak dietilaminin 50 μ M, 100 μ M ve 300 μ M konsantrasyonları, MTX-211 5 μ M + diklofenak dietilaminin 50 μ M, MTX-211 5 μ M + diklofenak dietilaminin 100 μ M, MTX-211 5 μ M + diklofenak dietilaminin 300 μ M, MTX-211 10 μ M + diklofenak dietilaminin 50 μ M, MTX-211 10 μ M + diklofenak dietilaminin 100 μ M, MTX-211 10 μ M + diklofenak dietilaminin 300 μ M, MTX-211 20 μ M + diklofenak dietilaminin 50 μ M, MTX-211 20 μ M + diklofenak dietilaminin 100 μ M, MTX-211 20 μ M + diklofenak dietilaminin 300 μ M konsantrasyonları sırasıyla %97.39, %93.84, %90.87, %99.41, %99.05, %94.82, %98.83, %98.61, %98.57, %97.94, %97.85, %97.60, %97.28, %96.78 ve %88.96 olarak hesaplanmıştır. Kontrole göre istatistiksel anlamlılık yalnızca MTX-211 20 μ M + diklofenak dietilaminin 300 μ M konsantrasyonunda belirlenmiş ($p < 0.05^*$), diğer tekli ve kombin bütün uygulamalarda hücrelerin canlılığının anlamlı azalmadığı ve önemli bir sitotoksik etki olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 5.1: THP-1 hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombin konsantrasyonlarının 24. saatte CellTiter-Blue testi ile hesaplanan % canlılık değerleri ve bu değerlerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, n=8, ortalama±standart sapma, p>0.05 fark yok, p<0.05* fark var).

Şekil 5.2’de görüldüğü gibi MTX-211 ve diklofenak dietilamin konsantrasyonları uygulanan THP-1 hücrelerinde % hücre canlılık değerleri 48. saatte kontrole göre MTX-211’in 5 µM, 10 µM ve 20 µM konsantrasyonları, diklofenak dietilaminin 50 µM, 100 µM ve 300 µM konsantrasyonları, MTX-211 5 µM + diklofenak dietilaminin 50 µM, MTX-211 5 µM + diklofenak dietilaminin 100 µM, MTX-211 5 µM + diklofenak dietilaminin 300 µM, MTX-211 10 µM + diklofenak dietilaminin 50 µM, MTX-211 10 µM + diklofenak dietilaminin 100 µM, MTX-211 10 µM + diklofenak dietilaminin 300 µM, MTX-211 20 µM + diklofenak dietilaminin 50 µM, MTX-211 20 µM + diklofenak dietilaminin 100 µM, MTX-211 20 µM + diklofenak dietilaminin 300 µM konsantrasyonları sırasıyla %92.95, %91.12, %88.81, %96.54, %90.85, %90.73, %99.08, %93.63, %93.24, %97.04, %92.10, %92.07, %90.70, %88.73 ve %84 olarak hesaplanmıştır. Kontrole göre istatistiksel anlamlılık MTX-211 20 µM, MTX-211 20 µM + diklofenak dietilaminin 50 µM, MTX-211 20

μM + diklofenak dietilaminin 100 μM uygulanan gruplarda $p<0.05^*$ ve MTX-211 20 μM + diklofenak dietilaminin 300 μM uygulanan grupta $p<0.01^{**}$ olarak belirlenmiştir. MTX-211 ve diklofenak dietilamin uygulanan diğer tekli ve kombin uygulamalarda kontrole göre hücrelerin canlılığının anlamlı azalmadığı ve önemli bir sitotoksik etki olmadığı hücre belirlenmiştir.



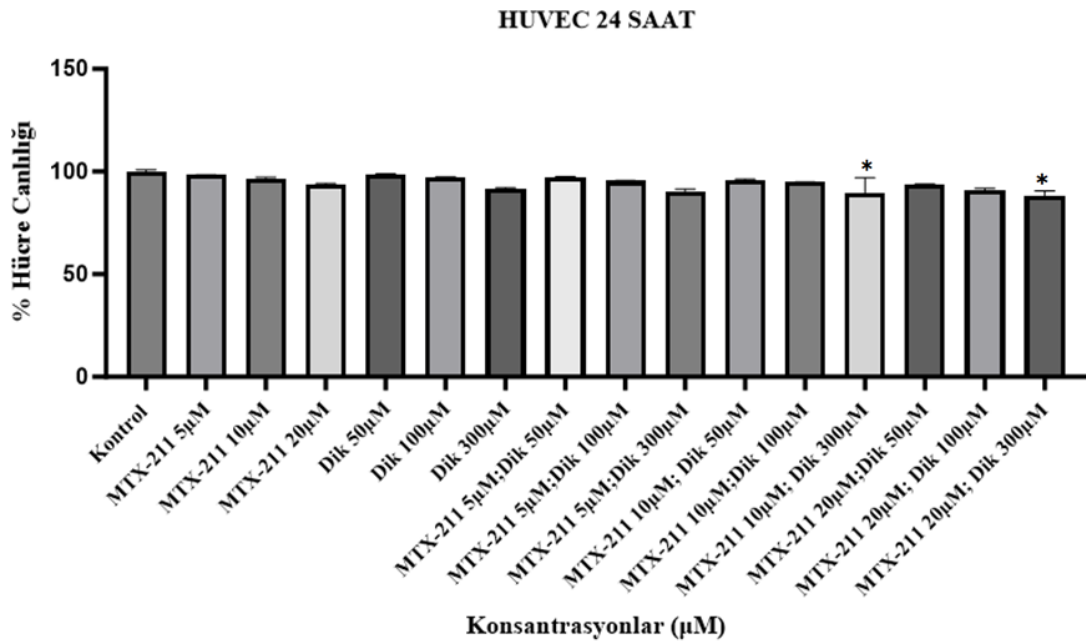
Şekil 5.2: THP-1 hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombin konsantrasyonlarının 48. saatte CellTiter-Blue testi ile hesaplanan % canlılık değerleri ve bu değerlerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, $n=8$, ortalama $\pm$ standart sapma, $p>0.05$ fark yok, $p<0.05^*$ fark var, $p<0.01^{**}$ anlamlı fark var).

5.1.2. MTX-211 ve diklofenak dietilaminin tekli ve kombinasyonlarının CellTiter-Blue ile HUVEC hücrelerinde 24. ve 48. saat sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi

HUVEC hücrelerinde MTX-211'in 5 μM , 10 μM ve 20 μM konsantrasyonları ve diklofenak dietilaminin 50 μM , 100 μM ve 300 μM konsantrasyonları tekli ve kombin uygulamalarının 24. ve 48. saatte % hücre canlılığı üzerine etkileri **Şekil 5.3** ve **Şekil 5.4**'de verilmiştir.

Şekil 5.3'de görüldüğü gibi MTX-211 ve diklofenak dietilamin konsantrasyonları uygulanan HUVEC hücrelerinde % hücre canlılık değerleri 24. saatte kontrole göre MTX-211'in 5 μM , 10 μM ve 20 μM konsantrasyonları, diklofenak

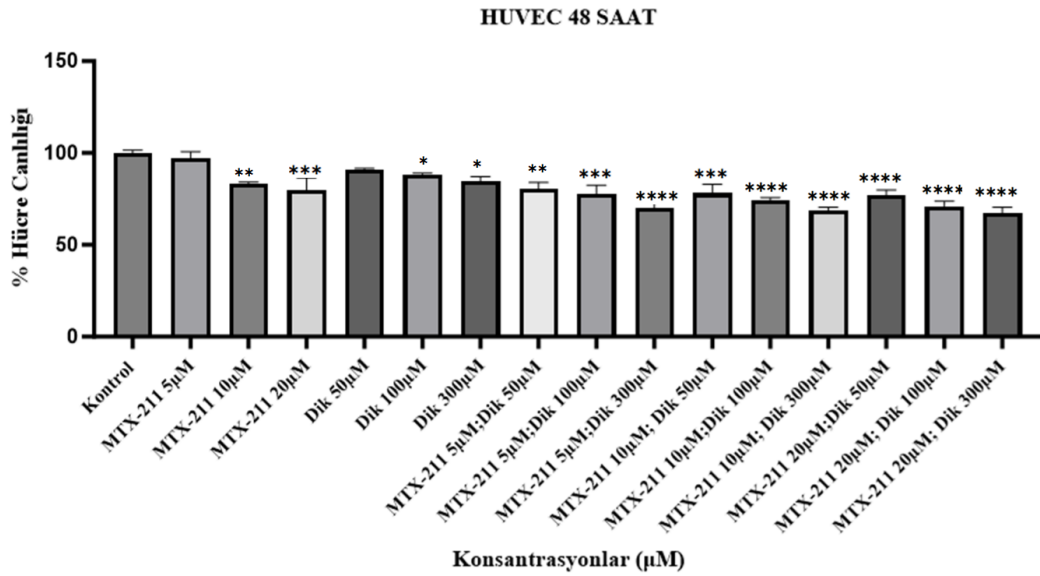
dietilaminin 50 μ M, 100 μ M ve 300 μ M konsantrasyonları, MTX-211 5 μ M + diklofenak dietilaminin 50 μ M, MTX-211 5 μ M + diklofenak dietilaminin 100 μ M, MTX-211 5 μ M + diklofenak dietilaminin 300 μ M, MTX-211 10 μ M + diklofenak dietilaminin 50 μ M, MTX-211 10 μ M + diklofenak dietilaminin 100 μ M, MTX-211 10 μ M + diklofenak dietilaminin 300 μ M, MTX-211 20 μ M + diklofenak dietilaminin 50 μ M, MTX-211 20 μ M + diklofenak dietilaminin 100 μ M, MTX-211 20 μ M + diklofenak dietilaminin 300 μ M konsantrasyonları sırasıyla %98.39, %96.32, %93.62, %98.62, %97.04, %91.59, %97.23, %95.52, %90.53, %95.74, %94.76, %89.61, %93.49, %90.86 ve %88.28 olarak hesaplanmıştır. Kontrole göre istatistiksel anlamlılık MTX-211 10 μ M + diklofenak dietilaminin 300 μ M ve MTX-211 20 μ M + diklofenak dietilaminin 300 μ M uygulanan gruplarda $p < 0.05^*$ olarak belirlenmiş ve diğer tekli ve kombin bütün uygulamalarda hücrelerin canlılığının anlamlı azalmadığı ve önemli bir sitotoksik etki olmadığı görülmüştür.



Şekil 5.3. HUVEC hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombin konsantrasyonlarının 24. saatte CellTiter-Blue testi ile hesaplanan % canlılık değerleri ve bu değerlerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, $n=8$, ortalama $\pm$ standart sapma, $p > 0.05$ fark yok, $p < 0.05^*$ fark var).

Şekil 5.4’de görüldüğü gibi MTX-211 ve diklofenak dietilamin konsantrasyonları uygulanan HUVEC hücrelerinde 48 saat inkübasyon sonunda kontrol

grubuna göre istatistiksel anlamlılık diklofenak dietilamin 100 μ M ve diklofenak dietilamin 300 μ M, uygulanan gruplar için istatistiksel anlamlılık $p < 0.05^*$ ve % hücre canlılık oranı kontrole göre sırasıyla %88.52, %85.01; MTX-211 10 μ M ve diklofenak dietilamin ve MTX-211 (50 μ M + 5 μ M) uygulanan gruplar için istatistiksel anlamlılık $p < 0.01^{**}$ ve sırasıyla kontrole göre % hücre canlılık oranları %83.02, %84.78; MTX-211 20 μ M, diklofenak dietilamin ve MTX-211 (100 μ M + 5 μ M) ve diklofenak dietilamin ve MTX-211 (50 μ M + 10 μ M) uygulanan gruplarda istatistiksel anlamlılık $p < 0.001^{***}$ ve sırasıyla kontrole göre % hücre canlılık oranları %79.63, %77.78 ve %75.30; diklofenak dietilamin ve MTX-211 (300 μ M + 5 μ M), diklofenak dietilamin ve MTX-211 (100 μ M + 10 μ M), diklofenak dietilamin ve MTX-211 (300 μ M + 10 μ M), diklofenak dietilamin ve MTX-211 (50 μ M + 20 μ M), diklofenak dietilamin ve MTX-211 (100 μ M + 20 μ M) ve diklofenak dietilamin ve MTX-211 (300 μ M + 20 μ M) uygulanan gruplarda istatistiksel anlamlılık $p < 0.0001^{****}$ ve sırasıyla kontrole göre % hücre canlılık oranları %71.58, %73.28, %68.60, %71.28, %68.63 ve %67.10 olarak belirlenmiştir. MTX-211 5 μ M ve diklofenak dietilamin 50 μ M uygulanan gruplarda ise hücrelerin canlılığının anlamlı azalmadığı ve önemli bir sitotoksik etki olmadığı belirlenmiştir.

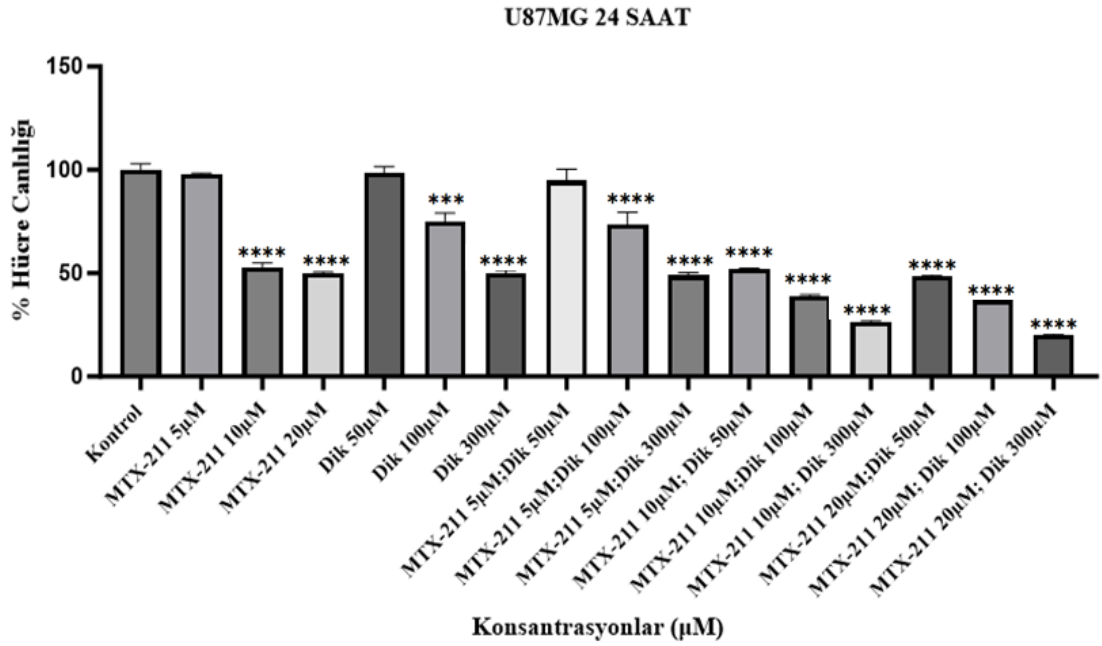


Şekil 5.4: HUVEC hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombin konsantrasyonlarının 48. saatte CellTiter-Blue testi ile hesaplanan % canlılık değerler ve bu değerlerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, $n=8$, ortalama $\pm$ standart sapma, $p>0.05$ fark yok, $p<0.05^*$ fark var, $p<0.01^{**}$ anlamlı fark var, $p<0.001^{***}$ önemli fark var, $p<0.0001^{****}$ çok önemli fark var).

5.1.3. MTX-211 ve diklofenak dietilaminin tekli ve kombinasyonlarının CellTiter-Blue ile U87MG hücrelerinde 24. ve 48. saat sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi

U87MG hücrelerinde MTX-211'in 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M konsantrasyonları ve diklofenak dietilaminin 50 μ M, 100 μ M ve 300 μ M konsantrasyonları tekli ve kombinasyonlarının 24. ve 48. saatte % hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 5.5 ve Şekil 5.6'da verilmiştir.

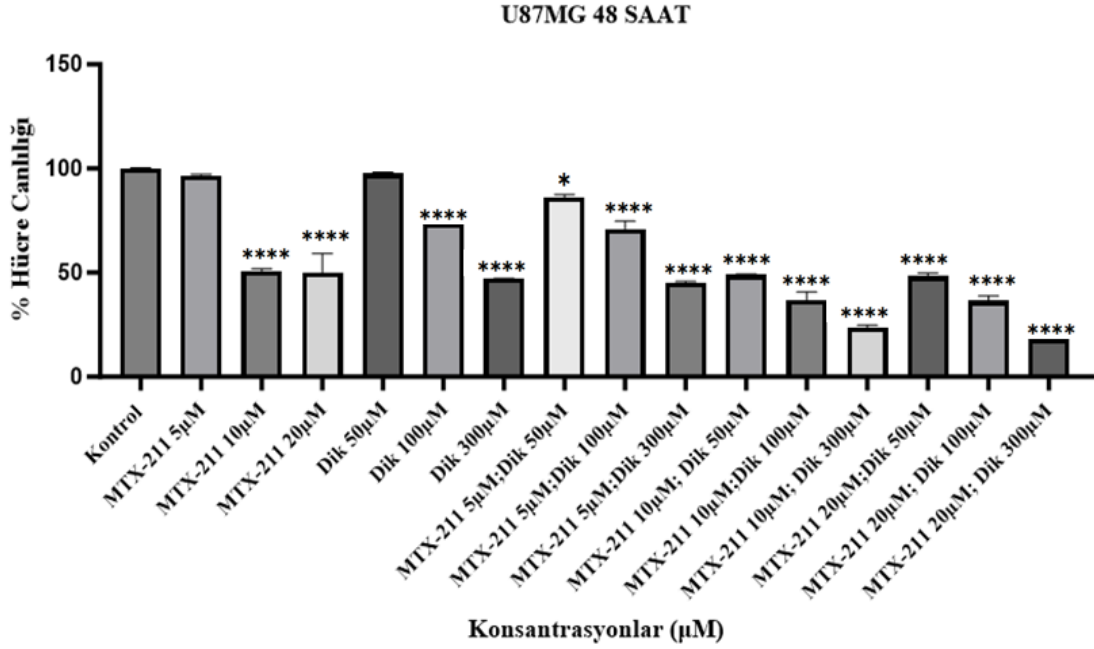
Şekil 5.5'de görüldüğü gibi MTX-211 ve diklofenak dietilamin konsantrasyonları uygulanan U87MG hücrelerinde % hücre canlılık değerleri 24. saatte kontrole göre MTX-211'in 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M konsantrasyonları, diklofenak dietilaminin 50 μ M, 100 μ M ve 300 μ M konsantrasyonları, MTX-211 5 μ M + diklofenak dietilaminin 50 μ M, MTX-211 5 μ M + diklofenak dietilaminin 100 μ M, MTX-211 5 μ M + diklofenak dietilaminin 300 μ M, MTX-211 10 μ M + diklofenak dietilaminin 50 μ M, MTX-211 10 μ M + diklofenak dietilaminin 100 μ M, MTX-211 10 μ M + diklofenak dietilaminin 300 μ M, MTX-211 20 μ M + diklofenak dietilaminin 50 μ M, MTX-211 20 μ M + diklofenak dietilaminin 100 μ M, MTX-211 20 μ M + diklofenak dietilaminin 300 μ M konsantrasyonları sırasıyla %98.12, %52.88, %49.80, %98.49, %75.05, %49.91, %94.72, %73.29, %48.90, %51.93, %38.58, %26.31, %48.74, %37.10 ve %20.35 olarak hesaplanmıştır. Kontrole göre MTX-211 5 μ M, diklofenak dietilaminin 50 μ M ve MTX-211 5 μ M + diklofenak dietilaminin 50 μ M uygulanan gruplarda istatistiksel anlamlılık bulunmamış, diklofenak dietilamin 100 μ M uygulanan grupta $p < 0.001^{***}$ ve diğer bütün gruplarda istatistiksel anlamlılık $p < 0.0001^{****}$ olarak belirlenmiştir. Şekil 5.5'de görüldüğü gibi, MTX-211 ve diklofenak dietilamin konsantrasyonlarının 24 saatlik inkübasyon süreleri sonunda U87MG hücre canlılığını %50'nin altına indirdiği görülmektedir.



Şekil 5.5: U87MG hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombin konsantrasyonlarının 24. saatte CellTiter-Blue testi ile hesaplanan % canlılık değerleri ve bu değerlerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, n=8, ortalama±standart sapma, $p>0.05$ fark yok, $p<0.001$ *** önemli fark var, $p<0.0001$ **** çok önemli fark var).

Şekil 5.6'da görüldüğü gibi MTX-211 ve diklofenak dietilamin konsantrasyonları uygulanan U87MG hücrelerinde % hücre canlılık değerleri 48. saatte kontrole göre MTX-211'in 5 µM, 10 µM ve 20 µM konsantrasyonları, diklofenak dietilaminin 50 µM, 100 µM ve 300 µM konsantrasyonları, MTX-211 5 µM + diklofenak dietilaminin 50 µM, MTX-211 5 µM + diklofenak dietilaminin 100 µM, MTX-211 5 µM + diklofenak dietilaminin 300 µM, MTX-211 10 µM + diklofenak dietilaminin 50 µM, MTX-211 10 µM + diklofenak dietilaminin 100 µM, MTX-211 10 µM + diklofenak dietilaminin 300 µM, MTX-211 20 µM + diklofenak dietilaminin 50 µM, MTX-211 20 µM + diklofenak dietilaminin 100 µM, MTX-211 20 µM + diklofenak dietilaminin 300 µM konsantrasyonları sırasıyla %96.73, %50.51, %49.62, %97.61, %73.52, %47.13, %85.80, %70.95, %44.97, %48.79, %36.84, %23.65, %48.21, %36.43 ve %18.25 olarak hesaplanmıştır. Kontrole göre MTX-211 5 µM ve diklofenak dietilaminin 50 µM uygulanan gruplarda istatistiksel anlamlılık bulunmamış, MTX-211 5 µM + diklofenak dietilaminin 50 µM uygulanan grupta istatistiksel anlamlılık $p<0.05$ * ve diğer bütün tekli ve kombin gruplarda istatistiksel anlamlılık

$p < 0.0001$ **** olarak belirlenmiştir. **Şekil 5.6'**da görüldüğü gibi, 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda MTX-211 ve diklofenak dietilamin konsantrasyonlarının U87MG hücre canlılığını %50'nin altına indirdiği tespit edilmiştir.



Şekil 5.6: U87MG hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombin konsantrasyonlarının 48. saatte CellTiter-Blue testi ile hesaplanan % canlılık değerleri ve bu değerlerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, n=8, ortalama±standart sapma, $p > 0.05$ fark yok, $p < 0.05$ * fark var, $p < 0.0001$ **** çok önemli fark var).

5.1.4. MTX-211 (5 µM, 10 µM, 20 µM) ve diklofenak dietilaminin (50 µM, 100 µM, 300 µM) kombinasyonlarının U87MG, HUVEC ve THP-1 hücreleri üzerinde sinerjistik sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi

MTX-211 (5 µM, 10 µM, 20 µM) ve diklofenak dietilaminin (50 µM, 100 µM ve 300 µM) U87MG, HUVEC ve THP-1 hücreleri üzerinde antagonist/sinerjistik etkileşimleri CDI formülüne göre, CellTiter-Blue testi absorbans sonuçlarının % hücre canlılık değerlerine dönüştürülerek hesaplanmış ve değerlendirilmiştir. Buna göre;

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

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

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).

İlaç etkileşim katsayısı (CDI) hesaplama

İlaç etkileşiminin sinerjistik, additif veya antagonist olduğu bilgisini veren CDI, ilaç kombinasyonlarının etkilerini analiz etmek için kullanılmakta ve şu şekilde hesaplanmaktadır;

$$CDI = XY/(X \times Y)$$

CDI, XY kombin grupların kontrol grubuna oranının X veya Y tek ajan grubunun kontrol grubuna oranı olup $CDI < 1$ sinerjistik, $CDI = 1$ additif, $CDI > 1$ antagonist ve $CDI < 0.7$ ise ilaçların önemli derecede sinerjistik olduğunu göstermektedir (Lopez-Acevedo vd., 2014; Zhao vd., 2014; Hao vd., 2008).

MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının THP-1 hücreleri üzerinde antagonist/sinerjist etkileşimleri

CellTiter-Blue sonuçları ile elde edilen % hücre canlılık değerleri incelendiğinde, THP-1 hücrelerinde MTX-211 ve diklofenak dietilamin kombinasyonlarında, 24 saatte bütün kombin uygulamalarda $CDI = 1$ olarak hesaplanmış ve additif etki meydana getirdikleri belirlenmiştir (Tablo 5.1).

Tablo 5.1. THP-1 hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının 24. saatteki % hücre canlılık oranları (Ortalama $\pm$ Standart sapma) ve CDI değerleri. Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı

Konsantrasyon	% Canlılık	CDI
Diklofenak dietilamin 50 μ M –MTX 211 5 μ M	98,83 $\pm$ 1.15	1,02
Diklofenak dietilamin 100 μ M –MTX 211 5 μ M	98,61 $\pm$ 1.29	1,02
Diklofenak dietilamin 300 μ M –MTX 211 5 μ M	97,58 $\pm$ 1.22	1,06
Diklofenak dietilamin 50 μ M –MTX 211 10 μ M	97,95 $\pm$ 1.26	1,04
Diklofenak dietilamin 100 μ M –MTX 211 10 μ M	97,85 $\pm$ 1.16	1,05
Diklofenak dietilamin 300 μ M –MTX 211 10 μ M	97,60 $\pm$ 1.30	1,09

Tablo 5.1. (Devam) THP-1 hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının 24. saatteki % hücre canlılık oranları (Ortalama $\pm$ Standart sapma) ve CDI değerleri. Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı

Konsantrasyon	% Canlılık	CDI
Diklofenak dietilamin 50 μ M –MTX 211 20 μ M	97,28 $\pm$ 1.26	1,07
Diklofenak dietilamin 100 μ M –MTX 211 20 μ M	96,78 $\pm$ 1.23	1,07
Diklofenak dietilamin 300 μ M –MTX 211 20 μ M	88,97 $\pm$ 1.03	1,03

CellTiter-Blue sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre THP-1 hücrelerinde 48 saatte diklofenak dietilamin ve MTX-211 (50 μ M + 20 μ M), diklofenak dietilamin ve MTX-211 (100 μ M + 20 μ M), diklofenak dietilamin ve MTX-211 (300 μ M + 20 μ M) kombine uygulamaları sonucunda CDI = 1 olarak hesaplanarak additif etki meydana getirdikleri ve diğer bütün kombin uygulamalarda CDI > 1 olarak hesaplanarak antagonist etkili oldukları belirlenmiştir (Tablo 5.2).

Tablo 5.2. THP-1 hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının 48. saatteki % hücre canlılık oranları (Ortalama $\pm$ Standart sapma) ve CDI değerleri. Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı

Konsantrasyon	% Canlılık	CDI
Diklofenak dietilamin 50 μ M – MTX-211 5 μ M	99,08 $\pm$ 0.92	1,10
Diklofenak dietilamin 100 μ M – MTX-211 5 μ M	93,63 $\pm$ 1.78	1,11
Diklofenak dietilamin 300 μ M – MTX-211 5 μ M	93,24 $\pm$ 0.78	1,11
Diklofenak dietilamin 50 μ M – MTX-211 10 μ M	97,04 $\pm$ 1.26	1,10
Diklofenak dietilamin 100 μ M – MTX-211 10 μ M	92,10 $\pm$ 0.74	1,11
Diklofenak dietilamin 300 μ M – MTX-211 10 μ M	92,08 $\pm$ 1.13	1,11
Diklofenak dietilamin 50 μ M – MTX-211 20 μ M	90,71 $\pm$ 1.15	1,02
Diklofenak dietilamin 100 μ M – MTX-211 20 μ M	88,73 $\pm$ 0.37	1,08
Diklofenak dietilamin 300 μ M – MTX-211 20 μ M	84,00 $\pm$ 1.49	1,04

MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının HUVEC hücreleri üzerinde antagonist/sinerjistik etkileşimleri

CellTiter-Blue sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre HUVEC hücrelerinde MTX-211 ve diklofenak dietilamin kombine uygulamaları sonucunda, 24 saatte bütün kombin uygulamalarda CDI = 1 olarak hesaplanmış ve additif etki meydana getirdikleri belirlenmiştir (Tablo 5.3).

Tablo 5.3. HUVEC hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının 24. saatteki % hücre canlılık oranları (Ortalama $\pm$ Standart sapma) ve CDI değerleri. Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı

Konsantrasyon	% Canlılık	CDI
Diklofenak dietilamin 50 μ M – MTX-211 5 μ M	97,23 $\pm$ 4.24	1,00
Diklofenak dietilamin 100 μ M – MTX-211 5 μ M	95,53 $\pm$ 3.32	1,00
Diklofenak dietilamin 300 μ M – MTX-211 5 μ M	90,54 $\pm$ 4.36	1,00
Diklofenak dietilamin 50 μ M – MTX-211 10 μ M	95,75 $\pm$ 2.63	1,00
Diklofenak dietilamin 100 μ M – MTX-211 10 μ M	94,77 $\pm$ 1.27	1,01
Diklofenak dietilamin 300 μ M – MTX-211 10 μ M	89,62 $\pm$ 2.82	1,02
Diklofenak dietilamin 50 μ M – MTX-211 20 μ M	93,49 $\pm$ 2.21	1,01
Diklofenak dietilamin 100 μ M – MTX-211 20 μ M	90,87 $\pm$ 2.26	1,00
Diklofenak dietilamin 300 μ M – MTX-211 20 μ M	88,28 $\pm$ 3.58	1,03

CellTiter-Blue sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre HUVEC hücrelerinde MTX-211 ve diklofenak dietilamin kombine uygulamaları sonucunda, 48 saatte bütün kombin uygulamalarda CDI < 1 olarak hesaplanmış ve sinerjistik etki meydana meydana getirdikleri belirlenmiştir (Tablo 5.4).

Tablo 5.4. HUVEC hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının 48. saatteki % hücre canlılık oranları (Ortalama $\pm$ Standart sapma) ve CDI değerleri. Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı

Konsantrasyon	% Canlılık	CDI
Diklofenak dietilamin 50 μ M – MTX-211 5 μ M	84,78 $\pm$ 2.11	0,96
Diklofenak dietilamin 100 μ M –MTX 211 5 μ M	77,78 $\pm$ 2.61	0,90
Diklofenak dietilamin 300 μ M –MTX 211 5 μ M	71,58 $\pm$ 2.72	0,86
Diklofenak dietilamin 50 μ M –MTX 211 10 μ M	75,30 $\pm$ 2.68	0,99
Diklofenak dietilamin 100 μ M –MTX 211 10 μ M	73,28 $\pm$ 1.32	0,99
Diklofenak dietilamin 300 μ M –MTX 211 10 μ M	68,60 $\pm$ 0.94	0,97
Diklofenak dietilamin 50 μ M –MTX 211 20 μ M	71,28 $\pm$ 2.18	0,98
Diklofenak dietilamin 100 μ M –MTX 211 20 μ M	68,63 $\pm$ 2.24	0,97
Diklofenak dietilamin 300 μ M –MTX 211 20 μ M	67,10 $\pm$ 2.07	0,99

MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının U87MG hücreleri üzerinde antagonist/sinerjistik etkileşimleri

CellTiter-Blue sonuçları ile elde edilen % hücre canlılık değerleri incelendiğinde, U87MG hücrelerinde MTX-211 ve diklofenak dietilamin

kombinasyonlarının, 24 saatte bütün kombin uygulamalarda CDI < 1 olarak hesaplanmış ve sinerjistik etki meydana meydana getirdikleri belirlenmiştir (Tablo 5.5).

Tablo 5.5. U87MG hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının 24. saatteki % hücre canlılık oranları (Ortalama $\pm$ Standart sapma) ve CDI değerleri. Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı

Konsantrasyon	% Canlılık	CDI
Diklofenak dietilamin 50 μ M – MTX-211 5 μ M	94,72 $\pm$ 3.92	0,98
Diklofenak dietilamin 100 μ M – MTX-211 5 μ M	73,29 $\pm$ 4.43	0,99
Diklofenak dietilamin 300 μ M – MTX-211 5 μ M	48,90 $\pm$ 4.82	0,99
Diklofenak dietilamin 50 μ M – MTX-211 10 μ M	51,93 $\pm$ 4.58	0,99
Diklofenak dietilamin 100 μ M – MTX-211 10 μ M	38,58 $\pm$ 3.07	0,97
Diklofenak dietilamin 300 μ M – MTX-211 10 μ M	26,31 $\pm$ 4.45	0,99
Diklofenak dietilamin 50 μ M – MTX-211 20 μ M	48,74 $\pm$ 4.05	0,99
Diklofenak dietilamin 100 μ M – MTX-211 20 μ M	37,10 $\pm$ 4.12	0,99
Diklofenak dietilamin 300 μ M – MTX-211 20 μ M	20,35 $\pm$ 3.04	0,81

CellTiter-Blue sonuçlarından elde edilen % hücre canlılık değerlerine göre U87MG hücrelerinde MTX-211 ve diklofenak dietilamin kombine uygulamaları sonucunda, 48 saatte bütün kombin uygulamalarda CDI < 1 olarak hesaplanmış ve sinerjistik etki meydana getirdikleri belirlenmiştir (Tablo 5.6).

Tablo 5.6. U87MG hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının 48. saatteki % hücre canlılık oranları (Ortalama $\pm$ Standart sapma) ve CDI değerleri. Kontrol grubu %100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı

Konsantrasyon	% Canlılık	CDI
Diklofenak dietilamin 50 μ M – MTX-211 5 μ M	85,81 $\pm$ 0.89	0.90
Diklofenak dietilamin 100 μ M – MTX-211 5 μ M	70,95 $\pm$ 2.01	0.99
Diklofenak dietilamin 300 μ M – MTX-211 5 μ M	44,98 $\pm$ 0.54	0.98
Diklofenak dietilamin 50 μ M – MTX-211 10 μ M	48,79 $\pm$ 0.22	0.98
Diklofenak dietilamin 100 μ M – MTX-211 10 μ M	36,84 $\pm$ 1.77	0.99
Diklofenak dietilamin 300 μ M – MTX-211 10 μ M	23,65 $\pm$ 0.73	0.99
Diklofenak dietilamin 50 μ M – MTX-211 20 μ M	48,22 $\pm$ 1.02	0.99
Diklofenak dietilamin 100 μ M – MTX-211 20 μ M	36,43 $\pm$ 1.48	0.99
Diklofenak dietilamin 300 μ M – MTX-211 20 μ M	18,25 $\pm$ 0.92	0.78

Bu tez çalışması ile MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının U87MG, HUVEC ve THP-1 hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri CellTiter-Blue testi ile araştırılmış, antiproliferatif etkinlikleri değerlendirilmeye çalışılmış ve sinerjist/antagonist etkinlikleri arasındaki ilişki CDI değerleri hesaplanarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda U87MG, THP-1 ve HUVEC hücre canlılığını belirlemek için 5-20 μ M MTX-211 ve 50-300 μ M diklofenak dietilamin konsantrasyon aralıkları seçilmiş ve hücre canlılığının kontrole oranla artan konsantrasyonlarda azaldığı belirlenmiştir. MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombin uygulamaların U87MG hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucunda hücre canlılığını %50'nin altına düşürerek güçlü sitotoksik etki meydana getirdiği, HUVEC hücrelerinde zaman ve konsantrasyona bağlı sitotoksik etki oluşturduğu ve THP-1 hücrelerinde kayda değer bir sitotoksik etki gözlenmediği, THP-1 ve HUVEC hücrelerinde canlılığın %50'nin altına düşmediği belirlenmiştir.

Kapsamlı literatür taramalarımızda U87MG hücrelerinde MTX-211 ve diklofenak dietilaminin çalışıldığı literatüre rastlanılmamıştır. MTX-211, HCT-116 tümörlü hayvanlarda, 50 mg/kg MTX-211 ile yapılan tek bir oral doz uygulaması ile hem *in vivo*, hem de BRAF^{MT} RKO ve KRAS^{MT} HCT-116 kolorektal hücrelerde yapılan *in vitro* çalışmaların western blot analizlerinde EGFR ve PI3Kinaz'ı inhibe eden dual etkili bir inhibitör olduğu kanıtlanmış (Maust, 2018) ve Abecunas ve arkadaşları tarafından da NF1^{LoF} melanomada *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda Ras aktivatörü SYK Kinaz'ı (IC50: 6.02 nM) güçlü bir şekilde inhibe ettiği belirlenmiştir (Abecunas vd., 2022).

PIK3R3 siRNA'nın U373MG glioblastoma hücrelerine transfeke edildikten sonra erlotinib ile kombinasyonunun U373MG hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, PIK3R3 siRNA'nın U373MG hücrelerine transfeke edildikten sonra PIK3R3 mRNA ekspresyonunun zamana bağlı belirgin bir şekilde bastırıldığı, transfeksiyondan 24, 48 ve 72 saat sonra, PIK3R3 mRNA'nın nispi ekspresyon seviyelerinin sırasıyla %82.10, %72.44 ve %61.02 olduğunu bildirilmiştir. Erlotinib ile kombine olduğunda erlotinibin 24 ve 48 saatlik IC50 değerlerini düşürdüğünü, PIK3R3 siRNA, hücre hayatta kalma oranını 24 ve 48 saat sonra

(sırasıyla %84.61 ve %79.12) önemli ölçüde azalttığını, PIK3R3 siRNA ile kombinasyon halinde erlotinib, tek başına erlotinib veya tek başına PIK3R3 siRNA'ya göre hücre hayatta kalma oranını daha fazla azalttığını ($p<0,05^*$), PIK3R3 siRNA, erlotinibin IC50 değerini sırasıyla 24 ve 48 saat sonra 44.48 μM 'dan 31.84 μM 'a ve 25.86 μM 'dan 18.38 μM 'a belirgin şekilde düşürdüğünü, U373MG glioblastoma hücre hattında PIK3R3 siRNA ve EGFR inhibitörü erlotinibin hücre canlılığı ve apoptoz üzerinde sinerjistik etki meydana getirdiğini bildirmişlerdir (Amini vd., 2021).

GBM hastalarında faz II klinik denemelerinde olan yeni bir pan ERBB inhibitörü PF-00299804 (dakomitinib), tek başına veya PI3K/mTOR ikili inhibitörü PF-05212384 ile kombinasyon halinde yerleşik ve hastadan türetilmiş birincil GBM hatlarından oluşan bir panelde, hem PARP ekspresyonu hem de hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Maddeler uygulandıktan sonra 96 saat inkübasyona bırakılmış, PI3Kinaz/mTOR inhibitörü PF-05212384 ve dakomitinib kombinasyonunun hücre canlılığında yarattığı azalma, dakomitinib monoterapisinden daha fazla bulunmuştur (Zhu vd., 2014).

Prasad ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada PI3K/mTOR inhibitörü XL765'in klinik öncesi potansiyeli hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak değerlendirildiğinde, XL765 ve erlotinibin kombin etkileri, monoterapilerine oranla ksenograft nude farelerde sitotoksiste üzerinde ilave etkiler göstermiştir (Prasad vd., 2009).

Leidgens ve arkadaşları tarafından HTZ-349, U87MG ve A172 glioma hücrelerinde yapılan *in vitro* bir çalışmada 96 saat boyunca asetilsalisilik asit (ASA) (0,05–0,2 mM), diklofenak (0,05–0,2 mM) ve ibuprofen (0,5–2,0 mM) uygulanmış, IC50 değerleri ibuprofen için 1 mM ve diklofenak için 0,1 mM bulunmuşken COX-1 ve COX-2 afinitesi eşit derecede olan ASA'nın hücre proliferasyonu üzerinde anlamlı bir etkisi gözlemlenmemiştir (Leidgens vd., 2015). Selektif COX-2 inhibitörü selekoksib ve nonselektif COX inhibitörleri olan sulindak, flurbiprofen ve indometazin A172 ve LN229 glioblastoma hücre hatlarına uygulanmış, özellikle selektif COX-2 inhibitörü olan selekoksib ile çok güçlü antiproliferatif etki meydana geldiği belirlenmiştir (Kardosh vd., 2004). Bernardi ve arkadaşları tarafından indometasin, asetaminofen, sulindak sülfür ve NS-398'in C6 sıçan glioma hücre canlılığı MTT ile test edilmiş, zaman ve konsantrasyona bağlı olarak hücre çoğalması inhibe edilmiştir (Bernardi vd.,

2006). NSAİ türevlerinin insan dışı glioblastoma hücrelerinde naproksen, flurbiprofen, ibuprofen gibi antienflamatuar ilaçların sitotoksik potansiyelinin değerlendirildiği başka bir çalışmada, U87MG hücre hattında konsantrasyona bağlı sitotoksik etkiler sergiledikleri, tümör baskılayıcı PTEN'in upregülasyonuna ve AKT1, RAF1 ve EGFR gibi bazı onkogenlerin downregülasyonuna neden oldukları bildirilmiştir (Özdemir vd., 2020). NSAİ'nin gliomalarda farmakolojik müdahale için klinik olarak önemli olabileceği açıktır.

Diklofenak dietilamin ile U87MG hücrelerinde bir literatüre rastlanılmamıştır ancak COX-2 afinitesi yüksek olan diklofenak sodyumun U87MG hücre proliferasyonunu %50'nin altına düşürdüğü çalışmalar mevcuttur (Sareddy vd., 2013).

Tirozin kinaz inhibitörü famitinib ve EGFR inhibitörü HS-10296'nın HUVEC proliferasyonu ve migrasyonu üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada, tek başına famitinib HUVEC proliferasyonunu 9,9 nM'lik bir IC50 değeriyle önemli ölçüde inhibe ederken, 1 µM veya 2 µM HS-10296 varlığında, inhibisyon aktivitesinin IC50 değerlerinin sırasıyla 3,2 ve 1,7 nM'a düştüğü ve PI3Kinaz ve EGFR inhibitörünün kombinasyonu ile sinerjik etki meydana geldiği bildirilmiştir (Zhang vd., 2021). MTX-211'in sitotoksik etkilerinin mesane kanseri hücrelerinde (5637, EJ ve UMUC3) ve normal epitel hücrelerinde (SV-HUC-1 ve HUVEC) incelendiği bir çalışmada, MTX-211'in kanser hücre canlılığını zaman ve konsantrasyona bağlı güçlü bir şekilde inhibe ettiği (5637 48 saat IC50:1.478 µM, 72 saat IC50:1.075 µM; EJ 48 saat IC50:2.483 µM, 72 saat IC50:1.514 µM; UMUC3 48 saat IC50:3.205 µM, 72 saat IC50:2.189 µM) ve normal epitel hücre duyarlılığının (SV-HUC-1 48 saat IC50:7.657 µM, 72 saat IC50:5.561 µM; HUVEC 48 saat IC50:19.360 µM, 72 saat IC50:7.840 µM) kanser hücrelerinden daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir (Hu vd., 2023).

Diklofenak 0.1-1000 µM konsantrasyonlarda HUVEC hücre proliferasyonunu artan doza bağımlı olarak inhibe ederken (Isenberg vd., 2007), 0.1 ve 0.2 mM konsantrasyonda 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda THP-1 hücrelerinde proliferasyonun inhibisyonu üzerindeki etkisi ile ilgili kontrole göre istatistiksel anlamlılık bildirilmemiştir (Renner vd., 2018). MTX-211 veya EGFR ve PI3Kinaz inhibitörlerinin THP-1 hücrelerinde sitotoksik etkilerini inceleyen bir araştırma bulunmamıştır. 0-1000 nM konsantrasyonda uygulanan proteozom inhibitörü bortezomibin antiproliferatif etkisi THP-1 hücrelerinde araştırılmış ve hücre

proliferasyonunun kontrole göre %80'in üzerinde olduğu belirlenmiştir (Choy vd., 2015). MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının kanser hücre canlılığını zaman ve konsantrasyona bağlı güçlü bir şekilde inhibe ettiği, HUVEC hücre duyarlılığının kanser hücrelerinden düşük olması ve THP-1 monosit hücrelerinde kayda değer bir sitotoksik etki meydana getirmemiş olmaları literürü desteklemektedir.

EGFR ve PI3Kinaz'ı hedefleyen monoterapilerde meydana gelen direnci kırmak için son derece uygun bir aday olan dual etkili MTX-211, tümör mikroçevresi ve kronik inflamasyonla ilişkili yüksek PGE2 seviyelerini (Nakanishi vd., 2013; Dubois, 2014) düşüren diklofenak dietilamin ile ideal bir kombinasyon olabileceği varsayımıyla U87MG, HUVEC ve THP-1 hücrelerindeki etkinlikleri incelenmiş ve U87MG hücre hattında MTX-211 ve diklofenak dietilaminin uygulanan bütün ikili kombinasyonlarda 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda sinerjistik etki ($CDI < 1$), THP-1 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon ile elde edilen veriler ışığında MTX-211 ve diklofenak dietilaminin bütün ikili kombinasyonlarının additif etki ($CD = 1$), 48 saatlik inkübasyonları sonucunda ise diklofenak dietilamin ve MTX-211 ($50 \mu M + 20 \mu M$), diklofenak dietilamin ve MTX-211 ($100 \mu M + 20 \mu M$), diklofenak dietilamin ve MTX-211 ($300 \mu M + 20 \mu M$) kombine uygulamaları sonucunda additif etki ($CDI = 1$) ve diğer bütün ikili kombinasyonlarda antagonist etki ($CDI > 1$), HUVEC hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon ile elde edilen veriler ışığında MTX-211 ve diklofenak dietilaminin bütün ikili kombine uygulamaları sonucunda additif etki ($CD = 1$) ve 48 saatlik inkübasyonları sonucunda sinerjistik etki ($CDI < 1$) meydana getirdiği belirlenmiştir.

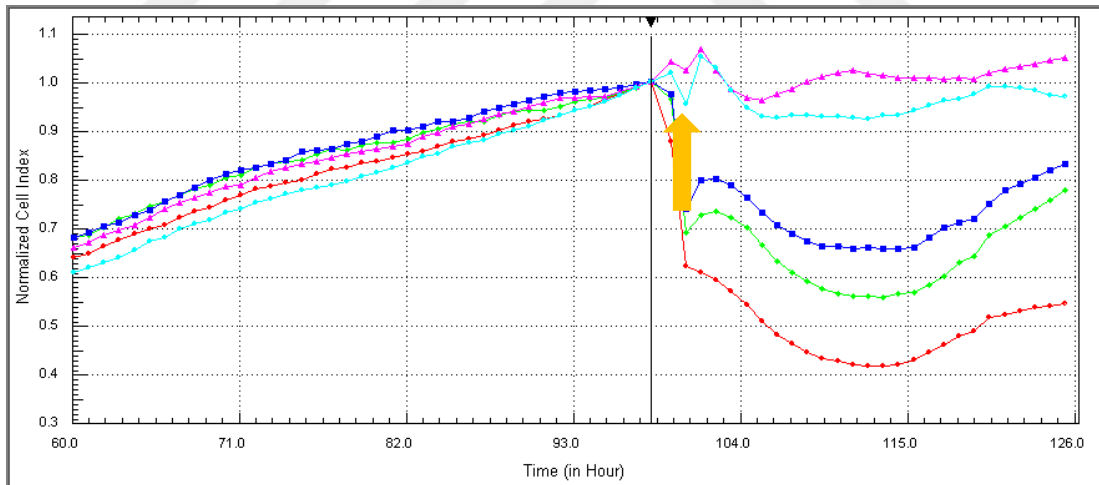
Kanserde MEK inhibisyonuna karşı gelişen dirence, HER ailesi üyelerinin yeniden aktivasyonu ve kısmen de PI3K/AKT yolunun aktivasyonuna yol açan EGFR üzerinde ERK aracılı inhibitör geri besleme fosforilasyonunun kaybının neden olduğu gösterilmiştir (Li vd., 2008b; Turke vd., 2012a). Bu durum MTX-211 ile EGFR ve PI3K'nın eş zamanlı inhibe edilmesinden dolayı, ERK yolu müdahalesinde dirence yol açan çoklu kaçış yollarının hedef alınacağı varsayımıyla, MTX-211'in ERK yolunu hedefleyen ajanlarla kombinasyon için ideal bir aday olduğu düşünülmüş, bir MEK inhibitörü olan trametinib ile kombinasyonu KRAS^{MT} ve BRAF^{MT} hücrelerde denenmiş ve HER3 ekspresyonunu etkin bir şekilde bastırdığı belirlenmiştir. MTX-211, UM59 pankreatik duktal adenoma modelinde, MEK inhibisyonuna yanıt olarak ortaya çıkan

pHER3 ekspresyonunun upregülasyonunu da kombinasyon halinde uygulandığında ortadan kaldırmıştır. MTX-211 ile tedavi edilen HCT-116 ve RKO hücreleri ve bir dizi MEK veya ERK inhibitörü ile yürütülen klonojenik deneylerde MTX-211'in ERK yolu müdahalesi ile kombinasyon halinde sinerjik olduğu belirlenmiştir (Maust, 2018).

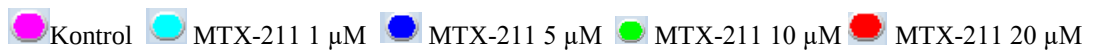
5.1.5. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) ile U87MG hücrelerinde MTX-211'in antiproliferatif etkilerinin değerlendirilmesi

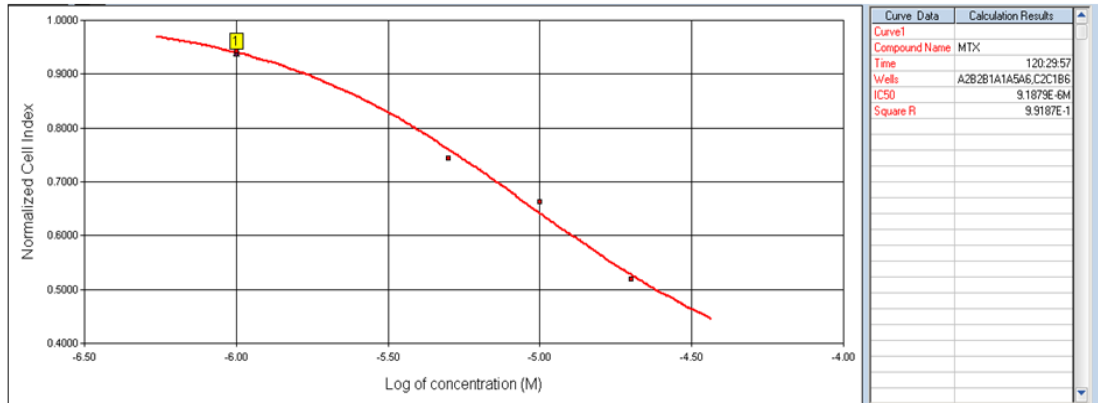
MTX-211'in U87MG hücre hattında, hücre proliferasyonu ve migrasyonu üzerindeki etkileri RTCA DP ile gerçek zamanlı olarak kayıt altına alınmıştır.

Hücre proliferasyon analizi için U87MG hücrelerinin ekilmiş olduğu E-plaka kuyucuklarına, CellTiter-Blue testi ile belirlediğimiz MTX-211 konsantrasyonları (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) 100 μ L medyum içinde uygulanmış, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda cihaz durdurularak analiz aşamasına geçilmiştir. RTCA DP ile elde edilen hücre indeks değerlerine göre MTX-211'in U87MG hücreleri için IC50 değeri RTCA DP Software 1.2.1 programı kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 5.7, Şekil 5.8).



Şekil 5.7: MTX-211 konsantrasyonlarının 48 saatlik U87MG hücre proliferasyon eğrileri (sarı ok: konsantrasyon uygulaması, $n=6$, ortalama $\pm$ standart sapma)





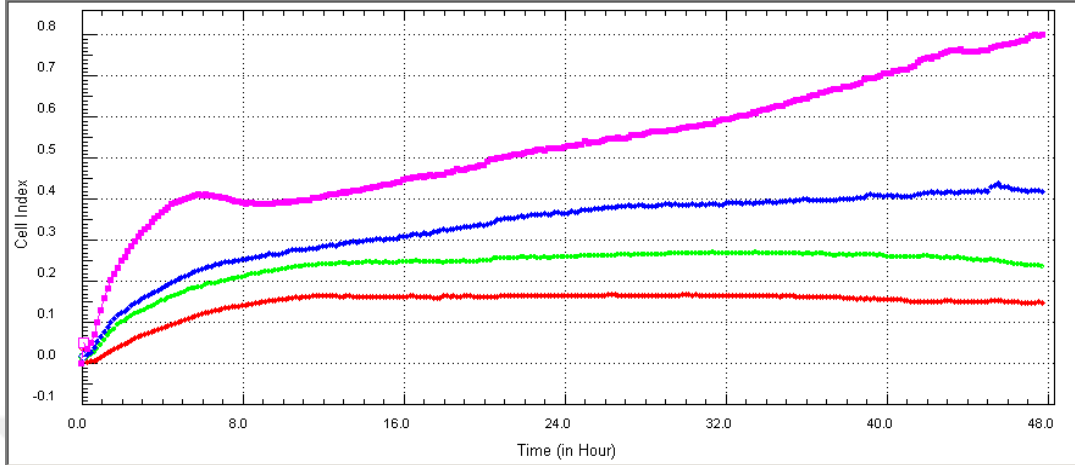
Şekil 5.8: RTCA DP sisteminde U87MG hücrelerinde MTX-211'in 48. saatteki hücre indeks değerlerine göre IC50 değerinin hesaplandığı konsantrasyon-hücre indeksi eğrisi (IC50: 9.187 μ M)

Şekilde (Şekil 5.7) MTX-211 (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) konsantrasyonlarının U87MG hücrelerinde antiproliferatif etkileri gerçek zamanlı (10 dakikalık veri alınmıştır) olarak görülmektedir. RTCA DP Software 1.2.1 programı kullanılarak konsantrasyon-hücre indeksi eğrileri (Şekil 5.8) sonucu hesaplanan IC50 değeri gösterilmiştir. MTX-211 in U87MG hücrelerinde 48. saatte IC50 değeri 9.187 μ M olarak hesaplanmıştır. Artan MTX-211 konsantrasyonları ile paralel olarak antiproliferatif etkinin de arttığı belirlenmiştir.

U87MG glioblastoma kanser hücrelerinin, gerçek zamanlı hücre analiz sistemine uygun bir hücre hattı olduğu ve E-plakalara ekildikten sonraki 24 saat içinde gerekli cell indeks değerlerine ulaştığı daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Dikmen vd., 2017; Gökhaner, 2018).

Çok sayıda kinazın yer aldığı bir panelin taranmasıyla EGFR ve PI3K'ı inhibe eden dual etkili bir inhibitör olduğu belirlenen MTX-211, ilk olarak KRAS^{MT} ve BRAF^{MT} kolorektal ve pankreas kanserlerinde EGFR otofosforilasyonunu güçlü bir şekilde bloke etmesi ile son derece etkin bir antiproliferatif aktiviteye (sırasıyla IC50:1.11 μ M ve IC50:5 μ M) sahip olduğu ve yine aynı çalışmada lösemi (IC50:1.17 μ M), melanoma (IC50:1.29 μ M), santral sinir sistemi kanseri (IC50:1.43 μ M), renal kanser (IC50:1.45 μ M), meme kanseri (IC50:1.75 μ M), prostat kanseri (IC50:1.93 μ M), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (IC50:2.69 μ M) ve over kanseri (IC50:3.47 μ M) üzerinde de denenerek farklı kanser tiplerinde de güçlü antiproliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir (Maust, 2018).

5.1.6. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) ile U87MG hücre migrasyonunun değerlendirilmesi



Şekil 5.9: Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) ile MTX-211 bileşiğinin U87MG hücrelerinin migrasyonu üzerine etkilerinin zaman ve konsantrasyona bağlı değişim grafikleri.

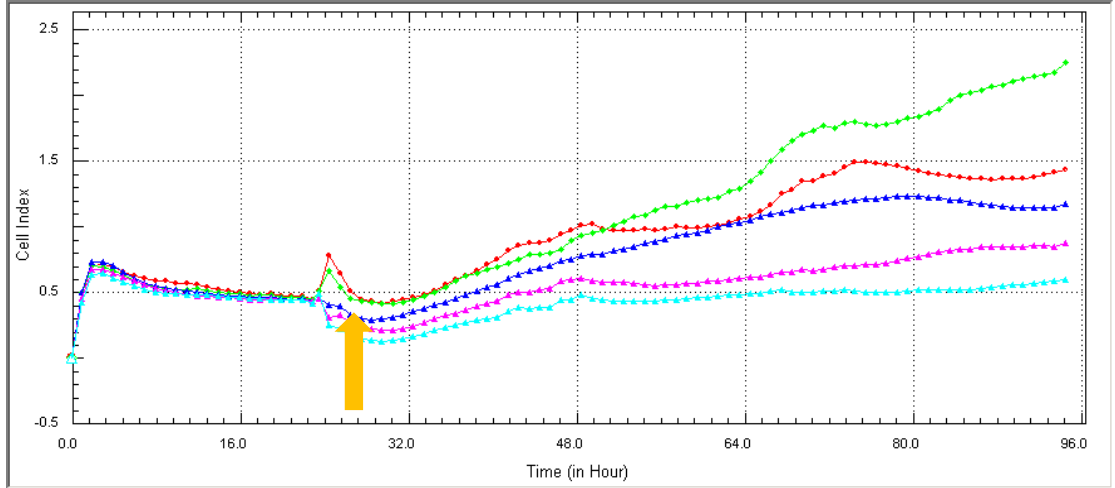
● Kontrol ● MTX-211 5 µM ● MTX-211 10 µM ● MTX-211 20 µM

MTX-211 (5 µM, 10 µM, 20 µM) konsantrasyonlarının U87MG hücre migrasyonu üzerine etkileri, 48 saatlik inkübasyonda 10 dakikalık periyotlarla, gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) kullanılarak incelenmiştir. Kontrol grubunda keskin bir artış olduğu, proliferasyon deneyine paralel olarak MTX-211'in artan konsantrasyonuna bağlı bir şekilde U87MG hücre migrasyonunu baskıladığı belirlenmiştir (Şekil 5.9).

EGFR ve PI3Kinaz inhibitörü MTX-211 ile U87MG hücre hattında migrasyon analizi daha önce çalışılmamıştır ancak EGFR inhibitörü erlotinibin U87MG hücre motilitesini ve migrasyonunu inhibe ettiği (Ramis vd., 2012) ve PI3K/AKT/mTOR inhibitörü olan LY294002 ve rapamisin'in 24 saatlik inkübasyonu sonucunda U87MG hücre hattında migrasyon ve invazyonu baskıladığı bildirilmiştir (Huang vd., 2018). Deney sonucumuz EGFR ve PI3Kinaz'ın migrasyonu baskıladığı bilgisini desteklemektedir.

5.2. Ko-kültür Çalışmalarının Değerlendirilmesi

5.2.1. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) ile THP-1 ve U87MG ko-kültür ortamlarında hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi



Şekil 5.10: MTX-211 konsantrasyonlarının 48 saatlik U87MG ve THP-1 ko-kültür ortamında U87MG hücre proliferasyon eğrileri (sarı ok: konsantrasyon uygulaması, $n=6$, ortalama±standart sapma)

● LPS (-) Kontrol ● LPS (+) Kontrol ● MTX-211 5µM ● MTX-211 10µM ● MTX-211 20µM

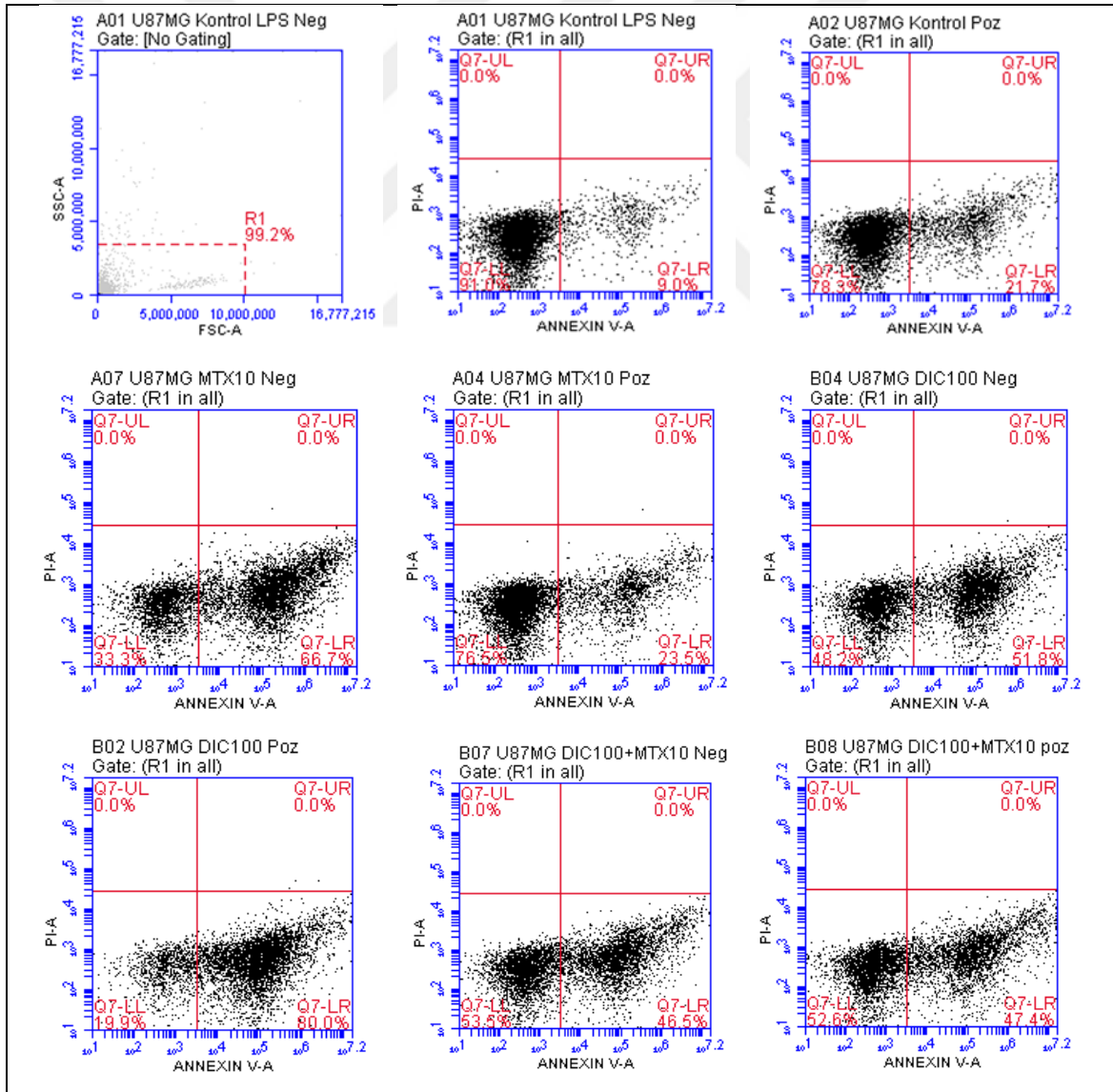
Şekil 5.10’da U87MG ve THP-1 ko-kültür ortamında U87MG hücrelerinde LPS (-) Kontrol grubuna göre LPS (+) Kontrol ve MTX-211 (5 µM, 10 µM, 20 µM) konsantrasyonlarının antiproliferatif etkileri 96 saat süresince 10 dakikalık periyotlarla gerçek zamanlı olarak incelenmiştir. RTCA DP Software 1.2.1 programı kullanılarak konsantrasyon-hücre indeksi eğrileri (Şekil 5.10) karşılaştırılmıştır. Bu sonuçlara göre LPS’nin U87MG hücre proliferasyonunu azalttığı ve LPS’li ko-kültür ortamında MTX-211’in artan konsantrasyonlarına bağlı antiproliferatif etkide artış meydana geldiği belirlenmiştir.

1943 yılında Shear ve Turner tarafından aktif madde olarak Coley toksininden LPS izole edildiğinden beri (Shear ve Turner, 1943) LPS'nin antikanser etkisi altında yatan mekanizma, *in vivo* hayvan modelleri ve *in vitro* hücre hatları kullanılarak araştırılmaktadır. Farklı tip kanser tanısı konmuş 10 hastaya LPS tedavisi uygulanmış, 5 hastanın tümör boyutları ölçülmüş, tümör belirteçleri ve tümör boyutlarında önemli oranda azalma olduğu tespit edilirken (Goto vd., 1996) bir başka çalışmada insan özofagus kanserini temsil eden OE19 (adenokarsinom) ve OE21 (skuamöz karsinom) hücre hatlarında LPS'nin hücre çoğalması ve canlılığı üzerindeki etkisi MTT testi ile ölçülmüş, zaman ve konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını ve proliferasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Gonçalves vd., 2016). Deney sonucumuz, farklı kanser tiplerinde

etkisi denenmiş olan LPS'nin hücre proliferasyonunu azalttığı literatür bilgisi ile uyumludur.

5.2.2. Akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi

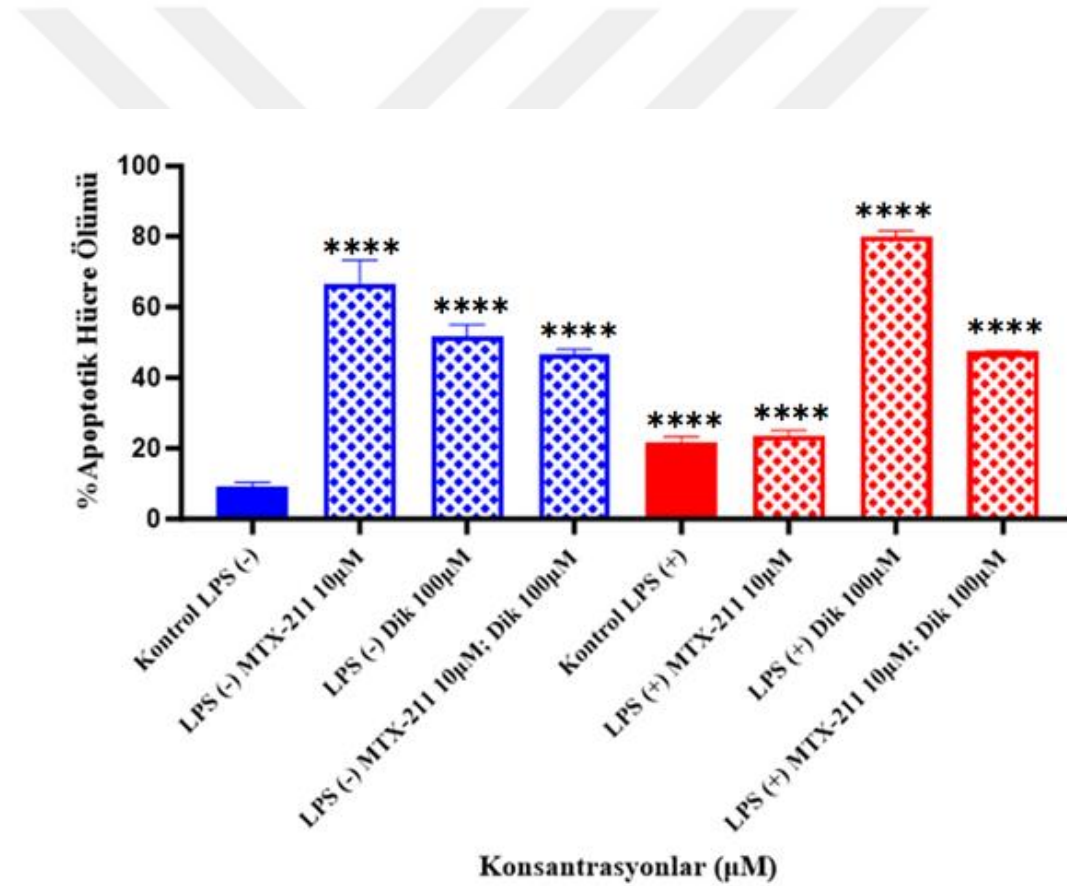
U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde, MTX-211 (10 μ M) ve diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinleri U87MG hücrelerine uygulanmış ve plakalar 48 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. 48 saatlik inkübasyon sonunda U87MG hücreleri kaldırılarak, 'BD Pharmingen FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I' kit protokolü uygulanmış ve örnekler akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) ölçülerek analiz edilmiştir. Sonuçlar Şekil 5.11, 5.12, 5.13 ve Tablo 5.7'de verilmiştir.



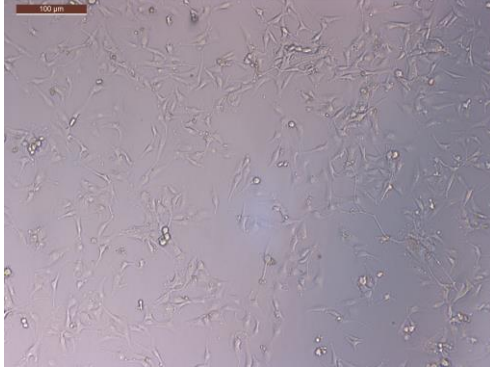
Şekil 5.11: U87MG hücrelerinde MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinlerinin apoptotik etkilerinin akış sitometride belirlenmesi.

Tablo 5.7. U87MG hücrelerinde MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinlerinin Annexin-PI apoptoz sonuçları (%).

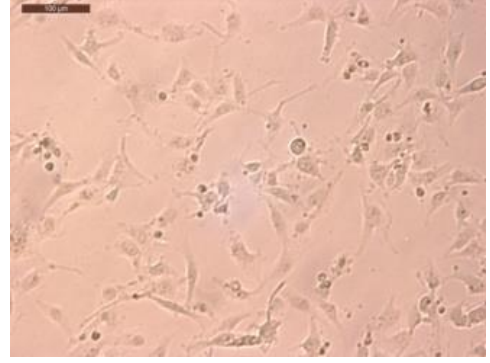
GRUPLAR	CANLI HÜCRE %	ERKEN APOPTOTİK HÜCRE %
Kontrol LPS (-)	91	9
LPS (-) MTX-211 10 μ M	33.3	66.7
LPS (-) Dik 100 μ M	48.2	51.8
LPS (-) Dik 100 μ M; MTX-211 10 μ M	53.5	46.5
Kontrol LPS (+)	78.3	21.7
LPS (+) MTX-211 10 μ M	76.5	23.5
LPS (+) Dik 100 μ M	19.9	80
LPS (+) Dik 100 μ M; MTX-211 10 μ M	52.6	47.4



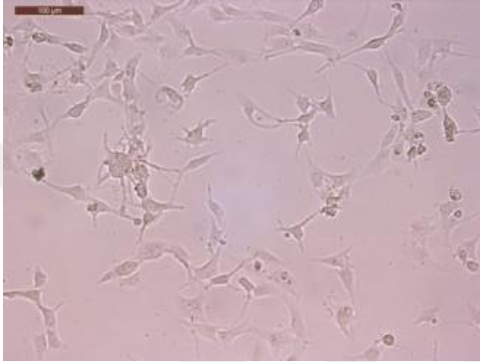
Şekil 5.12: U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının toplam apoptotik hücre ölümü yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, n=3, ortalama $\pm$ standart sapma, $p < 0.0001$ **** çok önemli fark var)



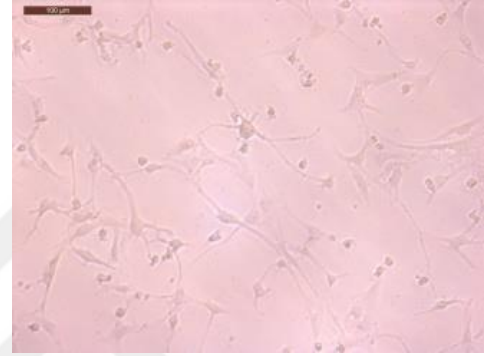
LPS (-) Kontrol



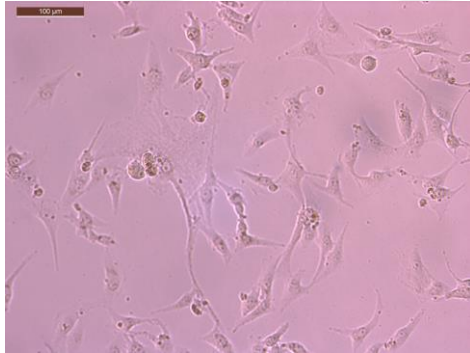
LPS (+) Kontrol



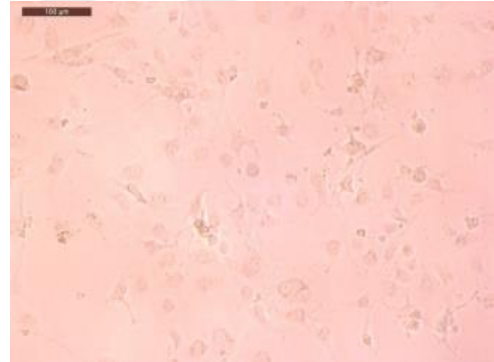
LPS (-) MTX-211 10µM



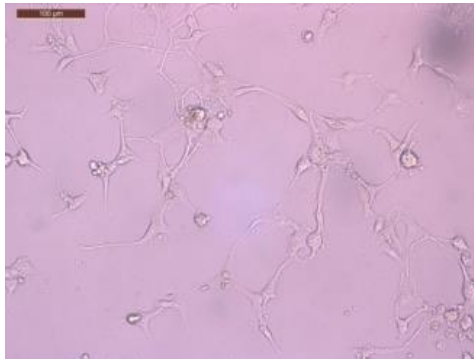
LPS (+) MTX-211 10µM



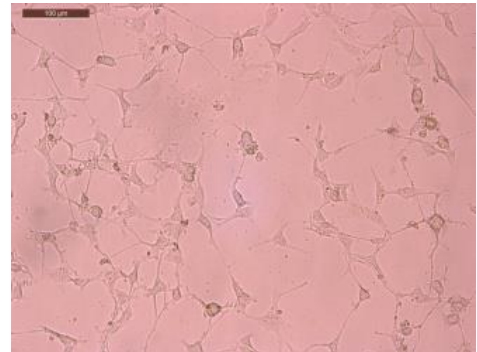
LPS (-) Dik 100µM



LPS (+) Dik 100µM



LPS (-) MTX-211 10µM; Dik 100µM



LPS (+) MTX-211 10µM; Dik 100µM

Şekil 5.13: U87MG hücrelerinde MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki ışık mikroskop görüntüsü (MB:10X).

Literatürde, LPS'nin çeşitli *in vitro* kanser hücre hatlarında ve *in vivo* deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda apoptozu tetiklediği bildirilmektedir (Reisser vd., 2002; Wona vd., 2003). **Tablo 5.7'**de görüldüğü üzere U87MG glioblastoma hücre hattında LPS'nin apoptozu tetiklediği görülmüş ve kontrole göre 2 katından fazla bir değere sahip olduğu belirlenmiştir.

Şekil 5.11, 5.12 ve Tablo 5.7'de görüldüğü gibi U87MG hücrelerinde MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonları ile yapılan deneyde en yüksek apoptoz LPS (+) diklofenak dietilamin 100 µM ve daha sonra LPS (-) MTX-211 10 µM grupta tespit edilerek sırasıyla toplam apoptoz %80 ve %66.7 olarak hesaplanmıştır. MTX-211 ve diklofenak dietilamin kombinasyonunda ise LPS (+) ko-kültürde %47.4 ve LPS (-) ko-kültürde %46.5 olarak belirlenmiştir. LPS, MTX-211 10 µM ve diklofenak dietilamin 100 µM uygulanan tüm gruplarda apoptoz indüklenmiş, özellikle erken apoptotik hücreler tespit edilmiş ve istatistiksel olarak kontrol grubuna göre ($p<0.0001$ ****) çok önemli fark olduğu belirlenmiştir. Nekrotik hücre ve geç apoptotik hücre bulunmamıştır.

Şekil 5.13'de görüldüğü üzere U87MG glioblastoma hücrelerinde MTX-211 10 µM, diklofenak dietilamin 100 µM ve kombinasyonlarının 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki mikroskop görüntüleri incelendiğinde hücrelerin morfolojik yapılarının değiştiği, hem MTX-211 hem de diklofenak dietilamin ile akson ve dentritlerin inceliş ve uzadığı görülmekte ve bu bilgiler literatürü destekler niteliktedir.

İnsan nörogloma hücresi olan H4 hücrelerinin 24 saat boyunca EGFR inhibitörü gefitinibin farklı konsantrasyonları ile tedaviden sonra ışık mikroskobu ile hücre morfolojisinin gözlemlendiği bir çalışmada, düşük doz (10 uM) gefitinib ile kayda değer morfolojik değişiklik olmadığı, yüksek doz (40 uM) gefitinib ile hücresel yuvarlaklaşma, büzülme, membran kabarcıklaşması ve komşu hücrelerden ayrılma gibi belirgin morfolojik değişiklikler gözlemlendiği bildirilirken (Chang vd., 2011), bir başka EGFR inhibitörü olan erlotinib 0-40 µM konsantrasyon aralığında U251 glioma hücre hattında hücre morfolojisini değiştirmediği, luteolin ile kombine halde uygulandığında morfolojide değişiklikler meydana getirdiği gözlemlenmiştir (Powe vd., 2022). PI3Kinaz inhibitörü buparlisib (1 uM) ile yapılan bir başka çalışmada da U251 glioma hücrelerinde morfolojik değişiklik meydana geldiği ve hücrelerin tamamen yuvarlaklaştığı bildirilmiştir (Speranza vd., 2016). Diklofenak dietilaminin U87MG

hücre morfolojisi üzerindeki etkilerini inceleyen literatüre rastlanılmamıştır. Ancak diklofenakın PC3 prostat kanseri hücrelerinde kısalıp yuvarlaklaşmaya neden olduğu bildirilmiştir (Arisan vd., 2019).

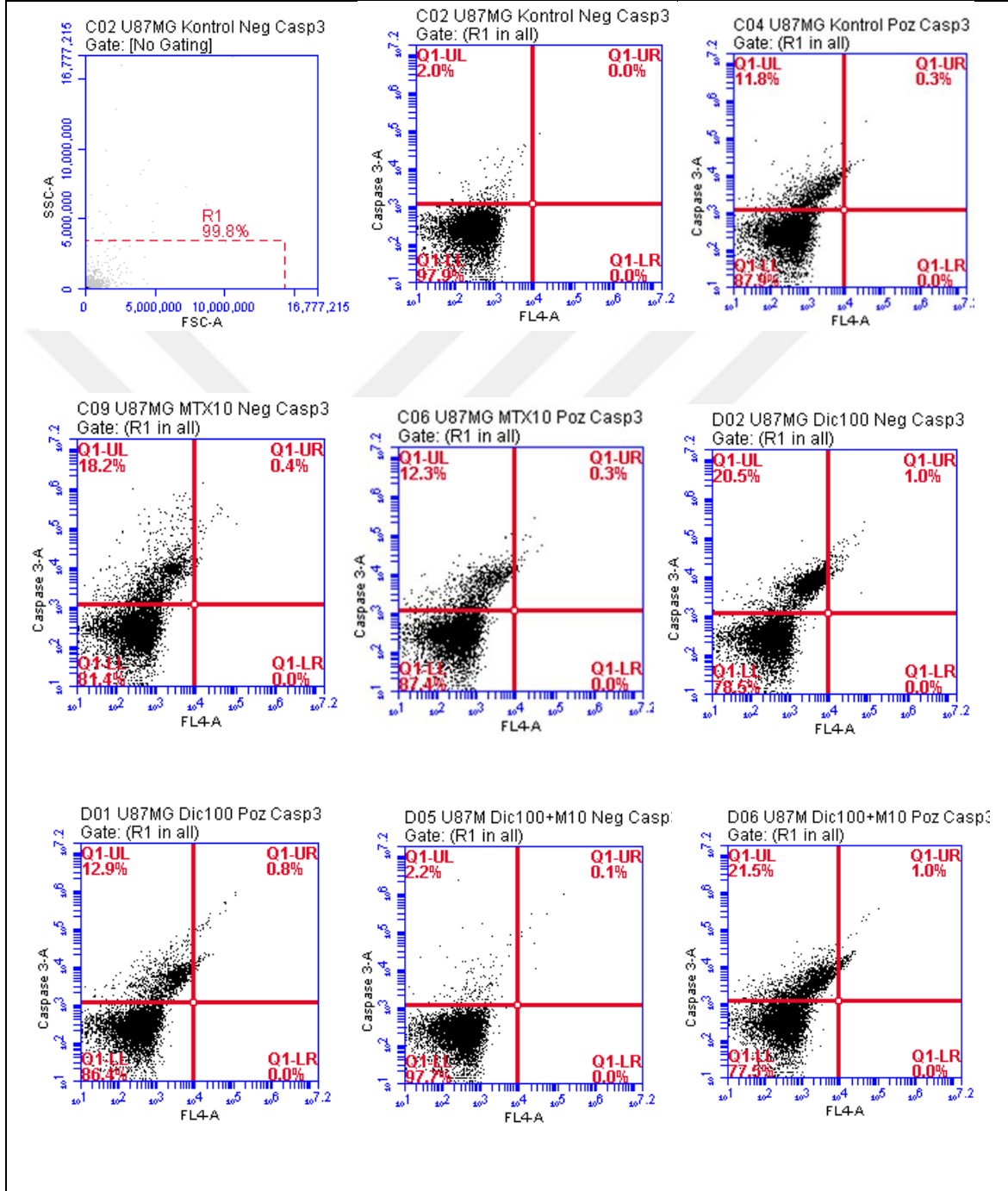
PI3K yolu, siklin D1'in ana düzenleyicisidir ve hücre döngüsü girişini geniş ölçüde engellemektedir (Klein vd., 2008; Li vd., 2008a; Liu vd., 2013; She vd., 2005; Shimura vd., 2012; Will vd., 2014). Bu bilgiye dayanarak MTX-211'in hücre döngüsünün durmasına ve/veya apoptoza yol açacağı tahmin edilerek yapılan çalışmada, apoptozun göstergesi olarak MTX-211'in HCT-116 hücrelerinde önemli derecede G1 fazını indüklemesi ve apoptoza neden olduğu bilinen bölünmüş PARP ekspresyonunu zamana bağlı indüklemesi ile doğrulanmıştır (Maust, 2018). MTX-211'in HCT-116 hücre hattında yapılan Annexin V-PI apoptoz deneyinde PI3Kinaz inhibitörü omipalisib ile %3.47, EGFR inhibitörü erlotinib ile %6.26 olarak belirlenen erken apoptoz, EGFR ve PI3Kinaz inhibitörü MTX-211 ile indüklenerek %6.89'a yükselmiştir. Yine aynı çalışmada MEK inhibitörü trimetinib ile erken apoptoz %7.90 olarak belirlenirken MTX-211 ile kombinasyonunda %21.33'e yükseldiği ve sinerjistik etki meydana getirdiği belirlenmiştir (Maust, 2018). MTX-211'in sitotoksik etkilerinin mesane kanseri hücrelerinde incelendiği başka bir çalışmada 48 saatlik inkübasyon sonunda 2 µM MTX-211'in 5637 ve EJ hücrelerinde geç apoptoz oranını önemli ölçüde arttırdığını ve sırasıyla geç apoptoz oranının %15.8 ve %7.23 ($p<0.001^{***}$) olduğunu bildirmişlerdir (Hu vd., 2023).

EGFR inhibitörü erlotinib, selekoksib ve kombinasyonları ile HCC827 ve H1650 akciğer kanseri hücre hatlarında apoptoza etkileri öncelikle western blot analizi ile bölünmüş PARP düzeyleri incelenmiş kombinasyon ile erlotinib ve selekoksibden çok daha kalın bir bant elde edildiği, Annexin V-PI deneyi ile de erlotinib ile görülen apoptoz oranının selekoksibden yüksek olduğu ve kombinasyonlarının apoptozu indükleyerek kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farka sahip olduğu ($p<0.01^{**}$) belirlenmiştir (Li vd., 2016).

5.2.3. Akış sitometride kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi

U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinin oluşturulmasından sonra MTX-211 10 µM ve diklofenak dietilamin 100 µM konsantrasyonları U87MG hücrelerine uygulanmış ve plakalar 48 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. 48 saatlik inkübasyon

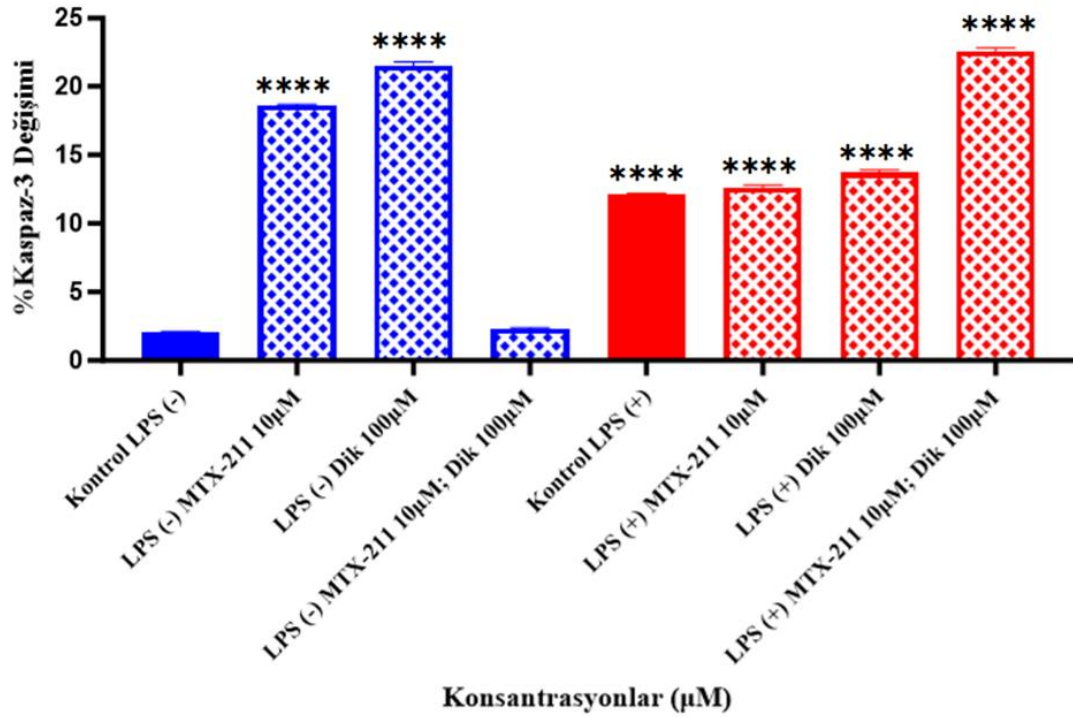
sonunda U87MG hücreleri kaldırılarak, ‘‘PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit’’ protokolü uygulanmış ve örnekler akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) ölçülerek analiz edilmiştir. Sonuçlar Şekil 5.14, 5.15 ve Tablo 5.8’de verilmiştir.



Şekil 5.14: U87MG hücrelerinde MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının kaspaz-3 seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi.

Tablo 5.8. U87MG hücrelerinde MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının kaspaz-3 sonuçları (%).

GRUPLAR	KASPAZ-3 NEGATİF %	KASPAZ-3 POZİTİF %
Kontrol LPS (-)	97.9	2
LPS (-) MTX-211 10 μ M	81.4	18.6
LPS (-) Dik 100 μ M	78.5	21.5
LPS (-) Dik 100 μ M; MTX-211 10 μ M	97.7	2.3
Kontrol LPS (+)	87.9	12.1
LPS (+) MTX-211 10 μ M	87.4	12.6
LPS (+) Dik 100 μ M	86.3	13.7
LPS (+) Dik 100 μ M; MTX-211 10 μ M	77.5	22.5



Şekil 5.15: U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının % kaspaz-3 seviyelerindeki değişim yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, n=3, ortalama $\pm$ standart sapma, $p < 0.0001$ **** çok önemli fark var)

Şekil 5.14, 5.15 ve Tablo 5.8’de görülen kaspaz-3 analiz sonuçları Annexin V-PI deney sonuçlarımızı desteklemekte, her iki deneyde de MTX-211, diklofenak

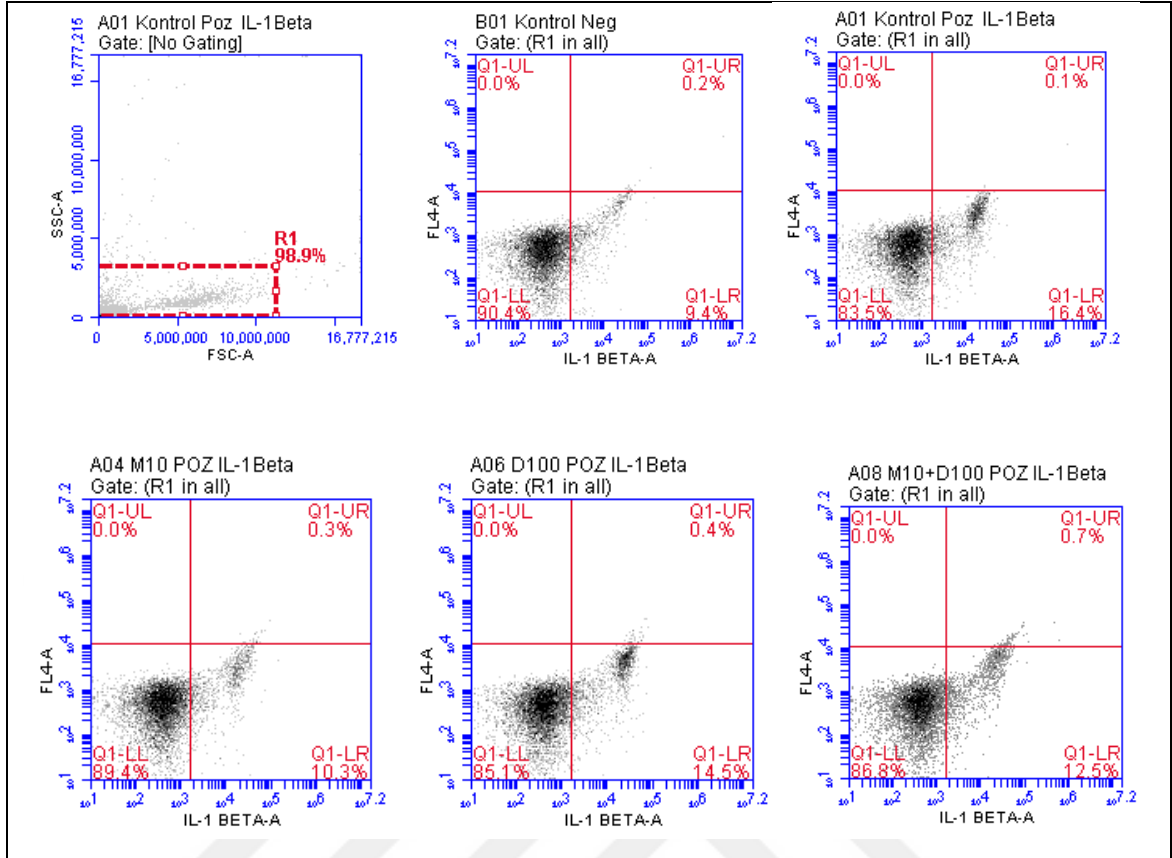
dietilamin ve kombinasyonları apoptozu indüklemektedir. Deney sonuçlarımıza göre LPS, kaspaz-3 aktivitesini 6 kat arttırmış, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ($p<0.0001^{****}$) çok önemli farka sahip olduğu belirlenmiştir. En yüksek kaspaz-3 aktivasyonunun görüldüğü grup LPS (-) diklofenak dietilamin 100 μ M ve daha sonra LPS (-) MTX-211 10 μ M uygulanan gruplarda tespit edilmiş, sırasıyla kaspaz-3 oranları %21.5 ve %18.6 olarak belirlenmiştir ve kontrole göre istatistiksel olarak ($p<0.0001^{****}$) çok önemli fark olduğu belirlenmiştir (Tablo 5.8). LPS'siz ortamda MTX-211 ve diklofenak dietilamin kombinasyonu kaspaz-3 aktivitesini %2.3'e ve LPS'li ortamda kombinasyon %22.5'a yükselterek her iki ortamda da kontrole göre aktif kaspaz-3 düzeyini arttırmıştır.

Hu ve arkadaşları MTX-211'in *in vitro* sitotoksik etkilerini mesane kanseri hücrelerinde (5637, EJ ve UMUC3) western blot ile analiz ettikleri apoptozla ilişkili bölünmüş PARP ve bölünmüş kaspaz-3 protein ekspresyon düzeylerini önemli ölçüde arttığını ve 10 mg/kg MTX-211 ile nude farelerde yaptıkları *in vivo* bir çalışma ile de ksenograftların büyümesinin belirgin şekilde azaldığını bildirmişlerdir (Hu vd., 2023).

Bazı *in vitro* çalışmalar, diklofenakın kanserde pro-apoptotik rolünü kanıtlamıştır. Örneğin, lösemi hücrelerinde (HL-60) PI3Kinaz yoluyla reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı, kaspaz aktivasyonu, sitokrom c salınımı, DNA fragmentasyonu; nöroblastoma hücrelerinde DNA fragmentasyonu, kaspaz aktivasyonu, ROS, kaspaz-3 ve -9 aktivasyonu; melanom hücrelerinde (A2058 ve SAN) Bcl-2/Bax oranını azaltıp sitokrom c salınımını arttırması ve (Galisteo vd., 2021) PC3 prostat kanseri hücrelerinde hücre döngüsünün S fazında tutuklanması, pro-kaspaz-3 düzeylerini indüklemesi, antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-xl protein düzeylerini güçlü bir şekilde inhibe etmesi (Arisan vd., 2019) ile apoptoz meydana getirmektedir.

5.2.4. U87MG ve THP-1 ko-kültürde (insertsüz) akış sitometride IL-1 β seviyelerinin değerlendirilmesi

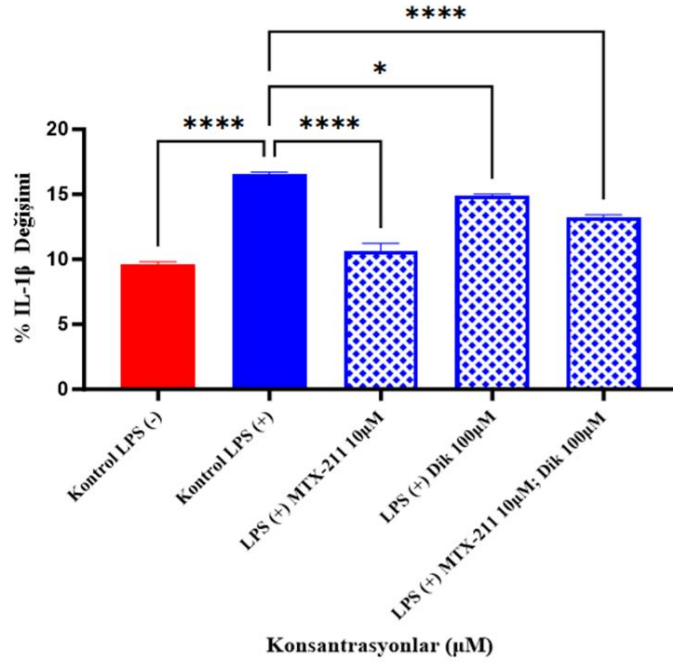
U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinin oluşturulmasından sonra MTX-211 10 μ M ve diklofenak dietilamin 100 μ M konsantrasyonları U87MG hücrelerine uygulanmış ve plakalar 48 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda U87MG hücre içi IL-1 β seviyeleri akış sitometri yöntemi ile belirlenmiş ve analiz edilmiştir. Sonuçlar **Şekil 5.16, 5.17 ve Tablo 5.9**'da verilmiştir.



Şekil 5.16: U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının IL-1 β seviyelerine etkisi.

Tablo 5.9. U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının IL-1 β seviyelerine etkisi (%)

GRUPLAR	IL-1 β NEGATİF %	IL-1 β POZİTİF %
Kontrol LPS (-)	93.4	9.6
Kontrol LPS (+)	83.5	16.5
LPS (+) MTX-211 10 μ M	89.4	10.6
LPS (+) Dik 100 μ M	85.1	14.9
LPS (+) Dik 100 μ M; MTX-211 10 μ M	86.8	13.2



Şekil 5.17: U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 µM) ve diklofenak dietilamin (100 µM) konsantrasyonları IL-1β pozitif hücre yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, n=3, ortalama±standart sapma, $p<0.05$ * fark var, $p<0.0001$ **** çok önemli fark var)

Şekil 5.16, 5.17 ve Tablo 5.9’da görüldüğü gibi U87MG ve THP-1 ko-kültürde LPS, IL-1β ekspresyonunu indüklemiştir ve LPS (-) kontrole (%9.6) göre istatistiksel olarak ($p<0.0001$ ****) çok önemli farka sahip olduğu belirlenmiştir. LPS ile indüklenen IL-1β ekspresyonları MTX-211 (%10.6) ve kombin (%13.2) uygulama ile LPS (+) kontrole (%16.5) göre IL-1β ekspresyonunu inhibe etmiş ve istatistiksel anlamlılık $p<0.0001$ **** olarak bulunmuştur. Diklofenak dietilamin uygulanan grupta IL-1β ekspresyonu inhibe edilmiş ve istatistiksel anlamlılık $p<0.05$ * olarak belirlenmiştir.

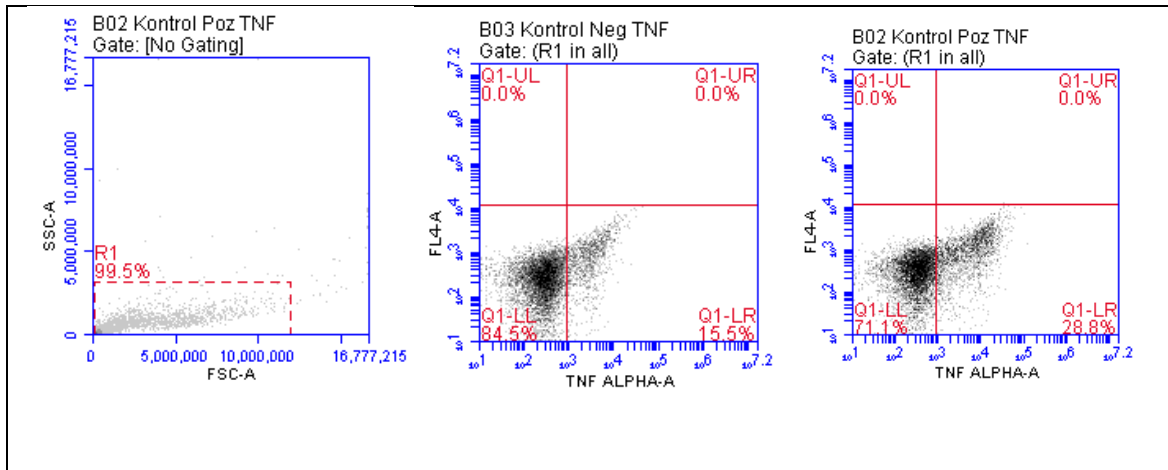
MTX-211’in U87MG hücrelerinde antienflamatuar etkileri ilk kez bu tez çalışmasında belirlenmiştir. EGFR inhibitörü erlotinib, COX-2 inhibitörü selekoksib ve kombinasyonunun H1650 ve HCC827 akciğer kanseri hücre hatlarında IL-1β, IL-6 ve IL-8 mRNA ekspresyonlarına olan etkisinin incelendiği çalışmada, IL-1β ekspresyonları her iki hücre hattında inhibe edilmiş, kontrole göre istatistiksel anlamlılık selekoksib ile gözlenmezken, erlotinib ile kontrole göre istatistiksel anlamlılık HCC827 hücre hattında $p<0.01$ ** ve H1650 hücre hattında $p<0.05$ *, HCC827 hücre hattında kombinasyonda

erlotinibe göre anlamlılık gözlenmezken H1650 hücre hattında istatistiksel anlamlılık $p < 0.05^*$ olarak belirlenmiştir (Li vd., 2016).

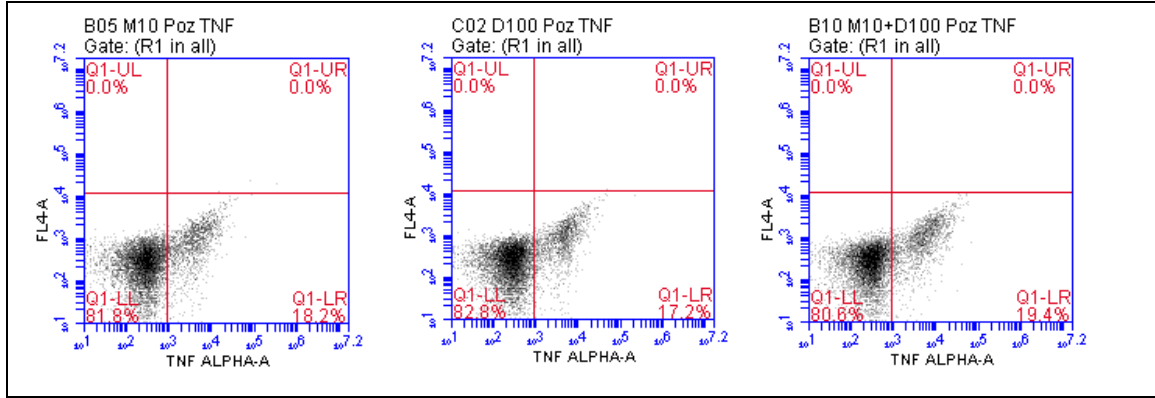
IL-1 β sıklıkla gliomada eksprese edilmekte (Sasaki vd., 1998) ve tümör progresyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Sasaki vd., 2001). U87 ve T98 hücrelerine IL-1 β 10 ng/ml ve TNF α 10 ng/ml uygulanarak COX-1 ve COX-2 düzeylerine olan etkilerinin incelendiği bir çalışmada, sitokinlerin COX-1 düzeyini değiştirmede ancak COX-2 ekspresyonunu dikkate değer ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (Taniura vd., 2008). IL-1 β ekspresyonunun test bileşiklerimiz tarafından inhibisyonu dolaylı olarak COX-2 düzeylerinin de azalmasına katkı sunacaktır.

5.2.5. U87MG ve THP-1 ko-kültürde (insertsüz) akış sitometride IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF α seviyelerinin değerlendirilmesi

U87MG hücreleri ile THP-1 ko-kültür modelinin oluşturulmasından sonra MTX-211 10 μ M ve diklofenak dietilamin 100 μ M konsantrasyonları U87MG hücrelerine uygulanmış ve plakalar 48 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre içi TNF α seviyeleri akış sitometri yöntemi ile belirlenmiş ve analiz edilmiştir. Sonuçlar Şekil 5.18, 5.19 ve Tablo 5.10'da verilmiştir.



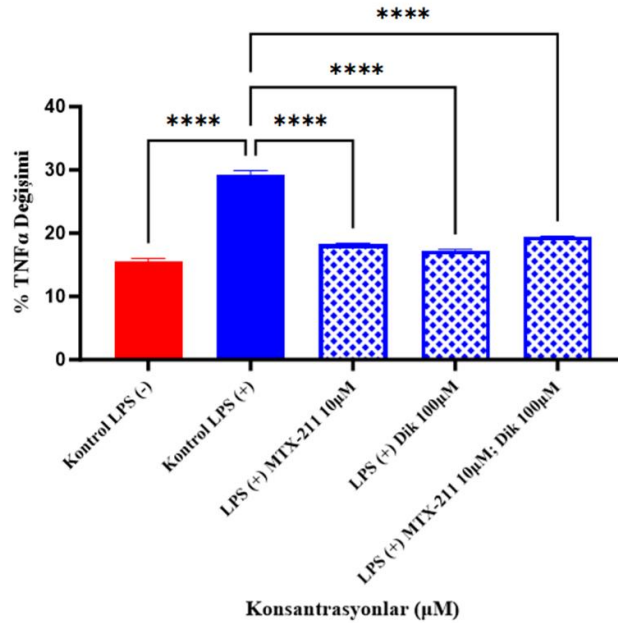
Şekil 5.18: U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının TNF α seviyelerine etkisi.



Şekil 5.18: (Devam) U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının TNF α seviyelerine etkisi.

Tablo 5.10. U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının TNF α seviyelerine etkisi (%).

GRUPLAR	TNF α NEGATİF %	TNF α POZİTİF %
Kontrol LPS (-)	84.5	15.5
Kontrol LPS (+)	71.2	28.8
LPS (+) MTX-211 10 μ M	81.8	18.2
LPS (+) Dik 100 μ M	82.8	17.2
LPS (+) Dik 100 μ M; MTX-211 10 μ M	80.6	19.4



Şekil 5.19: U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının TNF α pozitif hücre yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, n=3, ortalama $\pm$ standart sapma, $p < 0.0001$ **** çok önemli fark var)

Şekil 5.18, 5.19 ve Tablo 5.10'da görüldüğü gibi U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda LPS, TNF α ekspresyonunu indüklemiş (%28.8) ve kontrole göre istatistiksel olarak ($p < 0.0001^{****}$) çok önemli farka sahip olduğu belirlenmiştir. MTX-211 (%18.2), diklofenak dietilamin (%17.2) ve kombinasyonları (%19.4) LPS ile indüklenen TNF α ekspresyonunu inhibe etmiş ve LPS (+) kontrole göre istatistiksel anlamlılık $p < 0.0001^{****}$ olarak belirlenmiştir.

Kolon kanseri modeli oluşturulmuş ratlara verilen diklofenak 8 mg/kg doz tedavisi ile TNF α ve IL-1 β proinflamatuvar sitokin düzeylerini düşürmüştür (Rana vd., 2012).

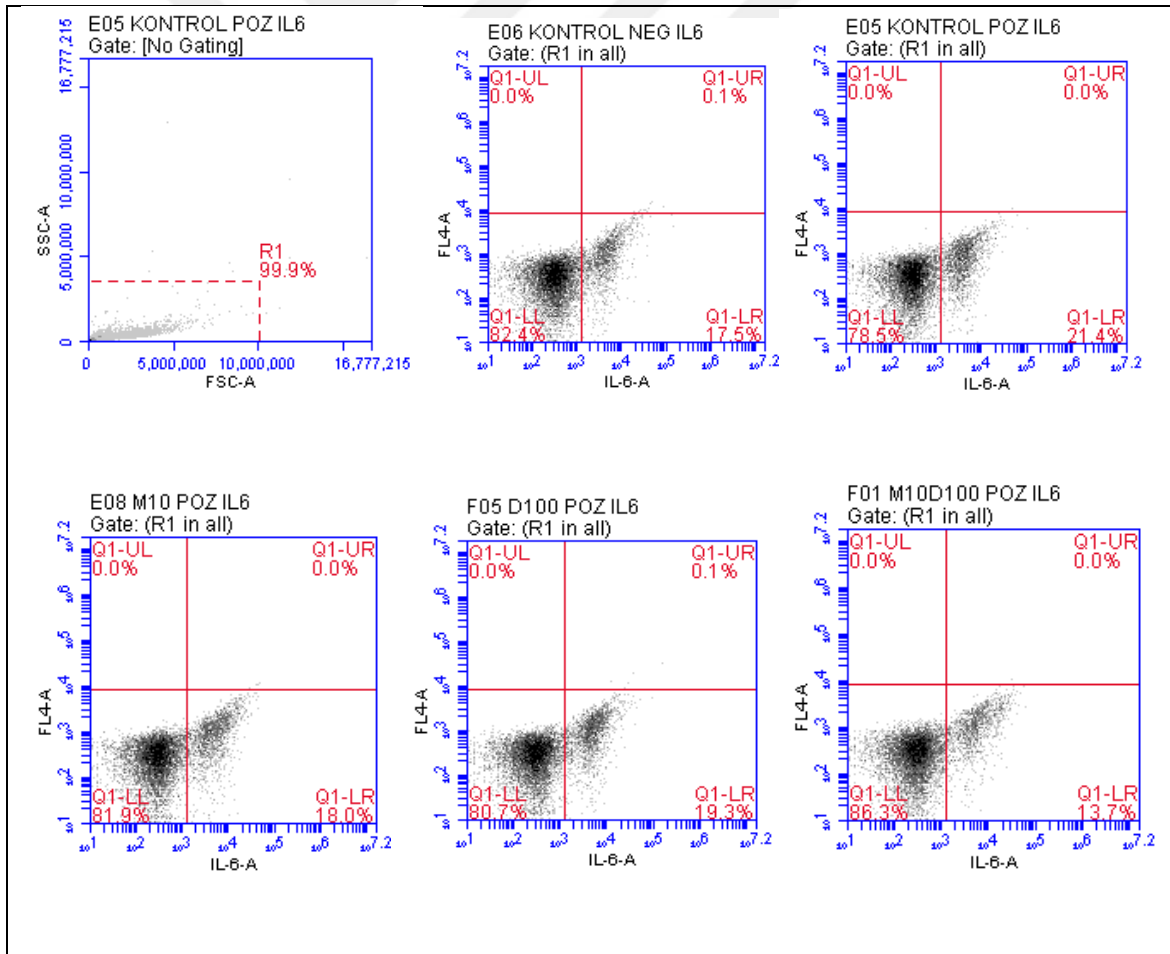
TNF α , başlıca makrofajlardan türetilen, *in vitro* malign hücelere karşı sitostatik ve sitotoksik etkileri olan ve *in vivo* bazı tümörlerde hemorajik nekroza neden olduğu bilinen (Carswell vd., 1975) sitokin ağı içerisinde birçok immünmodülatör rolü olan, hücre büyümesinin ve farklılaşmasının desteklenmesi ve sitotoksiste gibi birçok biyolojik ve pleiotropik fonksiyona sahip olan sitokindir (Beutler vd., 1988; Hofman vd., 1990; Jaattela vd., 1991). Biyolojik aktivitesini hücre yüzey reseptörleri ile gösteren TNF α reseptörlerinin glioma dokularındaki varlığını bildiren raporlar bulunmaktadır (Roessler vd., 1995).

Maruno ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 26 glioma örneği (4 astrositom (AS); 2 oligoastrositom (OA); 1 anaplastik astrositom (AA); 1 anaplastik oligoastrositom (AOA); 18 glioblastoma (GB)) antihuman TNF α kullanılarak immünohistokimyasal olarak incelenmiş ve AA, AOA ve GB'nin dahil olduğu 20 örnekten 16'sının, ancak AS ve OA'nın 6 örnekten yalnızca 1'inin TNF α için pozitif reaksiyon gösterdiği ve de malign gliomalarda (AA, AOA, GB) TNF α proteini içeren hücrelerin benign gliomalara (AS, OA) oranla daha fazla olduğu bildirilmiştir. TNF α yalnızca tümör dokusunda değil aynı zamanda komşu beyin dokularında, tümör damarlarının endotelinde, reaktif astrositlerde, nöronlarda ve ağırlıklı olarak da malign gliomalarda görülmüştür (Maruno vd., 1997). TNF α kültürlenmiş hücrelerde astrosit proliferasyonunu indüklemektedir (Lachman vd., 1987; Selmaj vd., 1990) ve tüm bu veriler TNF α 'anın çeşitli SSS hastalıklarında büyüme faktörü olduğunu kanıtlar niteliktedir.

Wei ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada glioma hücrelerinin IL-8 ve CCL2 sitokinlerini salgılayarak GAM'ların TNF α üretmesini, salgılanan TNF α 'da VCAM1,

ICAM1, CXCL5 ve CXCL10'un ekspresyonunu artırarak endotel hücrelerini aktive ettiğini, *in vitro* ve *in vivo* ortamda TNF α 'nın ilaçlar veya antikorlar ile inhibisyonunun GAM kaynaklı EC aktivasyonunu inhibe ettiğini ve *in vivo* fare glioma modelinde farenin daha uzun süre hayatta kalmasını sağladığını bildirdiler. Fare glioma modelinde TNF α 'nın yüksek ekspresyonu VEGF inhibitörü bevacizumaba kötü yanıt, antianjiyojenik tedaviye direnç gelişmesine ve tedavinin başarısızlığına neden olmaktadır (Wei vd., 2021).

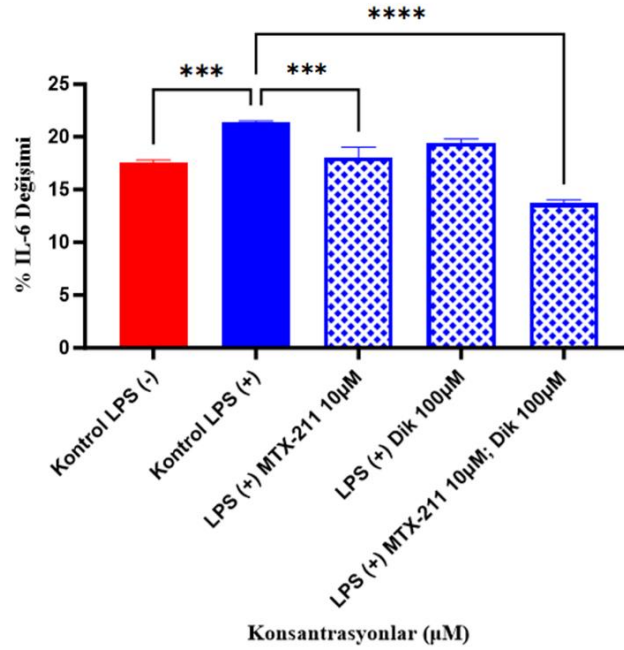
U87MG hücreleri ile THP-1 ko-kültür modelinin oluşturulmasından sonra MTX-211 10 μ M ve diklofenak dietilamin 100 μ M konsantrasyonları U87MG hücrelerine uygulanmış ve plakalar 48 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda U87MG hücre içi IL-6 seviyeleri akış sitometri yöntemi ile belirlenmiş ve analiz edilmiştir. Sonuçlar **Şekil 5.20**, **5.21** ve **Tablo 5.11**'de verilmiştir.



Şekil 5.20: U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının IL-6 seviyelerine etkisi.

Tablo 5.11. U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının IL-6 seviyelerine etkisi (%).

GRUPLAR	IL-6 NEGATİF %	IL-6 POZİTİF %
Kontrol LPS (-)	83.4	17.6
Kontrol LPS (+)	78.6	21.4
LPS (+) MTX-211 10 μ M	82	18
LPS (+) Dik 100 μ M	80.6	19.4
LPS (+) Dik 100 μ M; MTX-211 10 μ M	86.3	13.7



Şekil 5.21: U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının IL-6 pozitif hücre yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, n=3, ortalama $\pm$ standart sapma, $p > 0.05$ fark yok, $p < 0.001$ *** önemli fark var, $p < 0.0001$ **** çok önemli fark var)

Şekil 5.20, 5.21 ve Tablo 5.11’de görüldüğü gibi U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda LPS’nin IL-6 ekspresyonunu indüklediği (%21.4) ve kontrole göre ($p < 0.001$ ***) önemli farka sahip olduğu belirlenmiştir. Diklofenak dietilamin (%19.4) kontrol grubuna göre IL-6 ekspresyon düzeyini düşürdüğünü ancak istatistiksel olarak bir anlamlılığın olmadığı, MTX-211’in ise (%18) IL-6 ekspresyonunu inhibe ettiği ve kontrole göre istatistiksel anlamlılığının $p < 0.001$ *** olduğu belirlenmiştir. MTX-211 ve diklofenak dietilamin kombinasyonu

(%13.7) IL-6 ekspresyonunu inhibe etmiş ve kontrole göre istatistiksel anlamlılık $p<0.0001^{****}$ olarak bulunmuştur.

EGFR inhibitörü erlotinib, COX-2 inhibitörü selekoksib ve kombinasyonunun H1650 ve HCC827 akciğer kanseri hücre hatlarında IL-1 β , IL-6 ve IL-8 mRNA ekspresyonlarına olan etkisinin incelendiği çalışmada, her iki hücre hattında da IL-6 ekspresyonları inhibe edilmiş, kontrole göre istatistiksel anlamlılık selekoksib ile gözlenmezken, erlotinib ile kontrole göre ve kombinasyon ile erlotinibe göre $p<0.05^*$ olarak belirlenmiştir (Li vd., 2016).

IL-6, glioma dahil olmak üzere çok sayıda malign tümörde önemli rol oynayan, immün düzenleme ve inflamatuvar reaksiyonlara katılan bir sitokindir (Sun vd., 2014; Wang vd., 2014; Zhu vd., 2014). Gliomada IL-6 eksprese edildiği, glioma büyümesini destekleyebileceğini ve hastaların prognozunu kötü etkileyeceğine dair kanıtlar mevcuttur (McFarland vd., 2013; Kesanakurti vd., 2013).

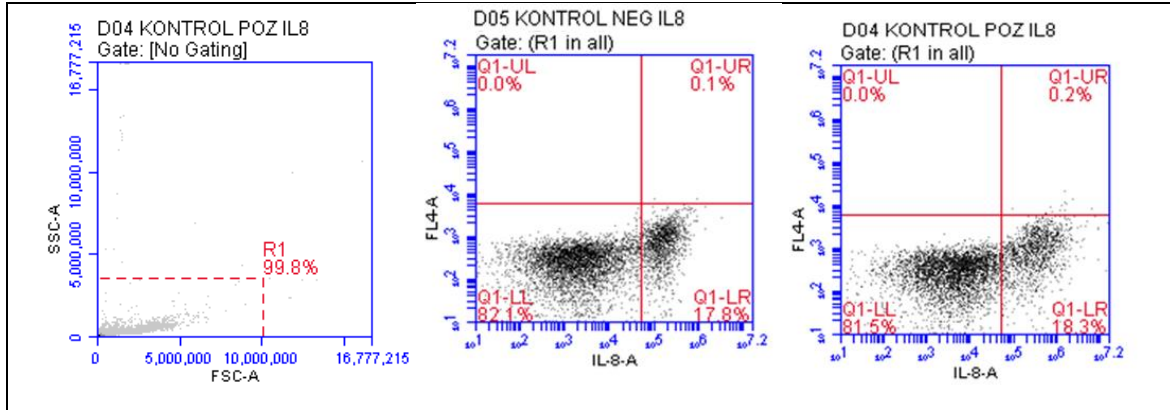
Normal beyin dokusu ile kıyaslandığında gliomada IL-6 ekspresyonu belirgin şekilde yüksektir ve IL-6 düzeyi gliomanın derecesinin artmasıyla birlikte artan bir eğilim göstermektedir (Shan vd., 2015; Hotfilder vd., 2000; Michaud-Levesque vd., 2012). Gliomada kan beyin bariyeri bozulduğundan dolayı, tümör tarafından salgılanan proteinler ve hatta malign hücreler BOS ve periferik kanda tespit edilebilmektedir. 86 glioma hastasının ameliyat öncesi ve sonrası serum ve BOS'ta IL-6 değerleri ölçülmüş, IL-6 değerinin ameliyattan sonra düştüğü ve hastalığın prognozu ile yakın ilişkili olduğu bildirilmiştir. Serum ve BOS'ta IL-6 değeri aynı şekilde gliomanın derecesi ile paralel olarak yüksek bulunmuştur. U251, U87, A172 ve T98G hücre hatlarında IL-6 tespit edilmiş, ekzojen IL-6 (100 ng/ml) ile inkübasyon sonucu U87 ve A172 hücrelerinde invazyonun önemli ölçüde artabileceği bildirilmiştir (Shan vd., 2015).

IL-6, çok sayıda solid tümörde yüksek oranda eksprese edilmekte ve kanser hücrelerinin büyümesi, invazyonu ve apoptozuyla ilgili patolojik süreçleri düzenleyebilmektedir (Sun vd., 2014; Wang vd., 2014; Chen vd., 2015; Xu vd., 2014). IL-6'nın gliomanın temel özelliği olan yüksek invazivliğe katkısı olduğu, EMT'ye bağlı bir mekanizmada tümör istilasını artırabildiği Chen ve arkadaşları tarafından (Chen vd., 2015) bildirilmiş, Shan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da U251, U87, T98G ve A172 hücrelerinin süpernatantında IL-6 tespit edilmesi ile doğrulanmıştır (Shan vd., 2015).

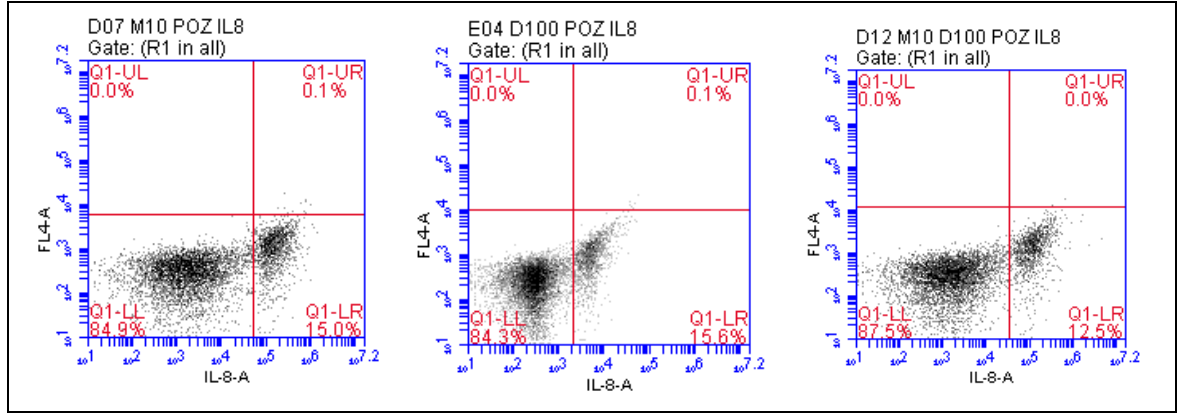
İnflamasyonda önemli rol oynayan IL-6, akut inflamatuvar reaksiyonu düzenleyebilmekte, B ve T lenfositlerinin farklılaşmasını ve aktivasyonunu modüle edebilmekte ve bazı hücre türlerinin büyümesi üzerinde önemli etkiler göstermektedir (Neurath ve Finotto, 2011).

Tümör hücrelerinde IL-6'nın ekspresyonu ve salgılanması NF- κ B, Notch, S1PR1 ve STAT3 fosforilasyonunu gibi çok sayıda bileşen tarafından düzenlenmektedir (Berishaj vd., 2007; Schafer vd., 2007; Grivennikov vd., 2009). IL-6, STAT3 fosforilasyonunu artırarak, tümör hücrelerinin çoğalmasını sağlamak ve apoptozunu önleyebilmektedir. Tümörle ilişkili inflamasyonu düzenlemek için bağışıklık hücrelerinin tümöre infiltrasyonunu teşvik edebilmekte (Xu vd., 2014) ve VEGF ekspresyonunu düzenleyerek tümör anjiyogenezini destekleyebilmektedir (Piperi vd., 2011).

U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde MTX-211 10 μ M ve diklofenak dietilamin 100 μ M konsantrasyonları U87MG hücrelerine uygulanmış ve plakalar 48 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre içi IL-8 seviyeleri akış sitometri yöntemi ile belirlenmiş ve analiz edilmiştir. Sonuçlar **Şekil 5.22, 5.23 ve Tablo 5.12**'de verilmiştir.



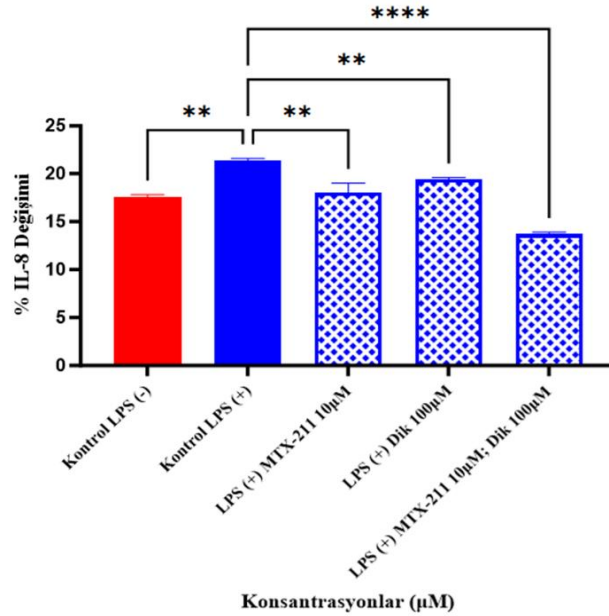
Şekil 5.22: U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının IL-8 seviyelerine etkisi.



Şekil 5.22: (Devam) U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının IL-8 seviyelerine etkisi.

Tablo 5.12. U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının IL-8 seviyelerine etkisi (%).

GRUPLAR	IL-8 NEGATİF %	IL-8 POZİTİF %
Kontrol LPS (-)	82.1	17.9
Kontrol LPS (+)	81.5	18.5
LPS (+) MTX-211 10 μ M	84.9	15.1
LPS (+) Dik 100 μ M	84.3	15.7
LPS (+) Dik 100 μ M; MTX-211 10 μ M	87.5	12.5



Şekil 5.23: U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının IL-8 pozitif hücre yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, n=3, ortalama $\pm$ standart sapma, $p < 0.01$ ** anlamlı fark var, $p < 0.0001$ **** çok önemli fark var)

Şekil 5.22, 5.23 ve Tablo 5.12’de görüldüğü gibi sonuçlarımız, LPS’nin IL-8 üzerindeki uyarıcı etkisiye sahip (Braganhol vd., 2015) olduğu literatür bilgisini desteklemektedir. LPS ile indüklenen IL-8 ekspresyonunu MTX-211 (%15) ve diklofenak dietilamin (%15.7) LPS (+) kontrole (%18.5) göre inhibe etmiş ve kontrole göre istatistiksel anlamlılık $p<0.01^{**}$ olarak bulunmuştur. MTX-211 ve diklofenak dietilamin kombinasyonu (%12.5) IL-8 ekspresyonunu inhibe etmiş ve kontrole göre istatistiksel olarak ($p<0.0001^{****}$) çok önemli farka sahip olduğu belirlenmiştir.

EGFR inhibitörü erlotinib, COX-2 inhibitörü selekoksib ve kombinasyonunun H1650 ve HCC827 akciğer kanseri hücre hatlarında IL-1 β , IL-6 ve IL-8 mRNA ekspresyonlarına olan etkisinin incelendiği çalışmada, IL-8 ekspresyonları her iki hücre hattında da inhibe edilmiş, selekoksib ile kontrole göre istatistiksel anlamlılık HCC827 hücre hattında gözlenmezken H1650 hücre hattında $p<0.05^{*}$ olarak belirlenmiş, erlotinib ve ile kontrole göre ve kombinasyon ile ile erlotinibe göre $p<0.05^{*}$ olarak belirlenmiştir (Li vd., 2016).

Sitokinler konak savunması ve hücre proliferasyonu, apoptoz, kaçış, migrasyon, anjiyogenez gibi gliomagenезin temel adımları üzerinde düzenleyici rollere sahiptirler (Palanisamy vd., 2012).

IL-8, SSS dahil olmak üzere vücutta fizyolojik reaksiyonlar ve patolojik süreçler arasındaki dengenin korunmasına katılan bir kemokin olup (Semple vd., 2010) fizyolojik fonksiyonlarına ek olarak patogenez, tanı ve tedavi açısından gliomalar da dahil olmak üzere birçok SSS anormalliğine (Miller, 2009) ve ayrıca nöroinflamasyona büyük katkı sunan, beyin hasarını takiben beyin omurilik sıvısında seviyesi yükselen ve inflamasyonun akut fazı sırasında nötrofil kemotaksisine aracılık eden sitokindir (Kosmopoulos vd., 2018).

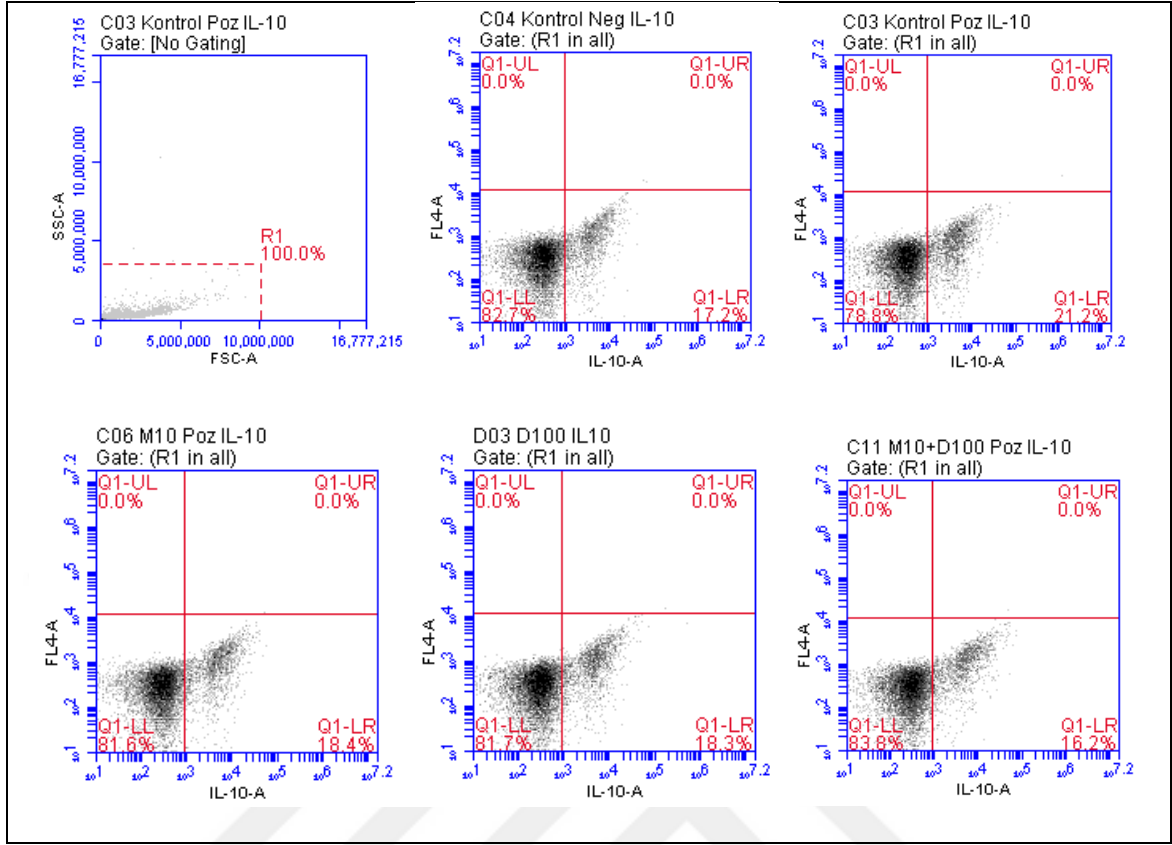
Yapılan çalışmalarda glioma dokularında IL-8 düzeyinin yüksek olduğu tespit edilmiş ve bu durumun gliomagenезde kritik bir rol oynadığı düşünülmüştür (Nitta vd., 1992). Glioma dokularında IL-8 düzeyi yüksekliği GBM’lerin %50’sinde görülen EGFR mutasyonunun neden olduğu hücre içi sinyal ileti yolu hiperaktivasyonu sonucu MEKK1 aracılı (Bonavia vd., 2012) ve ayrıca astrositomalarda sıklıkla upregüle edilen PGE2’nin IL-8 promotorunda H3 asetilasyonunu indüklemesinden kaynaklanan IL-8 ekspresyonunu daha da güçlendirmesinden ileri gelmektedir (Venza vd., 2012).

Yakın zamanda yapılan bir araştırmaya göre glioblastoma ile ilişkili nekroz da IL-8 üretimini tetiklemekte ve bu durum GBM hücrelerinin invaziv yeteneğinin artması ile sonuçlanmaktadır (Ahn vd., 2016).

IL-8 ekspresyonu, transkripsiyon faktörü NF- κ B ile indüklenmekte, glioma ilerlemesine, tümörün anjiyogenezi güçlendiren damarsal ihtiyaçlarını karşılayarak ya da göç potansiyelini artırarak agresif bir tümör fenotipine neden olmaktadır (Ahn vd., 2016; Kruczyk vd., 2014; Brat vd., 2005; Raychaudhuri ve Vogelbaum, 2011). Chen ve arkadaşları tarafından IL-8'in, hücrelerin hayatta kalması, proliferasyonu, endotelial hücre göçü ve MMP'lerin aktivasyonunu etkileyen, hem kanserde hem de inflamasyonda güçlü bir anjiyogenez aracısı olduğu bildirilmiştir (Chen vd., 1999). Gliomanın yüksek metabolik profili ve MMP'nin, doku faktörünün ve MDA'nın aşırı ekspresyonuna ilişkin agresif fenotipi de IL-8 üretimini tetiklemektedir. IL-8, VEGF inhibisyonunun üstesinden gelen anjiyogeneze reseptörleri aracılığıyla katkıda bulunmakta (Kosmopoulos vd., 2018) ve antianjiyojenik etkileri dolayısıyla potansiyel terapötik ajanlar olarak araştırılan miR-93 ve T11-TS gibi moleküllerin temel hedefi olmaktadır (Fabbri vd., 2015; Singh vd., 2015; Kagelman vd., 2014).

Gliomaların yüksek metabolik profili ve hücre proliferasyonunun artması, hipoksik bir ortam yaratmaktadır. Bu duruma hücrel adaptasyon, hipoksi ile indüklenebilir Faktör (HIF) ve IL-8'in artırılmış ekspresyonu ile sağlanmakta ve ne yazık ki bu durum tedavi direncine neden olmaktadır (Batchelor vd., 2013). IL-8 invazyon ve anjiyogeneze sunduğu katkıların yanı sıra gefitinib, sisplatin (Wang vd., 2015) ve temozolamid (Bruyere vd., 2011) gibi ilaçlara karşı direnç gelişmesinde önemli rol oynamaktadır.

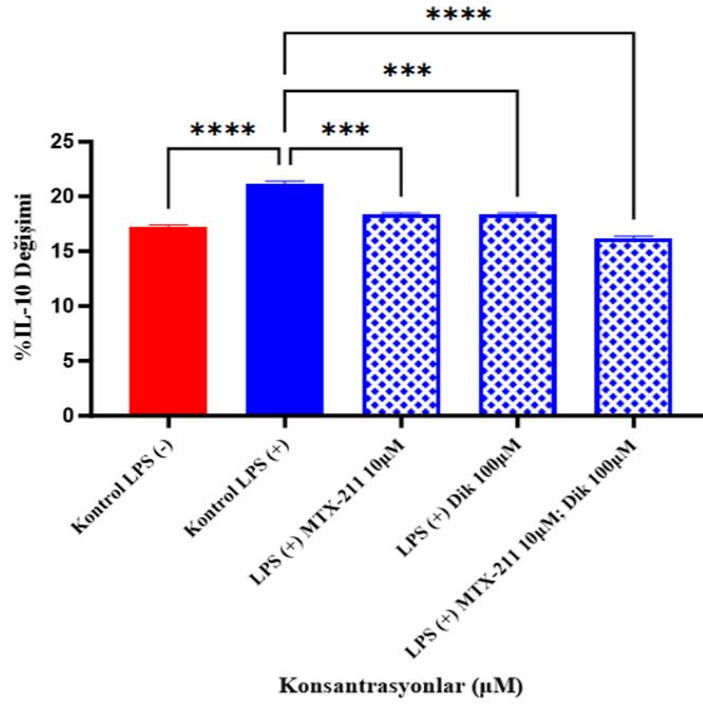
U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde MTX-211 10 μ M ve diklofenak dietilamin 100 μ M konsantrasyonları U87MG hücrelerine uygulanmış ve plakalar 48 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre içi IL-10 seviyeleri akış sitometri yöntemi ile belirlenmiş ve analiz edilmiştir. Sonuçlar **Şekil 5.24, 5.25 ve Tablo 5.13**'de verilmiştir.



Şekil 5.24 U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının IL-10 seviyelerine etkisi.

Tablo 5.13. U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının IL-10 seviyelerine etkisi (%).

GRUPLAR	IL-10 NEGATİF %	IL-10 POZİTİF %
Kontrol LPS (-)	82.8	17.2
Kontrol LPS (+)	78.8	21.2
LPS (+) MTX-211 10 μ M	81.6	18.4
LPS (+) Dik 100 μ M	81.7	18.3
LPS (+) Dik 100 μ M; MTX-211 10 μ M	83.8	16.2



Şekil 5.25: U87MG ve THP-1 ko-kültür gruplarında MTX-211 (10 µM) ve diklofenak dietilamin (100 µM) konsantrasyonları IL-10 pozitif hücre yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, n=3, ortalama±standart sapma, $p<0.001$ *** önemli fark var, $p<0.0001$ **** çok önemli fark var)

Şekil 5.24, 5.25 ve Tablo 5.13’de görüldüğü gibi U87MG ve THP-1 ko-kültür modelinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda LPS, IL-10 ekspresyonunu indüklemiş ve kontrole göre istatistiksel olarak ($p<0.0001$ ****) çok önemli farka sahip olduğu belirlenmiştir. LPS ile indüklenmiş IL-10 düzeyi MTX-211 (%18.4) ve diklofenak dietilamin (%18.3) uygulamaları ile inhibe edilmiş ve LPS (+) kontrole (%21.2) göre istatistiksel olarak ($p<0.001$ ***) önemli farka sahip olduğu belirlenmiştir. Kombin uygulamanın (%16.2) kontrol grubuna göre IL-10 düzeyini azalttığı ve istatistiksel olarak da ($p<0.0001$ ****) çok önemli farka sahip olduğu belirlenmiştir.

Diklofenak tedavisi mürin kemik iliği hücrelerinde artan doza bağlı olarak IL-10 ekspresyonu azaltmakta ve fosforile STAT protein ekspresyonunu da azalttığından antiproliferatif etki meydana getirmektedir (Sridhar vd., 2013). Yine aynı şekilde GL261 glioma hücre hattında aşırı eksprese edilen IL-10, IL-6 ve GM-CSF gibi immünsupresif sitokinler PGE2 inhibisyonu ile azalmaktadır (Authier vd., 2015).

İlk olarak Huettner ve ark. tarafından gliomada IL-10 ekspresyonu edildiği rapor edilmiştir (Huettner vd., 1997), yüksek dereceli (derece III ve IV) gliomaların %87'sinde ve düşük dereceli (derece II) gliomaların %4'ünde yüksek IL10 mRNA seviyeleri bildirilmiştir. Çin Glioma Genom Atlası (CGGA) ve Kanser Genom Atlası'nda da IL10 mRNA ekspresyonunun yüksek dereceli gliomada (derece III ve IV) düşük dereceli (derece II) gliomaya kıyasla daha yüksek olduğunun bildirilmesi Huettner ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma sonuçları ile tutarlıdır (Widodo vd., 2021). Glioma hastalarında kandaki IL-10'un mRNA ve protein seviyeleri malignite ve glioma derecesi ile ilişkilidir (Gieryng vd., 2017; Prosniaak vd., 2013; Nitta vd., 1994). Düşük ve yüksek dereceli glioma hücrelerinde tespit edilen IL-10 reseptörleri (IL10RA ve IL10RB) (Donson vd., 2017; Akil vd., 2015) glioma hücrelerinin IL-10'a duyarlı olduğunu, JAK-STAT3'ü aktive ederek tümör hücresi çoğalmasını, migrasyonunu ve invazyonunu düzenlemektedir (Riley vd., 1999, Qi vd., 2016). IL-10 reseptörlerine gerek duymaksızın JAK2'ye doğrudan bağlanarak JAK2-STAT3 sinyalini indükleyebilmekte ve glioma hücre proliferasyonunu uyarmaktadır (Qi vd., 2016). Garcia-Hernandez ve arkadaşları B16 melanom fare modelinde, IL-10'un anjiyogenezi, immünsupresyonu ve tümör hücresi proliferasyonunu uyarak tümör büyümesini arttırdığını bildirmişlerdir (Garcia-Hernandez vd., 2002). Kapsamlı literatür taramasında IL-10'un immünsupresif ve immünstimulan aktiviteleriyle immünmodülatör fonksiyonlarının yanı sıra, kanser hücresi proliferasyonunu artırarak tümörün ilerlemesini desteklediği görülmektedir.

IL-10, APC'leri ve T hücre proliferasyonunu inhibe ederek ve düzenleyici T (TREG) hücrelerinin aktivitesini indükleyerek immünsupresyon sağlayan (Trifunovic vd., 2015; Perng vd., 2015) önemli bir pleiotropik immün düzenleyici sitokindir (Groux vd., 1998). IL-10, gliomada tümör ve bağışıklık hücrelerine sızma aktivitesinin modüle edilmesinde önemli bir rol oynamakta ve ağırlıklı olarak bağışıklık baskılayıcı bir etki sağlamakta ancak bazı durumlarda bağışıklık sistemini uyarıcı etki meydana getirebilmektedir (Widodo vd., 2021).

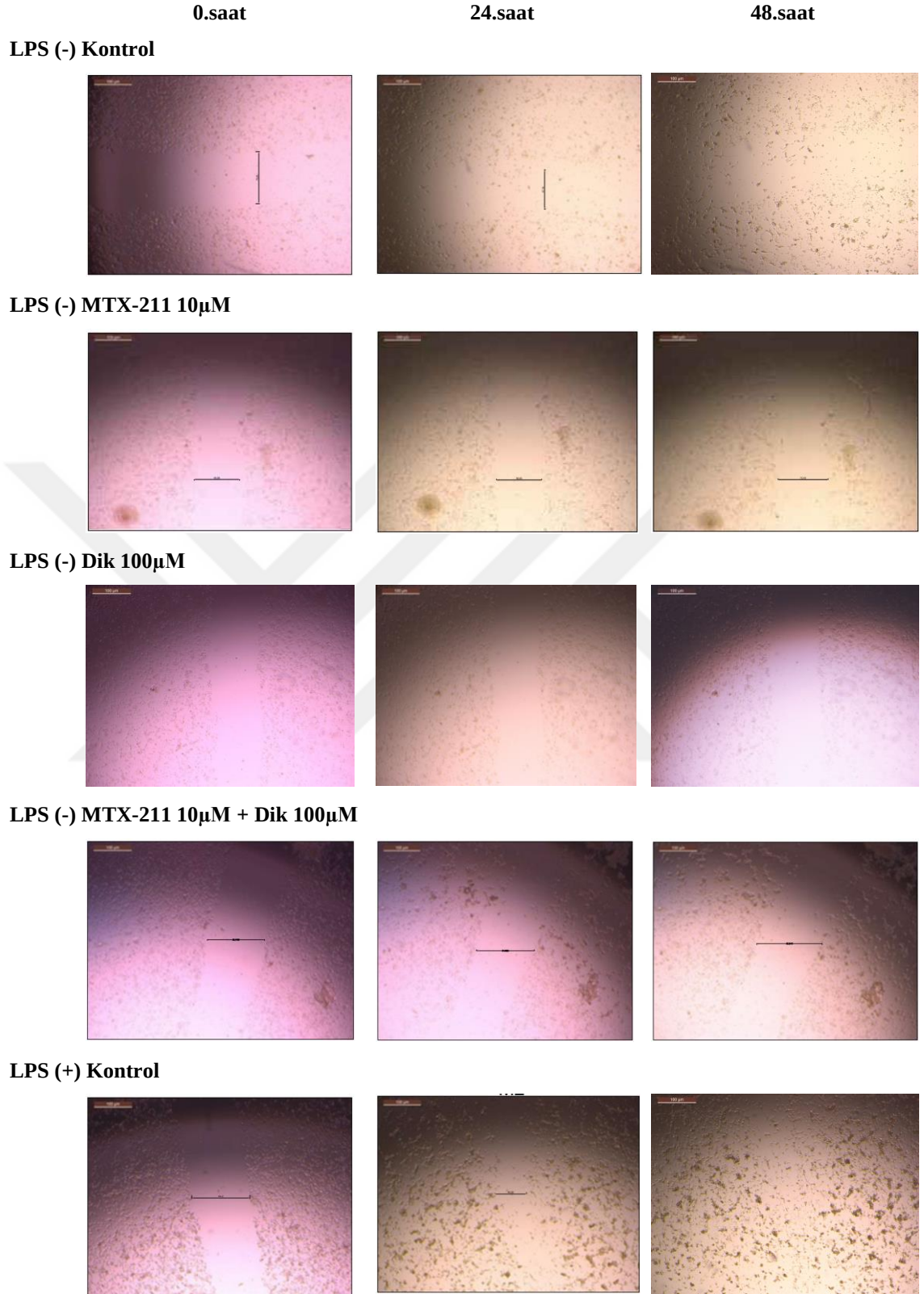
GBM'li hastalarda kan beyin bariyeri bozulduğu için periferik lenfositler SSS'e girmekte ve tümöre sızmaktadır (Ratnam vd., 2019; Alvarez vd., 2008; Dubois vd., 2014). Makrofaj ve diğer immün hücrelere kıyasla az sayıda olan CD4+ ve CD8+ T hücreleri (Klemm vd., 2020; Han vd., 2014) beyne göç ettikten sonra immünsupresif bir

mikro ortamlarla karşılaşır, sıklıkla perivasküler alanlarda birikir ve tipik olarak immün tükenmenin belirteçlerini eksprese eder (Berghoff vd., 2015; Woroniecka vd., 2018; Klemn vd., 2020). Hastadan elde edilen T hücreleri üzerinde IL10RA ve IL10RB'nin ekspresyonu ile kanıtlandığı gibi, tümör infiltre eden T hücreleri muhtemelen GBM TMÇ içindeki IL-10 parakrin sinyallemesine dahil olur (Zadka vd., 2017) ve IL-10, CD8+ T hücrelerinin (Groux vd., 1998), CD4+ tip 1 T yardımcı hücrelerinin (Th1), tip 2 T yardımcı hücrelerinin (Th2) ve tip 17 T yardımcı (Th17) hücrelerinin fonksiyonlarını inhibe eder. Bu inhibisyona TREG'ler ve APC'ler aracılık etmektedir (Sawant vd., 2019; Chaudhry vd., 2011; Del Prete vd., 1993; Wang vd., 2016).

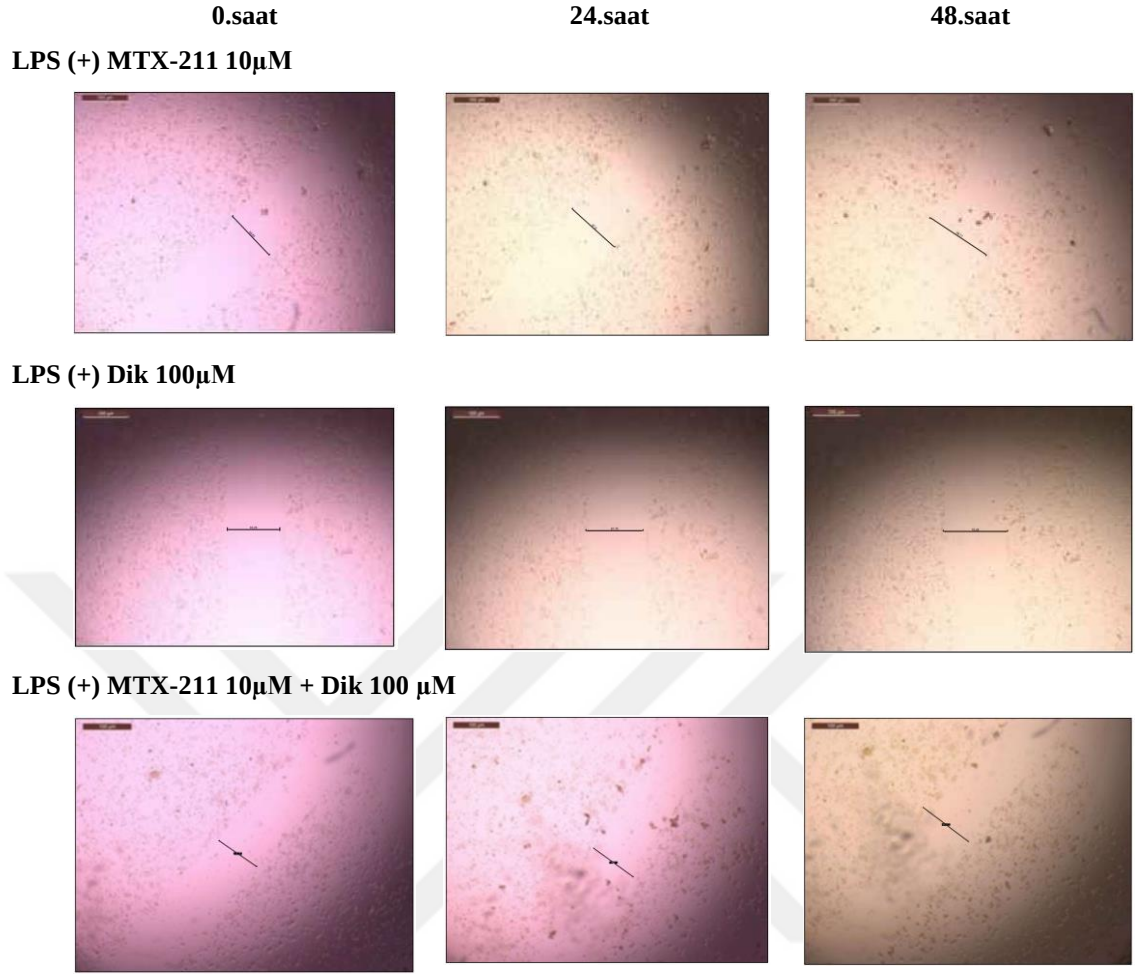
Glioma hücre membranları yüzeyinde F-aktin açısından zengin invadopodia vardır ve IL-10 uygulanan mikroglialarda F-aktin açısından zengin yapılar olan podozomların (Siddiqui vd., 2014) oluşumu arttığından bu yapılar glioma hücrelerinin invazyonunu kolaylaştırmaktadır (Stylli vd., 2008). Ginting ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yapılan bir çalışma ile multipleks ELISA kiti kullanarak bir takım proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu (A549), glioblastoma multiforme (U87MG, T98G), meme adenokarsinomu (MDA-MB-453, MCF7) ve hepatoselüler karsinom (Huh7) hücre hatlarında değerlendirilmiş, bütün kanser hücre hatlarında IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF α ekspresyonu gözlenmiş, U87MG ve T98G glioblastoma hücre hatlarında özellikle IL-6 ve IL-8'in yüksek oranda eksprese edildiği bildirilmiştir.

5.2.6. U87MG ve THP-1 ko-kültürde (insertlü) U87MG hücrelerinin migrasyonunun değerlendirilmesi

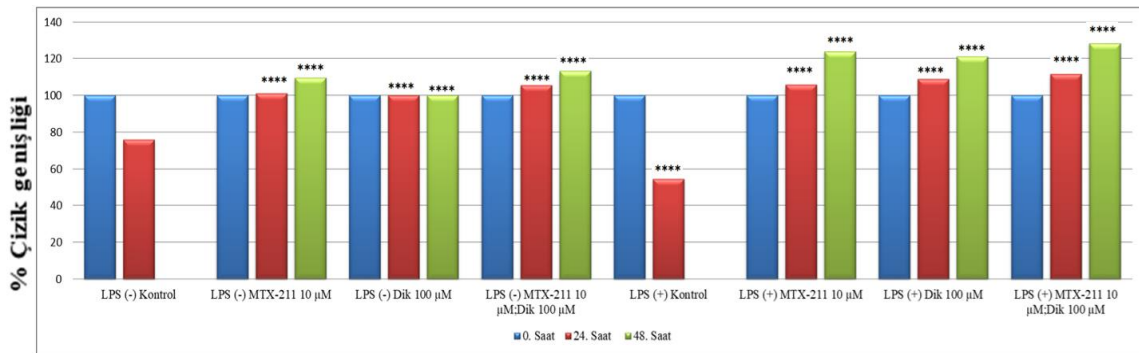
MTX-211 ve diklofenak dietilaminin (Dik) U87MG ve THP-1 ko-kültürde antimetastatik etkilerini değerlendirmek amacı ile çizik deneyi yapılmıştır. U87MG hücrelerinin MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının uygulandığı zaman aralığında, konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücrelerin ne kadar bölündüğü veya hareket ettiği gözlemlenmiştir. İlaç uygulamasından sonra 0., 24. ve 48. saatlerde fotoğraflanmış ve Leica LAS Görüntü Analizi programı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve grafik oluşturulmuştur (Şekil 5.27). Konsantrasyonlar uygulandıktan sonra 0., 24. ve 48. saat görüntüler alınmıştır.



Şekil 5.26: MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının U87MG hücre migrasyonu üzerindeki etkilerinin 0., 24. ve 48. saat görüntüleri (10X)



Şekil 5.26: (Devam) MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının U87MG hücre migrasyonu üzerindeki etkilerinin 0., 24. ve 48. saat görüntüleri (10X)



Şekil 5.27: MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının U87MG hücre migrasyonu üzerindeki etkilerinin 0., 24. ve 48. saatteki % çizik genişlikleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, n=3, ortalama $\pm$ standart sapma, p>0.05 fark yok, p<0.0001**** çok önemli fark var, Ort $\pm$ Standart Sapma n=3))

İlaç uygulamasından 24 saat sonraki sonuçlar kontrol grubuna göre kıyaslandığında, MTX-211 ve diklofenak dietilaminin zamana bağlı olarak U87MG hücreleri üzerinde etkileri olduğu gözlemlenmiş ve LPS'nin U87MG hücre migrasyonunu indüklediği gözlemlenmiştir (Şekil 5.26). Kontrol grubu hücrelerinde 24 saat sonra ölçülen migrasyon %24.2, LPS ile %45.5 olarak belirlenmiştir. LPS'siz ortamda diklofenak dietilamin ile migrasyon gözlemlenmemiştir. MTX-211 ve diklofenak dietilamin ile kombinasyonunda hücre migrasyonu gözlemlenmemiş aksine çizik genişliği daha çok artarak sırasıyla %101.39 ve %105.68'e ulaşmıştır. LPS'li ortamda MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonunun uygulandığı hücrelerde de çizik genişliği artarak sırasıyla %105.91, %108.83 ve %111.58 olarak ölçülmüştür. Bunun nedeni, hücreler LPS, MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonunu ile muamele edildiğinde apoptoza eğilim artmış ve zaman geçtikçe hücrelerde azalma gözlemlenmiştir.

İlaç uygulamasından 48 saat sonraki ölçümlere göre (Şekil 5.26) LPS'siz ve LPS'li kontrol grubunda oluşturduğumuz çizik tamamen kapanmıştır. LPS'siz ortamda diklofenak dietilamin ile migrasyon hiç gözlemlenmemiş, MTX-211 ve diklofenak dietilamin ile kombinasyon uygulamasında çizik genişliği zamana bağlı olarak artmış, LPS'siz ortamda sırasıyla %109.89 ve %113.26 olarak belirlenmiştir. MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyon uygulanmasında çizik genişliği LPS'li ortamda sırasıyla %124.06, %121.18 ve %128.39 olarak ölçülmüştür. Bunun nedeni 24 saatlik sonuçlarda belirttiğimiz gibi hücreler apoptoza uğradıklarından hücre sayısında azalmaların olmasıdır.

Özofagus skuamöz karsinom hücrelerinde (HKESC-2 ve HKESC-1) LPS, TLR4 reseptörlerini selektin ve p38 aracılığıyla uyararak, hücrelerin migrasyonunu ve yapışma özelliklerini arttırmakta ve böylece tümör metastazına katkıda bulunmaktadır (Rousseau vd., 2013).

Yang ve arkadaşları 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada LPS tarafından uyarılan TLR4 aracılığıyla, TLR4 insan meme kanseri hücrelerinde VEGF için mRNA ekspresyonunu düzenlediğinden, farelerin karaciğerinde tümör oluşmasını ve metastatik lezyonlar gelişimini desteklediğini bildirmişlerdir (Yang vd., 2014). Çalışmamızı destekleyen bir başka çalışma LPS'nin TLR4 aracılığıyla akciğer kanseri hücrelerinin invazyon ve migrasyonunu tetiklemesidir (Liu vd., 2015). Daha önce Thuringer ve

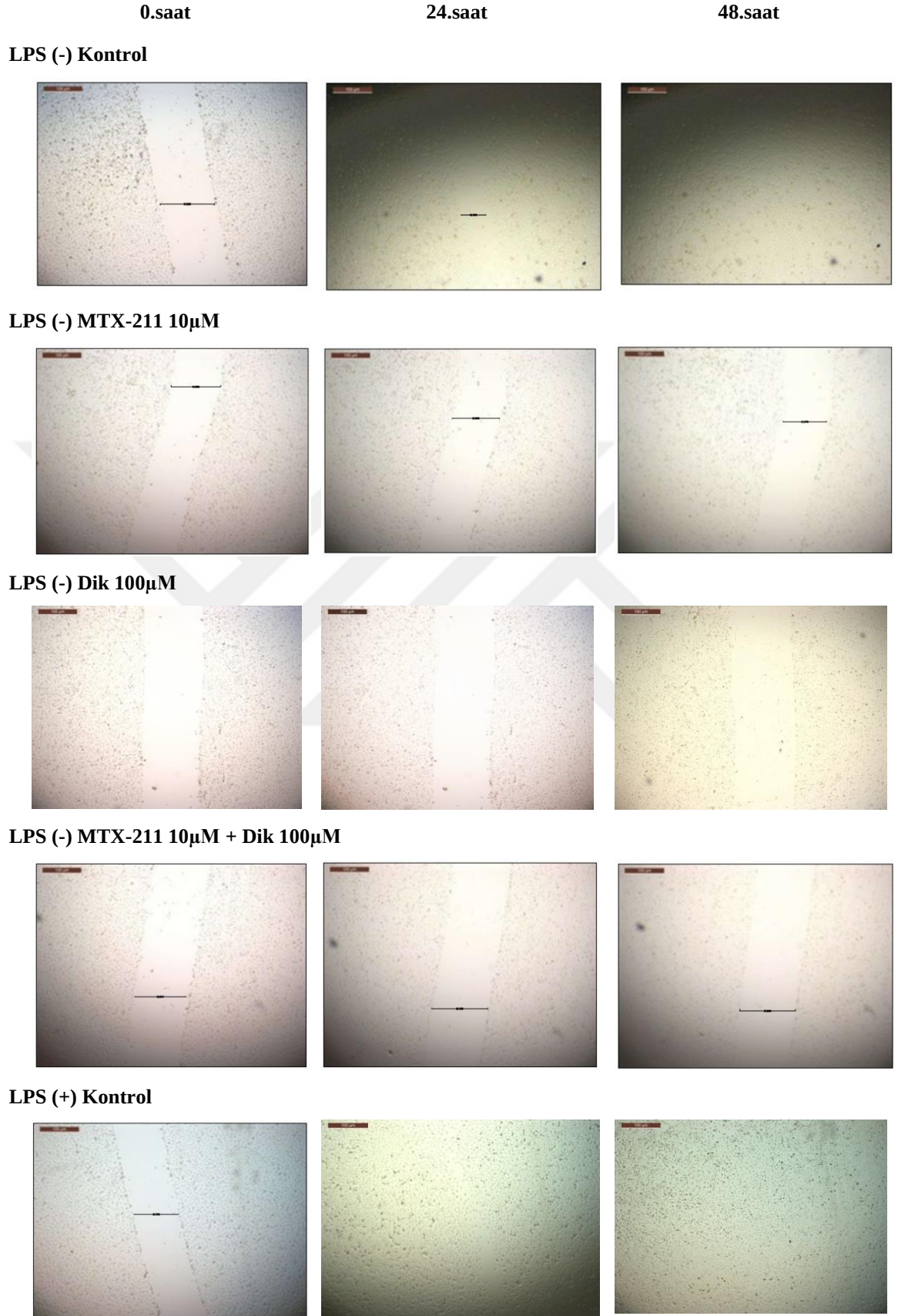
arkadaşları tarafından LPS'nin *in vitro* U87 hücre göçünü hızlandırabildiği bildirilmiştir (Thuringer vd., 2015). Bedini ve arkadaşları tarafından 2017'de (Bedini vd., 2017) LPS'nin hücre proliferasyonu ve migrasyonu üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yapılan deneylerde LPS (10 ng/ml)'nin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda U87MG hücre proliferasyonunu arttırdığını ve çizik deneyinde TLR4 reseptörleri aracılığıyla hücre migrasyonunu uyardığı bildirilmiştir. Sarrazy ve arkadaşları tarafından U118MG ve U87MG glioblastoma hücre hatlarında Fas ve TLR4 reseptörleri aracılığıyla hücre proliferasyonu ve migrasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Sarrazy vd., 2011).

U87MG hücre hattında, EGFR inhibitörü gefitinib anjiyogenezin önemli belirteçleri olan VEGF ve MMP protein düzeylerini düşürüp antianjiyojenik etki meydana getirmekte (Karami vd., 2021), diklofenak migrasyonu kontrole göre istatistiksel olarak çok önemli farkla inhibe etmektedir (Gerthofer vd, 2018).

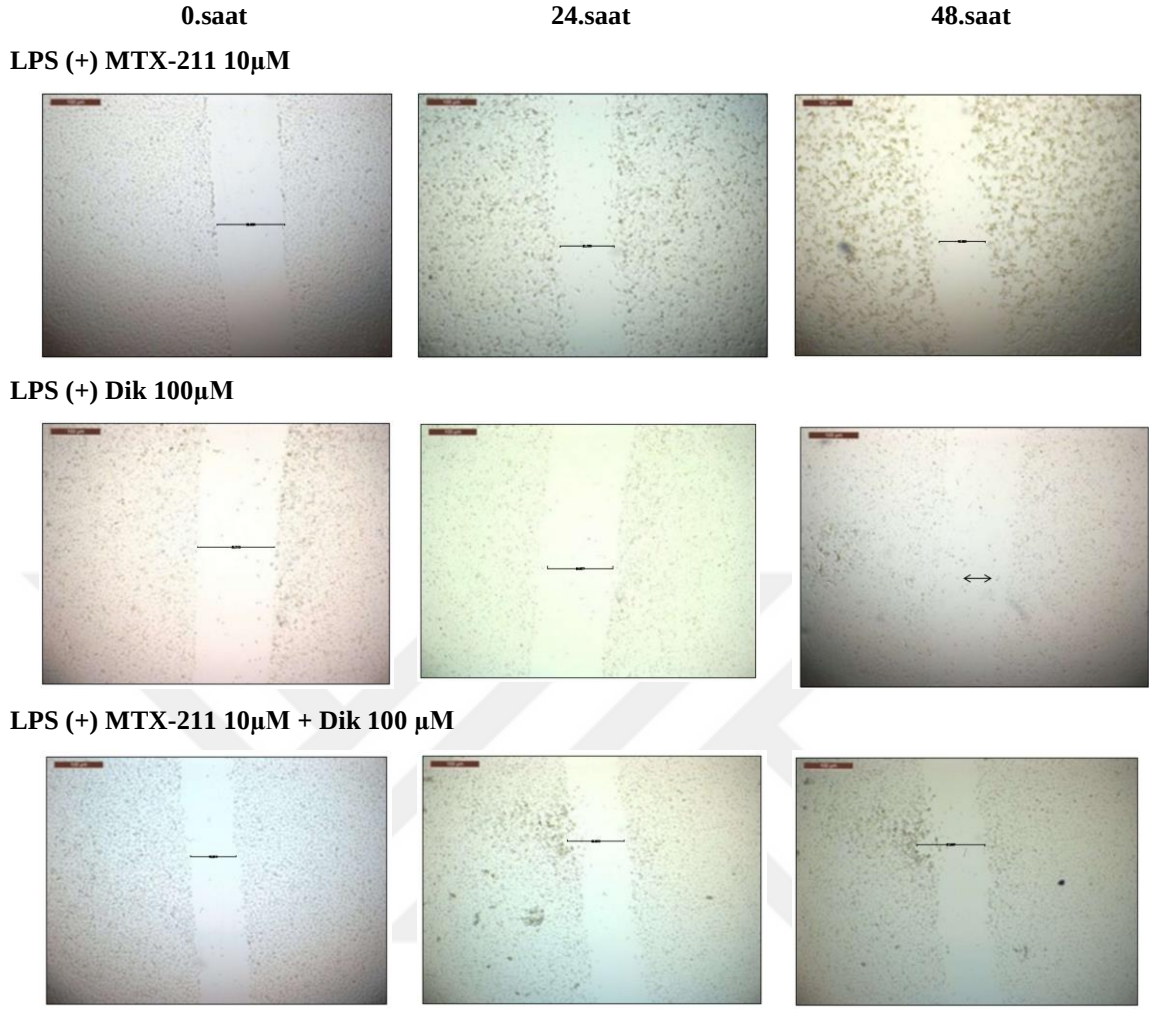
Erlotinib, selekoksib ve kombinasyonları H1650 ve HCC827 akciğer kanseri hücre hatlarında anjiyogenez belirteci cd31 düzeyini inhibe ederek kontrole göre istatistiksel anlamlılık selekoksib ile $p<0.05^*$, erlotinib ile $p<0.01^{**}$ ve kombinasyon terapisi ile tamamına yakınına inhibe edilerek erlotinibe oranla istatistiksel anlamlılık $p<0.01^{**}$ bulunmuştur. VEGF-A protein ekspresyonlarını da sırasıyla azdan çoğa selekoksib ($p<0.05^*$), erlotinib ($p<0.01^{**}$) ve kombinasyon (erlotinibe kıyasla $p<0.01^{**}$) neredeyse tamamına yakınına inhibe ederek güçlü antianjiyojenik etki meydana getirmiştir (Li vd., 2016).

5.2.7. HUVEC ve THP-1 ko-kültürde (insertlü) HUVEC hücrelerinin migrasyonunun değerlendirilmesi

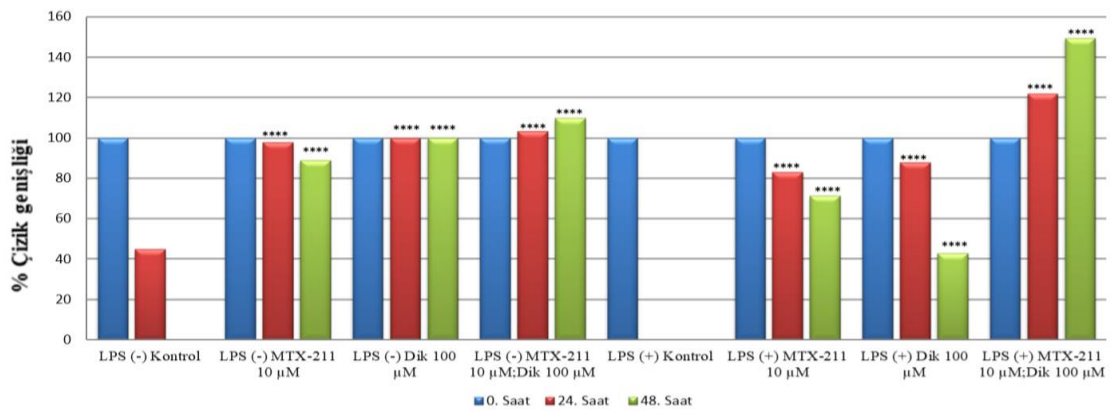
MTX-211 ve diklofenak dietilaminin (Dik) HUVEC ve THP-1 ko-kültürde antianjiyojenik etkilerini değerlendirmek amacı ile çizik deneyi yapılmıştır. HUVEC hücrelerinin MTX-211 ve diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının uygulandığı zaman aralığında, konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücrelerin ne kadar bölündüğü veya hareket ettiği gözlemlenmiştir. İlaç uygulamasından sonra 0., 24. ve 48. saatlerde fotoğraflanmış ve Leica LAS Görüntü Analizi programı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve grafik oluşturulmuştur (Şekil 5.29). **Şekil 5.28'**de görüldüğü üzere konsantrasyonlar uygulandıktan sonra 0., 24. ve 48. saat görüntüler alınmıştır.



Şekil 5.28: MTX-211 (10 µM), diklofenak dietilamin (100 µM) ve kombinasyonlarının HUVEC hücre migrasyonu üzerindeki etkilerinin 0., 24. ve 48. saat görüntüleri (10X)



Şekil 5.28: (Devam) MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının HUVEC hücre migrasyonu üzerindeki etkilerinin 0., 24. ve 48. saat görüntüleri (10X)



Şekil 5.29: MTX-211 (10 μ M), diklofenak dietilamin (100 μ M) ve kombinasyonlarının HUVEC hücre migrasyonu üzerindeki etkilerinin 0., 24. ve 48. saatteki % çizik genişlikleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, n=3, ortalama $\pm$ standart sapma, p>0.05 fark yok, p<0.0001**** çok önemli fark var, Ort $\pm$ Standart Sapma n=3))

Konsantrasyonlar uygulandıktan 24 ve 48 saat sonraki sonuçlar kontrol grubuna göre kıyaslandığında, MTX-211 ve diklofenak dietilaminin zamana bağlı olarak HUVEC hücreleri üzerinde etkili oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 5.28).

İlaç uygulamasından 24 saat sonraki sonuçlar kontrol grubuna göre kıyaslandığında, MTX-211 ve diklofenak dietilaminin zamana bağlı olarak HUVEC hücreleri üzerinde etkileri olduğu gözlemlenmiş ve LPS'nin HUVEC hücre migrasyonunu indüklediği ve 24 saatlik inkübasyonu sonucu çizik tamamen kapandığı gözlemlenmiştir.

Kontrol grubu hücrelerinde 24 saat sonra %55 migrasyon gözlemlenirken, LPS'siz ortamda migrasyon MTX-211 ile %2.01 olarak ölçülmüş, diklofenak dietilamin ile migrasyon gözlemlenmemiş, LPS ile çizik tamamen kapanmış ve LPS'li ortamda MTX-211 ve diklofenak dietilamin ile migrasyon sırasıyla %16.80 ve %12.1 olarak ölçülmüş ve kontrole göre istatistiksel olarak çok önemli farka sahip olacak şekilde migrasyonu baskılamışlardır. LPS'siz ve LPS'li ortamda kombin uygulamalarda hücre migrasyonu gözlemlenmemiş aksine çizik genişliği daha çok artarak sırasıyla %103.28 ve %121.91 olarak ölçülmüştür. Bunun nedeni hücreler LPS, MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonu ile muamele edildiğinde apoptoza eğilim artmış ve zaman geçtikçe hücrelerde azalma gözlemlenmiştir.

İlaç uygulamasından 48 saat sonraki ölçümlere göre (Şekil 5.28) LPS'siz ve LPS'li kontrol grubunda oluşturduğumuz çizik tamamen kapanmış, LPS'siz ortamda hücre HUVEC hücre migrasyonu MTX-211 ile %11.11 olarak ölçülürken diklofenak dietilamin ile hiç gözlemlenmemiş ve LPS'li ortamda sırasıyla %28.7 ve %57.11 olarak ölçülmüştür. MTX-211 ve diklofenak dietilamin kombin uygulamalarda LPS'siz ve LPS'li ortamda çizik genişliği sırasıyla %109.96 ve %149.53 olarak ölçülmüştür. Bunun nedeni 24 saatlik sonuçlarda belirttiğimiz gibi hücreler apoptoza uğradıklarından hücre sayısında azalmaların olmasıdır.

MTX-211 ile çizik deneyi ilk kez bu tez çalışmasında yapılmıştır. EGFR inhibitörü HS-10296 ile HUVEC migrasyonunun transwell deneyi ile araştırıldığı bir çalışmada, kontrole göre hücre göçünün azaldığı ve kinaz inhibitörü famitinib ile kombine tedavi ile migrasyonun inhibiyonunun büyük ölçüde güçlendiği belirlenmiştir (Zhang vd., 2021).

Hücre istilas, anjiyogenezde endotel hücrelerinin kritik bir fonksiyonudur. Doku büyümesi ve olgunlaşması için temel bir adım olan anjiyogenez, sıklıkla tümörlerde büyüme, genişleme ve metastazda rol oynayan patolojik bir süreçtir (Hall vd., 2015). EGFR inhibitörü erlotinib ve COX-2 inhibitörü selekoksibin çeşitli kanserlerde anjiyogenezi ayrı ayrı hedefleyebildiğini öne süren çalışmalar mevcuttur (Reckamp vd., 2008).

Erlotinib ve selekoksib ile insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinin (NSCLC, HCC827 ve H1650) ksenograft modellerinde mikrodamar yoğunluğu incelenmiş, kontrol grubuna göre selekoksib, ardından erlotinib ve en az damar yoğunluğunun kombinasyon tedavisinde gözlemlendiği ve kontrole göre anlamlı derecede azalma meydana geldiği bildirilmiştir. Güçlü pro-anjiyogenik peptidlerden VEGF-A, CXCL1-2-3, IL-6, IL-8, IL-1 β ve VEGF-C gibi anjiyogenez aracılarının düzeyleri western blot analizi ile incelenmiş, kombinasyon grubunun en düşük peptid düzeylerine sahip olduğu belirlenmiştir. HUVEC hücrelerinde yapılan çizik deneyinde, kontrol grubuna göre hücre göçünün en çok kombinasyon tarafından inhibe edildiği, sonra erlotinib ve en az selekoksibin hücre göçünü azalttığı gösterilmiştir (Li vd., 2016). HUVEC hücre göçünü EGFR inhibitörünün COX-2 inhibitöründen daha güçlü bir şekilde inhibe etmesi deney sonuçlarımız ile uyumludur.

Tümör odaklı anjiyogenezin yeni bir *ex vivo* modeli kullanılarak, HT-29 kolon kanseri kaynaklı anjiyojenik yanıtlar, diklofenakın önleyici etkilerine karşı oldukça hassastır. HT-29 eksplantlarının diklofenak tedavisi, hücre dışı matriks yoluyla vasküler göçte ve hücre sayısında azalmaya neden olmaktadır. Eksplant verileriyle tutarlı olarak HUVEC hücrelerini de doz bağımlı inhibe etmekte ve anjiyogenezi engelleyebilmektedir (Isenberg vd., 2007).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Glioblastoma multiforme neredeyse tedavi edilemez durumda olan SSS'nin en yaygın, en agresif tümörüdür ve en tipik özelliklerinden biri EGFR overekspresyonu ve mutasyonlarıdır. EGFR'yi hedefleyen tirozin kinaz inhibitörleri, aşılar ve monoklonal antikorlar gibi farklı sınıf EGFR inhibitörlerinin, tümör baskılayıcı bir gen olan PTEN üzerinde inaktive edici mutasyonlara neden olduğu belirlenmiştir (Fenton vd., 2012). EGFR inhibitörlerinin kullanıldığı durumlarda, hücre büyümesi ve kanser hücresinin hayatta kalmasını sağlayan PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının negatif düzenleyicisi olan PTEN inaktivasyonu, PI3K aktivasyonuna ve dolayısıyla tedaviye direnç gelişmesine neden olmaktadır. EGFR inhibitörleri kullanılmasına rağmen glioblastoma dahil olmak üzere farklı kanser türlerinde bu tür direnç gelişimi gözlemlenmiştir (Taylor vd., 2012; Clark vd., 2012; Turke vd., 2010). Hem EGFR'yi hedeflemek hem de EGFR'yi hedeflerken PI3Kinaz'ın aktivasyonu yoluyla meydana gelen direnci kırmak için son derece uygun bir aday olan dual etkili MTX-211, hem tümör mikroçevresi hem de kronik inflamasyonla ilişkili yüksek mPGES-1 ve PGE2 seviyelerini (Nakanishi vd., 2013; Dubois, 2014) düşüren COX inhibitörü diklofenak dietilamin ile kombinasyon için ideal bir aday olabileceği varsayımıyla kanser hücrelerindeki etkinlikleri incelenmiştir.

Çalışmamızda ilk olarak MTX-211 (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M), diklofenak dietilaminin (50 μ M, 100 μ M, 300 μ M) ve kombinasyonlarının U87MG glioblastoma hücre hattında ve THP-1 ve HUVEC sağlıklı hücre hatlarında sitotoksik etkileri araştırılmış, farklı konsantrasyonlardaki kombin uygulamaların ilaç etkileşim katsayısı (CDI) hesaplamaları yapılarak, değişen konsantrasyonlarda hücreler üzerindeki sinerjistik, antagonist ve additif etkilerinin CDI hesaplamaları ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, CellTiter-Blue hücre canlılık testi sonuçlarına göre, MTX-211 ve diklofenak dietilamin U87MG hücre proliferasyonunu zaman ve artan konsantrasyonlara bağlı olarak güçlü bir şekilde inhibe etmiş, diklofenak dietilamin MTX-211 ile kombine uygulandığında hücre proliferasyonunu inhibe edici aktivitesini sinerjistik olarak güçlendirmiştir. THP-1 monosit hücre hattında kayda değer bir sitotoksik etkinin olmadığı belirlenmiştir. HUVEC hücre hattında 24 saatlik inkübasyon sonucunda kayda değer sitotoksik etki olmadığı, ancak 48 saatlik

inkübasyon sonucunda MTX-211 ve diklofenak dietilaminin artan dozlarıyla paralel olarak hücre çoğalmasının inhibe edildiği, kombin uygulanan gruplarda ise inhibisyonun daha da güçlendiği görülmüştür.

THP-1, HUVEC ve U87MG glioblastoma hücre hatlarında MTX-211 (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) ve diklofenak dietilaminin (50 μ M, 100 μ M, 300 μ M) antagonist/sinerjist etkileşimleri CDI formülüne göre 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda CellTiter-Blue testi absorbands sonuçlarının % hücre canlılık değerlerine dönüştürülmesiyle hesaplanarak değerlendirilmiştir.

THP-1 hücre hattında 24 saatlik bütün kombin uygulamalar additif etki (CDI = 1) meydana getirirmiş ancak 48 saatlik inkübasyon sonunda diklofenak dietilamin ve MTX-211 (50 μ M + 20 μ M), diklofenak dietilamin ve MTX-211 (100 μ M + 20 μ M), diklofenak dietilamin ve MTX-211 (300 μ M + 20 μ M) kombin uygulamalar additif etki (CDI = 1) meydana getirirken diğer bütün kombin uygulamaların antagonist etki (CDI > 1) oluşturdukları belirlenmiştir. HUVEC hücre hattında uygulanan kombinlerin 24 saatlik inkübasyon sonunda yapılan hesaplamalar ile additif etkili (CDI = 1) oldukları, ancak 48 saatlik inkübasyon sonunda sinerjistik etkili (CDI < 1) oldukları ve HUVEC hücre proliferasyonunu zamana bağlı olarak inhibe ettikleri belirlenmiştir. U87MG glioblastoma hücre hattında 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda bütün kombin uygulamaların sinerjistik etki (CDI < 1) meydana getirdikleri belirlenmiştir.

Gerek CellTiter-Blue testi ile yapılan sitotoksikite testleri gerekse CDI ile yapılan değerlendirmeler açısından elde edilen sonuçlar literatürde yer alan çalışmaları destekler niteliktedir. THP-1 monosit hücrelerinde sitotoksik etkide kontrole oranla kayda değer bir azalma olmaması (Renner vd., 2018; Choy vd., 2015) HUVEC hücrelerinde konsantrasyon ve zamana bağlı olarak sitotoksik etki görülmesi (Isenberg vd., 2007; Hu vd., 2023), U87MG glioblastoma hücrelerinde ciddi sitotoksikite görülmesi ile birlikte sağlıklı hücre duyarlılığının kanser hücre duyarlılığından düşük olduğu belirlenmiştir. Günümüzde kemoterapide kullanılan etken maddelerin kanser hücreleri kadar sağlıklı hücrelere de zarar verdiği bilinmektedir (Koparal, 2015). Test bileşiklerimizin sağlıklı hücre duyarlılığının düşük olması kemoterapide kullanılabilmeleri adına büyük bir avantajdır (Hu vd., 2023).

Kombinasyon tedavisinin bireysel ilaç tedavisinden üstün olduğu iyimserliğiyle birlikte, steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçların spesifik kanser inhibitörleriyle

kombinasyonunun etkilerinin araştırılmasına yönelik ilgi artmaktadır. Çoklu yolların eşzamanlı hedeflenebilmesi nedeniyle, farklı ajanların birleştirilmesi sonucu ilave ya da sinerjistik etki görülebilmektedir.

Artan çalışma sayıları malign hastalıkların gelişmesinde anahtar rol oynayan EGFR, PI3Kinaz ve COX-2'nin antikanser tedavide çekici hedefler olarak kabul edildiğini göstermektedir. EGFR inhibitörleri, PI3Kinaz inhibitörleri veya COX-2 inhibitörlerinin kombinasyonları ile çeşitli kanserlerde sinerjistik antitümör etki meydana getirmiştir (Li vd., 2016). Literatürde yer alan bilgilerle uyumlu olarak, MTX-211 ve diklofenak dietilamin kombinasyonu, U87MG glioblastoma hücrelerinde sinerjistik hücre ölümüne neden olmuştur. THP-1 monosit hücrelerinde sinerjistik sitotoksik etki meydana gelmemiştir. HUVEC hücrelerinde zamana bağlı sinerjistik etki meydana gelmiştir ve anjiyogenezin önlenmesi açısından bu etki önemlidir.

Ko-kültür çalışmalarından önce MTX-211 ve diklofenak dietilaminin gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde U87MG hücre hattında proliferasyon ve migrasyon üzerindeki etkileri incelenmiştir. MTX-211'in 48. saatte IC50 konsantrasyonu 9.187 µM olarak tespit edilmiş (Şekil 5.8), keskin bir artışın gözlemlendiği kontrol grubuna kıyasla MTX-211'in migrasyonu inhibe ettiği (Şekil 5.9) ve artan konsantrasyonları ile inhibisyonun arttığı belirlenmiştir. İnvasyon ve migrasyon ile temsil edilen yaygın invazivlik, GBM'nin en önemli özelliği olup, terapötik başarısızlığın ve tümörün nüksetmesinin ana nedenidir. Bu nedenle MTX-211 ile migrasyonun inhibisyonu son derece önemlidir.

Ko-kültürde amaç tümör ve tümör mikroçevresi arasındaki ilişkiyi vücut içindeki haliyle (*in vivo* koşulları) taklit etmek ve hücreler arasındaki iletişimi sağlamaktır. THP-1 hücreleri *in vitro* hücre-hücre etkileşimini incelemek için en uygun seçeneklerden biri olduğundan ve *in vivo* koşulları iyi taklit ettiklerinden dolayı (Chanput vd., 2014) TMC'nin inflamasyonlu ortamını taklit etmek adına LPS ile aktive edilerek U87MG glioblastoma hücreleri ile ko-kültür oluşturulmuş ve bu ortamda MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonunun antiproliferatif, apoptotik, antienflamatuar, antimetastatik ve antianjiyojenik etkileri tarafımızca incelenmiştir.

U87MG ve THP-1 ko-kültürde 96 saat süresince LPS ve MTX-211'in proliferasyona etkisinin incelendiği çalışmada (Şekil 5.10) LPS'nin proliferasyonu baskıladı ve artan MTX-211 konsantrasyonları ile bu etkinin arttığı belirlenmiştir.

Aktif madde olarak Coley toksininden LPS izole edildiğinden beri (Shear ve Turner, 1943) LPS'nin antikanser etkisi altında yatan mekanizma, *in vivo* hayvan modelleri ve *in vitro* hücre hatları kullanılarak uzun zamandır araştırılmaktadır. Elde ettiğimiz bu sonuç, LPS'nin farklı tip kanser hücre proliferasyonunu azalttığı ve tümör boyutlarını küçülttüğü literatür bilgisi ile uyumludur (Goto vd., 1996; Gonçalves vd., 2016).

Proliferasyon artışıyla karakterize edilen kanserin tedavisinde, apoptozun indüklenmesi hedefe yönelik tedavinin temel yaklaşımlarından biri olmuş (Akşit vd., 2008), test bileşiklerimiz ve kombinasyonlarının apoptotik etkileri Annexin V-PI ve Kaspaz-3 ile tarafımızca incelenmiştir. Kapsamlı literatür taramamızda LPS'nin *in vivo* deney hayvanlarında ve çeşitli *in vitro* kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarda apoptozu tetiklediği bildirilmiş (Reisser vd., 2002; Wona vd., 2003), Annexin V-PI ve Kaspaz-3 deney sonuçlarımızla bu bilgi teyit edilmiştir.

MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının hücre canlılığını azaltması sonucumuz ile paralel olarak, LPS'siz kontrole göre bütün deney gruplarında erken apoptoz artışı belirlenmesi, geç apoptoz ve nekrotik hücre görülmemesi sonuçlarımız açısından önemlidir. MTX-211'in U87MG hücrelerinde aktif kaspaz-3 seviyelerini arttırmış olması ilk kez bu tez çalışmasında belirlenmiştir. Kaspaz-3 deneyi ile apoptotik etkinin en önemli göstergelerinden biri olan aktif kaspaz-3 yüzdesinin, LPS, MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının uygulanması ile arttığı tespit edilmiştir.

Kronik inflamasyonun, proinflamatuvar sitokinlerin ve diğer immünomodülatörlerin salınımına yol açarak, tümör ilerlemesi ve metastaz için uygun bir mikro-ortam yaratması nedeniyle, kanser ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu iyi bilinmektedir. Bir yandan inflamasyon karsinogenezi, malign transformasyonu, tümör büyümesini, invazyonu ve metastatik yayılmayı desteklerken öte yandan tümör büyümesini sınırlayabilecek bağışıklık mekanizmalarını uyarabilen pleiotropik etkiler göstermektedir. Tümör mikroçevresinde yer alan hücreler arası çoklu etkileşimler bir yandan yaralanmayı takiben doku onarımını kolaylaştırırken diğer yandan aktive edilmiş inflamatuvar hücreler ve inflamatuvar mediyatörlerin salınımı glioblastomada proliferasyonu, anjiyogenezi ve invazyonu desteklemekte ve ayrıca tümör hücrelerinin moleküler evrimine de katkıda bulunmaktadır (Bayramova, 2021).

Test bileşiklerimizin proinflatuar sitokin düzeylerine etkilerini incelediğimiz çalışmada, U87MG hücrelerinde IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF α proinflatuar sitokinlerin eksprese edildiği belirlenmiş, özellikle IL-6 ve IL-8'in diğer sitokinlere kıyasla yüksek oranda bulunduğu tespit edilmiştir (Ginting vd., 2017). LPS, U87MG hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon sonunda IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF α sitokin ekspresyonlarını indüklemiştir (Malefyt vd., 1991). LPS, kaspaz-1, -3, -7, -8 ve -9'u aktive edip apoptoz ve nekrozu indükleyerek hücre ölümüne neden olurken proinflatuar sitokin üretimini arttırması sonucu da inflamasyona neden olmaktadır (Cohen, 1997).

MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonları proinflatuar sitokin düzeylerinde azalma meydana getirmiş, MTX-211 IL-1 β , IL-6 ve IL-8'i daha yüksek duyarlılıkla inhibe ederken, diklofenak dietilamin IL-10 ve TNF α 'yı MTX-211'e göre daha yüksek duyarlılıkla inhibe etmiştir. *İn vitro* ortamda astrosit proliferasyonunu indüklemesi (Maruno vd., 1997), *in vivo* ortamdaki inhibisyonu ile farelerin yaşam süresinin uzamasından dolayı (Lachman vd., 1987; Selmaj vd., 1990) SSS hastalıklarında büyüme faktörü gibi davranan TNF α 'nın inhibisyonu tümör progresyonunun önlenmesi açısından önemlidir. Gliomaların en temel özelliği olan yüksek invazivliğe ve glioma progresyonuna (Chen vd., 2015) ve apoptozu önleyerek proliferasyonunun artmasına neden olan IL-6 düzeylerinin (Piperi vd., 2011), glioma hücrelerinin hayatta kalması, proliferasyonu, endotelyal hücre göçü ve MMP'lerin aktivasyonunu etkileyen, kanser ve inflamasyonda güçlü bir anjiyogenez aracısı olan IL-8 düzeylerinin (Chen vd., 1999), JAK-STAT3 yolağı ile tümör hücresi çoğalmasını, migrasyonunu ve invazyonunu düzenleyen (Riley vd., 1999, Qi vd., 2016) IL-10 gibi immunsupresif sitokin ekspresyonlarının (Authier vd., 2015) test bileşiklerimiz ile inhibisyonu, sitokinlerin katkıda bulunduğu glioblastoma hücre proliferasyonunun, invazyonun, migrasyonun, anjiyogenezin önlenmesi açısından son derece önemlidir.

U87MG hücrelerinde IL-1 β ve TNF α gibi sitokinlerin COX-2 ekspresyonunu dikkate değer ölçüde arttırdığı bilinmektedir (Taniura vd., 2008). Proinflatuar sitokin düzeylerinin artması COX-2 indüksiyonuna ve dolayısıyla PGE2 artışı ile de siklik inflamasyon fırtınasına neden olmaktadır (Dean ve Hooks, 2023). Test bileşiklerimiz ile hem proinflatuar sitokinlerin hem de COX-2 ekspresyonlarının azalması sonucu

siklik inflamasyon fırtınasının inhibisyonu gerçekleşmekte ve güçlü antienflamatuar etki meydana gelmektedir.

U87MG glioblastoma hücrelerinin morfolojik yapıları MTX-211 ve diklofenak dietilamin ile değişmiştir. Gözlemlerimiz, EGFR inhibitörü gefitinib (Chang vd., 2011) ve PI3Kinaz inhibitörü buparlisib (Speranza vd., 2016) ile de glioma hücre morfolojisinin değiştiği bilgisini desteklemektedir.

U87MG ve THP-1 ko-kültürde LPS, MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının U87MG hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkilerini incelediğimiz çalışmada, U87MG hücre göçünü LPS indükleyerek tümör metastazına katkıda bulunurken (Thuringer vd., 2015) MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonları inhibe etmiştir. Glioblastoma, komşu beyin dokularına geniş ölçüde kanser hücrelerinin sızarak tümörlerin tam rezeksiyonunu imkansız hale getiren en kötü huylu astrositomdur (Qi vd., 2017). Cerrahi ve radyoterapinin tüm çabalara rağmen başarısızlığının temel nedeni olan malign hücre migrasyonunun test bileşiklerimiz ile kontrol grubuna göre istatistiksel olarak çok önemli farkla azalmış olması son derece önemli bir sonuçtur.

HUVEC ve THP-1 ko-kültürde LPS, MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonlarının HUVEC hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkilerini incelediğimiz çalışmada, önceki çalışmalarda belirtildiği gibi LPS'nin HUVEC hücre migrasyonunu güçlü bir şekilde tetiklediğini çalışmamız desteklemiştir (Liu vd., 2017). MTX-211, diklofenak dietilamin ve kombinasyonları HUVEC hücre migrasyonunu inhibe etmiştir. U87MG hücre migrasyonunda MTX-211 daha güçlü inhibisyon meydana getirirken diklofenak dietilamin HUVEC hücre migrasyonunu daha güçlü inhibe etmiştir. Tüm solid tümörler arasında beyindekiler en yüksek derecede vasküler proliferasyon göstermekte ve anjiyogenez, gliomaların ilerlemesinde anahtar bir olay olarak kabul edilmektedir. Beyin tümörlerinde neovaskülarizasyon, bunların biyolojik agresifliği, malignite derecesi ve klinik nüksü ile doğrudan ilişkilirken, hastaların ameliyat sonrası hayatta kalma oranıyla ters ilişkilidir. Gliomalarda çoğunlukla kemoterapi, radyoterapi, mevcut cerrahi ve adjuvan tedavilere direnç olduğundan, anjiyogenez konusu ve bunun tümör büyümesi, ilerlemesi ve tedaviye dirençle ilişkisi özel ilgi konusudur (Fischer vd., 2005).

Tez çalışmamızın tedavisi zor, ortalama sağkalımı 12 ay olan, en agresif malignitelerden biri olan glioblastoma multiformenin tedavisine ışık tutabileceğini, MTX-211 ve diklofenak dietilamin ile ilgili daha detaylı araştırmalar yapılması, aktivite mekanizmalarının aydınlatılması ve *in vivo* çalışmalarla da incelenmesi ile glioblastoma multiforme tedavisine yönelik kullanımlarının mümkün olabileceğini düşünmekteyiz.



KAYNAKÇA

- Aaronson D.S., Horvath C.M. (2002). A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science*, 296:1653–1655.
- Abecunas C, Whitehead C.E., Ziemke E.K., Baumann D.G., Frankowski-McGregor C.L., Sebolt-Leopold J.S., Fallahi-Sichani M. (2023). Loss of NF1 in Melanoma Confers Sensitivity to SYK Kinase Inhibition. *Cancer Res*, 83:316–331.
- Ada S, Ertürk C, Uçar A, Akyüz S, Doğan F, Yücel B. (2021). Kanser hücre metabolizması. *Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı Dergisi*. 66-75.
- Adams H, Chaichana K.L., Avendano J, Liu B, Raza S.M., Quinones-Hinojosa A. (2013). Adult cerebellar glioblastoma: Understanding survival and prognostic factors using a population-based database from 1973–2009. *World Neurosurg.*, 80(6):e237-43.
- Agnihotri S, Wolf A, Munoz D.M., Smith C.J., Gajadhar A, Restrepo A, Clarke I.D., Fuller G.N., Kesari S, Dirks P.B. (2011). A GATA4-regulated tumor suppressor network represses formation of malignant human astrocytomas. *J. Exp. Med.*, 208:689–702.
- Agnihotri S, Wolf A, Picard D, Hawkins C, Guha A. (2009). GATA4 is a regulator of astrocyte cell proliferation and apoptosis in the human and murine central nervous system. *Oncogene*, 28:3033–3046.
- Ahn S.H., Park H, Ahn Y.H., Kim S, Cho M.S., Kang J.L., Choi Y.H. (2016). Necrotic cells influence migration and invasion of glioblastoma via NF- κ B/AP-1-mediated IL-8 regulation. *Sci. Rep.*, 6:24552.
- Akdeniz D, Tunçer Ş.B., Yazıcı H. (2018). PTEN Gen Yolağı ve Meme Kanseri Arasındaki İlişki. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 71(2):105-110.
- Akil H, Abbaci A, Lalloué F, Bessette B, Costes L.M.M., Domballe L. (2015). IL22/IL-22R pathway induces cell survival in human glioblastoma cells. *Plos One*, 10: e0119872.

- 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.
- Alvarez J.I., Teale J.M. (2008). Multiple expression of matrix metalloproteinases in murine neurocysticercosis: implications for leukocyte migration through multiple central nervous system barriers. *Brain Res*, 1214:145–58.
- Amano H, Hayashi I, Endo H. (2003). Host prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J Exp Med*, 197(2):221–232.
- American Cancer Society. (2023). Cancer Facts & Figures. Atlanta: *American Cancer Society Inc.*
- Amini R, Karami H, Bayat M. (2021). Combination Therapy with PIK3R3-siRNA and EGFR-TKI Erlotinib Synergistically Suppresses Glioblastoma Cell Growth In Vitro. *Asian Pac J Cancer Prev*, 22(12):3993-4000.
- Amirian E.S., Armstrong G.N., Zhou R, Lau C.C., Claus E.B., Barnholtz-Sloan J.S., Il'yasova D, Schildkraut J, Ali-Osman F, Sadetzki S, Johansen C, Houlston R.S., Jenkins R.B., Lachance D, Olson S.H., Bernstein J.L., Merrell R.T., Wrensch M.R., Davis F.G., Lai R, Shete S, Amos C.I., Scheurer M.E., Aldape K, Alafuzoff I, Brannstrom T, Broholm H, Collins P, Giannini C, Rosenblum M, Tihan T, Melin B.S., Bondy M.L. (2016). The glioma international case-control study: A report from the genetic epidemiology of glioma international consortium. *Am J Epidemiol*, 183:85-91.
- Amirian E.S., Zhou R, Wrensch M.R., Olson S.H., Scheurer M.E., Il'yasova D, Lachance D, Armstrong G.N., McCoy L.S., Lau C.C., Claus E.B., Barnholtz-Sloan J.S., Schildkraut J, Ali-Osman F, Sadetzki S, Johansen C, Houlston R.S., Jenkins R.B., Bernstein J.L., Merrell R.T., Davis F.G., Lai R, Shete S, Amos C.I., Melin B.S., 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 Epidemiol Biomarkers Prev*, 25(2):282-90.

- An Z, Aksoy O, Zheng T, Fan, Q.W., (2018). Weiss, W.A. Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: Signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene*, 37:1561–1575.
- Andersson V.G., Delmas C, Taurand M, Martinez-Gala J, Evrard S, Mazoyer S, Toulas C, Cohen E, Moyal J. (2016). FGFR1 Induces Glioblastoma Radioresistance through the PLCg/Hif1a Pathway Valerie Gouaz. *Cancer Res*, 76(10).
- Andersson V.G., Ghérardi M.J., Lemarié A, Gilhodes J, Lubrano V, Arnauduc F, Cohen E, Moyal J, Toulas C. (2018). FGFR1/FOXO1 pathway: a key regulator of glioblastoma stem cells radioresistance and a prognosis biomarker. *Oncotarget*, 9(60):31637-31649.
- Andrews L.J., Thornton Z.A., Saincher S.S., Yao I.Y., Dawson S., McGuinness L.A., Jones H.E., Jefferies S, Short S.C., Cheng H.Y., McAleenan A, Higgins J.P.T., Kurian K.M. (2021). Prevalence of BRAFV600 in glioma and use of BRAF Inhibitors in patients with BRAFV600 mutation-positive glioma: systematic review. *Neuro-Oncology*, 24(4):528–540.
- Authier A, Farrand K.J., Broadley K.W.R., Ancelet L.R., Hunn M.K., Stone S, McConnell M.J., Hermans I.F. (2015). Enhanced immunosuppression by therapy-exposed glioblastoma multiforme tumor cells. *Int. J. Cancer*, 136:2566–2578.
- Azevedo Martins J.M., Rabelo-Santos S.H., do Amaral Westin M.C., Zeferino L.C. (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.
- Baigent C, Bhala N, Emberson J. (2013). Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials. *The Lancet*, 382(9894):769–779.
- Bajaj P, Ballary C.C., Dongre N.A. (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.

Baran Y, Kiraz Y. Kanser Moleküler Biyolojisi, Bölüm 1:1-12

Baratelli F, Lee J.M., 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.

Baratelli F, Lin Y, Zhu L. (2005). Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. *J Immunol*, 175(3):1483–1490.

Baş Topcu K.S. (2022). Tümör İlerlemesinde Tümör Mikroçevrenin Rolü. *Türk Nöroşir Derg*, 32(1):98-104.

Batchelor T.T., Gerstner E.R., Emblem K.E., Duda D.G., Kalpathy-Cramer J, Snuderl M, Ancukiewicz M, Polaskova P, Pinho M.C., Jennings D, Plotkin S.R., Chi A.S., Eichler A.F., Dietrich J, Hochberg F.H., LuEmerson C, Iafrate A.J., Ivy S.P., Rosen B.R., Loeffler J.S., Wen P.Y., Sorensen A.G., Jain R.K. (2013). Improved tumor oxygenation and survival in glioblastoma patients who show increased blood perfusion after cediranib and chemoradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(47):19059-19064.

Batchelor T.T., Gerstner E.R., Emblem K.E., Duda D.G., Kalpathy-Cramer J, Snuderl M, Ancukiewicz M, Polaskova P, Pinho M.C., Jennings D, Plotkin S.R., Chi A.S., Eichler A.F., Dietrich J, Hochberg F.H., LuEmerson C, Iafrate A.J., Ivy S.P., Rosen B.R., Loeffler J.S., Wen P.Y., Sorensen A.G., Jain R.K. (2013). Improved tumor oxygenation and survival in glioblastoma patients who show increased blood perfusion after cediranib and chemoradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(47):19059-19064.

Bayram F. Tümör Mikroçevresinde ve Tümörde Etkin Yolakların Glioma Seyrindeki Rolü. 2022

Bedini A, Baiula M, Vincelli G, Formaggio F, Lombardi S, Caprini M, Spampinato S. (2017). Nociceptin/orphanin FQ antagonizes lipopolysaccharide-stimulated proliferation, migration and inflammatory signaling in human glioblastoma U87 cells. *Biochem Pharmacol*. 15:140:89- 104.

- Ben-Av P, Crofford L.J., Wilder R.L. (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.
- Berghoff A.S., Kiesel B, Widhalm G, Rajky O, Ricken G, Wöhrer A. (2015). Programmed death ligand 1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma. *Neuro Oncol*, 17:1064–75.
- Berishaj M, Gao S.P., Ahmed S, Leslie K, Al-Ahmadie H, Gerald W.L., Bornmann W, Bromberg J.F. (2007). Stat3 is tyrosine-phosphorylated through the interleukin-6/glycoprotein 130/ Janus kinase pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 9:R32.
- Bernardi A, Jacques-Silva M C., Delgado-Cañedo A, Lenz G, Battastini A.M.O. (2006). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit the growth of C6 and U138-MG glioma cell lines. *European Journal of Pharmacology*, 532:214–222.
- Beutler B, Cerami A. (1988). Cachectin (tumor necrosis factor): a macrophage hormone governing cellular metabolism and inflammatory response. *Endocr Rev*, 9:57-66.
- Bird C, Kirstein S. (2009). Real-time, label-free monitoring of cellular invasion and migration with the xcelligence system. *Nature Methods*, v-vi.
- Bird C, Kirstein S. (2009). Real-time, label-free monitoring of cellular invasion and migration with the xcelligence system. *Nature Methods*, 6.
- 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
- Boğa C. (2009). Akım sitometri ile apoptozis tayini. Sözer O, Ed. Klinik ve pratikte akım sitometri, 1. baskı, Haberal Eğitim Vakfı, 155-158.
- Boguszewski C.L., Boguszewski M.C.S. (2019). Growth Hormone's Links to Cancer. *Endocr. Rev.*, 40(2):558-574. [CrossRef] doi: 10.1210/er.2018-00166.
- Bonavia R, Inda M.M., Vandenberg S, Cheng S.Y., Nagane M, Hadwiger P, Tan P, Sah D.W., Cavenee W.K., Furnari F.B. (2012). EGFRvIII promotes glioma

- angiogenesis and growth through the NF- κ B, interleukin-8 pathway. *Oncogene*, 31(36):4054-4066.
- Boveri T. Zur frage der Entstehung maligner Tumoren. G. Fischer Jena, 1914.
- Braganhof E, Kukulski F, Lévesque S.A., Fausther M, Lavoie E.G., Zanotto-Filho A, Bergamin L.S., Pelletier J, Bahrami F, Ben Yebdri F, Fonseca Moreira J.C., Battastini A.M., Sévigny J. (2015). Nucleotide receptors control IL8/CXCL8 and MCP-1/CCL2 secretions as well as proliferation in human glioma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1852(1):120-130.
- Brat D.J., Bellail A.C., Van Meir E.G. (2005). The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-oncol*, 7(2):122-133.
- Brennan C.W., Verhaak, R.G., McKenna, A, Campos B, Nounshmehr H, Salama S.R., Zheng S, Chakravarty D, Sanborn J.Z., Berman S.H. (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*, 155:462–477.
- Broca P. Traité des tumeurs. P. Asselin, 1866.
- Brodbeck A, Greenberg D, Winters T, Williams M, Vernon S, Collins V.P. (2015). Glioblastoma in England: 2007–2011. *Eur. J. Cancer*, 51:533–542.
- Bruyère C, Mijatovic T, Lonz C, Spiegel-Kreinecker S, Berger W, Kast R.E., Ruysschaert J.M., Kiss R, Lefranc F. (2011). Temozolomide-induced modification of the CXC chemokine network in experimental gliomas. *Int. J. Oncol*, 38(5):1453-1464.
- Burrell R.A., McGranahan N, Bartek J, Swanton C. (2013). The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*, 501:388-345.
- Cai N, Dai S.D., Liu N.N., Liu L.M., Zhao N, Chen L. (2012). PI3K/AKT/mTOR signaling pathway inhibitors in proliferation of retinal pigment epithelial cells. *Int J Ophthalmol*, 5:675–680.
- Cardaci S. (2015). Pyruvate carboxylation enables growth of SDH-deficient cells by supporting aspartate biosynthesis. *Nat. Cell Biol*, 17:1317–1326.

- 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 Res Int*, 2017:9218486.
- Carpenter G, Cohen S. (1979). Epidermal growth factor. *Annu. Rev. Biochem.*, 48:193–216.
- Carswell E.A., Old U, Kassel R.L., Green S, Fiore N, Williamson B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72:3666-70.
- Chakrabarti I, Cockburn M, Cozen W, Wang Y.P., Preston-Martin S. (2005). A population-based description of glioblastoma multiforme in Los Angeles County, 1974–1999. *Cancer*, 104(12):2798-806.
- 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.
- Chaudhry A, Samstein R.M., Treuting P, Liang Y, Pils M.C., Heinrich J.M. (2011). Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity*, 34:566–78.
- Chen Z, Malhotra P.S., Thomas G.R., Ondrey F.G., Duffey D.C., Smith C.W., Enamorado I, Yeh N.T., Kroog G.S., Rudy S., McCullagh L., Mousa S, Quezado M, Herscher L.L., Van Waes C. (1999). Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin. Cancer Res*, 5(6):1369- 1379.
- Chen E.P., Smyth E.M. (2011). COX-2 and PGE2-dependent immunomodulation in breast cancer. Prostaglandins Other. *Lipid Mediators*, 96(1–4):14–20.
- Chen W, Gao Q, Han S, Pan F, Fan W. (2015). The CCL2/CCR2 axis enhances IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition by cooperatively activating STAT3-Twist signaling. *Tumour Biol*, 36:973-981.

- Cheo S.T.T., Lim G.H., Lim, K.H.C. (2017). Glioblastoma Multiforme Outcomes of 107 Patients Treated in Two Singapore Institutions. *Singap. Med. J.*, 58:41–45. [CrossRef]
- Ching M.M., Reader J, Fulton A.M. (2020). Eicosanoids in cancer: Prostaglandin E2 receptor 4 in cancer therapeutics and immunotherapy', *Frontiers in pharmacology, Front Media. S.A*, 11:819/BIBTEX.
- Chirasani S.R., Leukel P. Gottfried E. (2013) Diclofenac inhibits lactate formation and efficiently counteracts local immune suppression in a murine glioma model. *Int J Cancer*, 132(4):843–853.
- Chirasani S.R., Leukel P, Gottfried E. (2013). Diclofenac inhibits lactate formation and efficiently counteracts local immune suppression in a murine glioma model. *Int J Cancer*, 132(4):843–853.
- Chitambar, C.R., Purpi D.P. (2010). A novel gallium compound synergistically enhances bortezomib-induced apoptosis in mantle cell lymphoma cells. *Leukemia Research*, 34(7): 950–953.
- 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.*, 579:4213–4218.
- Christen S. (2016). Breast cancer-derived lung metastases show increased pyruvate carboxylase-dependent anaplerosis. *Cell Rep.*, 17:837–848.
- Chun K.S., Lao H.C., Langenbach R. (2010). The prostaglandin E2 receptor, EP2, stimulates keratinocyte proliferation in mouse skin by G protein-dependent and barrestin1- dependent signaling pathways. *J Biol Chem*, 285(51):39672–81.
- Chung R, Whaley J, Kley N, Anderson K, Louis D, Menon A, Hettlich C, Freiman R, Hedley-Whyte E.T., Martuza R, Jenkins R, Yandell D, Seizinger B.R. (1991). TP53 Gene Mutations and 17p Deletions in Human Astrocytomas. *Genes. Chromosomes & Cancer*, 3:323-331

- Clark P.A., Iida M, Treisman D.M. (2012). Activation of multiple ERBB family receptors mediates glioblastoma cancer stem-like cell resistance to EGFR-targeted inhibition. *Neoplasia*, 14(5):420-8.
- Cohen G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical Journal*, 326(Pt1):1–16.
- Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7):1073–81.
- Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7):1073–81.
- Colquhoun A. (2017). Cell biology-metabolic crosstalk in glioma. *Int J Biochem Cell Biol*, 89:171–81.
- Cote D.J., Downer M.K., Smith T.R., Smith-Warner S.A., Egan K.M., Stampfer M.J. (2018). Height Waist Circumference, Body Mass Index, and Body Somatotype across the Life Course and Risk of Glioma. *Cancer Causes Control*, 29(8):707-719.
- Crespo I, Vital A.L., Gonzalez-Tablas M, Patino M.C., Otero A, Lopes M.C., Oliveira C, Domingues P, Orfao A, Taberneroy M.D. (2015). Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *The American Journal of Pathology*, 185(7); 1820-1833.
- Cryer B, Feldman M. (1998). Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med*, 104(98):413–421.
- Davidson S.M. (2016). Environment impacts the metabolic dependencies of ras-driven non-small cell lung cancer. *Cell Metab*. 23:517–528.
- 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.

- DeAngelis L.M., Mellinghoff I.K. (2011). Virchow 2011 or How to ID(H) Human Glioblastoma. *J. Clin. Oncol.*, 29:4473–4474.
- DeBerardinis R.J., Chandel N.S. (2020). We need to talk about the Warburg effect. *Nat. Metab.*, 2:127–129.
- Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi M.G., Biagiotti R, Romagnani S. (1993). Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol*, 150:353–60.
- Digklia A, Voutsadakis IA. (2014). Thrombocytosis as a prognostic marker in stage III and IV serous ovarian cancer. *Obstet Gynecol Sci*, 57(6):457–463.
- Dikic I. (2003). Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation. *Biochem. Soc. Trans.*, 31:1178–1181.
- Dikmen M. (2017). Aprepitantin İnsan Glioblastoma U87MG Hücreleri üzerinde Antiproliferatif ve Apoptotik Etkileri. *Marmara Pharm J*, 21:156-164.
- Dikmen M, Kaya-Tilki E, Engür S, Öztürk Y. (2017) Neuritogenic Activity Of Epigallocatechin Gallate and Curcumin Combination on Rat Adrenal Pheochromocytoma Cells. *Fresenius Envir. Bull*, (26)7:4726-4733.
- Dispersyn G, Nuydens R, Connors R, Borgers M, Geerts H. (1999). Bcl-2 protects against FCCP-induced apoptosis and mitochondrial membrane potential depolarization in PC12 cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1428:357-371.
- Donson A.M., Apps J, Griesinger A.M., Amani V, Witt D.A., Anderson R.C.E. (2017). Molecular analyses reveal inflammatory mediators in the solid component and cyst fluid of human adamantinomatous craniopharyngioma. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 76:779–88.
- Dubois L.G., Campanati L, Righy C, D’Andrea-Meira I, Spohr T.C.L., de SE Porto-Carreiro I. (2014). Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier. *Front Cell Neurosci*, 8:418.

- Dubois R.N. (2014). Role of inflammation and inflammatory mediators in colorectal cancer *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 125:358–373.
- El Kathip M. Kanser Moleküler Biyolojisi, Bölüm 11:137-145.
- Engelhard H.H., Villano J.L., Porter K.R., Stewart A.K., Barua M, Barker F.G. (2010). Clinical presentation, histology, and treatment in 430 patients with primary tumors of the spinal cord, spinal meninges, or cauda equine. *J Neurosurg Spine*, 13:67–77.
- Esbona K, Yi Y.Y., Saha S, Yu M.G., Van Doorn R.R., Conklin M.W. (2022). The presence of cyclooxygenase 2, tumor-associated macrophages, and collagen alignment as prognostic markers for invasive breast carcinoma patients. *Am J Pathol*, 188(3):559–73.
- Fabbri E, Brognara E, Montagner G, Ghimenton C, Eccher A, Cantù C, Khalil S, Bezzerri V, Provezza L, Bianchi N, Finotti A, Borgatti M, Moretto G, Chilosi M, Cabrini G, Gambari R. (2015). Regulation of IL-8 gene expression in gliomas by microRNA miR-93. *BMC Cancer*, 15:661.
- Fabbro-Peray P, Zouaoui S, Darlix A, Fabbro M, Pallud J, Rigau V, Mathieu-Daude H, Bessaoud F, Bauchet F, Riondel A. (2019). Association of Patterns of Care, Prognostic Factors, and Use of Radiotherapy–Temozolomide Therapy with Survival in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma: A French National Population-Based Study. *J. Neurooncol.*, 142:91–101.
- Faubel S, Edelstein C.L. (2005). Caspases as drug targets in ischemic organ injury. Current drug targets. *Immune, Endocrine and Metabolic Disorders*, 5(3):269–287.
- Fehrenbacherb N, Bar-Sagia D, Philips M. (2009). Ras/MAPK signaling from endomembranes. *Molecular Oncology*, 3:297–307.
- 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.

- Filippini G, Falcone C, Boiardi A, Broggi G, Bruzzone M.G., Caldiroli D. (2008). Prognostic factors for survival in 676 consecutive patients with newly diagnosed primary glioblastoma. *Neuro Oncol*, 10(1):79-87.
- Frederick L.X. Wang Y, Eley G.C., James D. (2000). Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res.*, 60(5):1383-7.
- Galisteo A, Jannus F, García-García A, Aheget H, Rojas S, Lupiañez J.A., Rodríguez-Diéguez A, Reyes-Zurita F.J., Quílez del Moral J.F. (2021). Diclofenac N-Derivatives as Therapeutic Agents with Anti-Inflammatory and Anti-Cancer Effect. *Int. J. Mol. Sci.*, 22:5067.
- García-Hernández M.L., Hernández-Pando R, Gariglio P, Berumen J. (2002). Interleukin-10 promotes B16-melanoma growth by inhibition of macrophage functions and induction of tumour and vascular cell proliferation. *Immunology*, 105:231–43.
- Gatti R, Belletti S, Orlandini G, Bussolati O, Dall’asta V, Gazzola G.C. (1998). Comparison of Annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy, *J. Histochem. Cytochem.*, 46:895–900.
- Gay L.J., Felding-Habermann B. (2011). Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nature Rev Cancer*, 11(2):123–134.
- Gerthofer V, Kreutz M, Renner K, Jachnik B, Dettmer K, Oefner P, Riemenschneider M.J., Proescholdt M, Vollmann-Zwerenz A, Hau P, Seliger C. (2018). Combined Modulation of Tumor Metabolism by Metformin and Diclofenac in Glioma. *Int. J. Mol. Sci.* 19(2586): 1-16.
- Ghergurovich J.M., Lang J.D., Levin M.K., Briones N, Facista S.J., Mueller C, Cowan A.J., McBride M.J., Rodriguez E.S.R., Killian A, Dao T, Lamont J, Barron A, Su X, Hendricks W.P.D., Espina V, Hoff D.D.V., O’Shaughnessy J, Rabinowitz J.D. (2021). Local production of lactate, ribose phosphate, and amino acids by human triple-negative breast cancer. *Med (N Y)*, 2(6): 736–754.

- Ghosh Anirban C.S. (2010). Microglia action in glioma: A boon turns bane. *Immunol Lett*, 131:3–9.
- Ghosh M, Shubham S, Mandal K, Trivedi V, Chauhan R, Naseera S. (2017). Survival and Prognostic Factors for Glioblastoma Multiforme: Retrospective Single-Institutional Study. *Indian J. Cancer*, 54:362–367.
- Giering A, Pszczolkowska D, Walentynowicz K.A., Rajan W.D., Kaminska B. (2017). Immune microenvironment of gliomas. *Lab Invest*. 97:498–518.
- Ginting T.E., Suryatenggara J, Christian S, Mathew G. (2017). Proinflammatory response induced by Newcastle disease virus in tumor and normal cells. *Oncolytic Virotherapy*, 6:21–30.
- Gittleman H, Boscia A, Ostrom Q.T., Truitt G, Fritz Y.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. (2018). Survivorship in Adults with Malignant Brain and Other Central Nervous System Tumor from 2000–2014. *Neuro Oncol.*, 20: VII6–VII16.
- Gonçalves M, Cappellari Á.R., Avelino A, Junior S, Marchi F.O., Macchi F.S., Antunes K.H., Souza A.P.D., Morrone F.B. (2016). Effect of LPS on the Viability and Proliferation of Human Oral and Esophageal Cancer Cell Lines. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 59: e16150485.
- Goto S, Sakai S, Suma J.K.Y., Soma G.I., Takeuchi S. (1996). Intradermal administration of lipopolysaccharide in treatment of human cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 42:255–261.
- Gottfried E, Lang S.A., Renner K. (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 sıra (e-52862)’nın ve rimkazol’ün U87MG glioblastoma hücrelerinde sfingosin kinaz sinyal yolağı üzerinden antikanser etkisinin araştırılması.
- Graeber M.B., Scheithauer B.W., Kreutzberg G.W. (2002). Microglia in brain tumors. *Glia*, 40:252–259.
- Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L, Karin M. (2009). IL-6 and Stat3 are

- required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*, 15:103-113.
- Grochans S, Cybulska A.M., Simińska D, Korbecki J, Kojder K, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. (2022). Epidemiology of Glioblastoma Multiforme—Literature Review, *Cancers*, 14(10):2412.
- Groux H, Bigler M, de Vries J.E., Roncarolo M.G. (1998). Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. *J Immunol*, 160:3188–93.
- Gullick W.J., Marsden J.J., Whittle N, Ward B, Bobrow L, Waterfield M.D. (1986). Expression of Epidermal Growth Factor Receptors on Human Cervical, Ovarian, and Vulval Carcinomas. *Cancer Res.*, 46:285–292.
- Gupta T, Sarin R. (2002). Poor-prognosis high-grade gliomas: evolving an evidence-based standard of care. *Lancet Oncol.*, 3(9):557-64.
- Hall R.D., Le T.M., Haggstrom D.E., Gentzler R.D. Angiogenesis inhibition as a therapeutic strategy in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Transl Lung Cancer Res.* 2015; 4: 515-523.
- Hambardzumyan D, Gutmann D.H., Kettenmann H. (2015). The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci*, 19:1.
- Han S, Zhang C, Li Q, Dong J, Liu Y, Huang Y. (2014). Tumour-infiltrating CD4(+) and CD8(+) lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. *Br J Cancer*, 110:2560–8.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000). Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1):57-70.
- Hanahan D, Weinberg R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646-674.
- 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 2009–2014. *J. Neurooncol.*, 139:479–489.

- 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.
- Harris R.E. (2009). Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. *Inflammopharmacology*, 17:2.
- Goradel N.H., Najafi M, Salehi E, Farhood B, Mortezaee K. (2019). Cyclooxygenase2 in cancer: A review. *J Cell Physiol*, 234(5):5683–99.
- Helseth A, Tretli S. (1989). Pre-Morbid Height and Weight as Risk Factors for Development of Central Nervous System Neoplasms. *Neuroepidemiology*, 8(6):277-82.
- Hinz B, Brune K. (2002). Cyclooxygenase-2–10 years later. *J Pharmacol Exp Ther*, 300(2):367–75.
- Ho T, Jiang S, Lin G, Li T, Yiin L, Yang J, Hsieh M, Wu C, Lin J, Chen H. (2016). The in vitro and in vivo wound healing properties of the Chinese herbal medicine (jinchuang ointment). *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016:1-11.
- Hofer M, Hoferová Z, Fedoročko P. (2002). Hematopoiesis-stimulating and anti-tumor effects of repeated administration of diclofenac in mice with transplanted fibrosarcoma cells. *Physiol Res*, 51:629–632.
- Hoferová Z, Fedorocko P, Hofmanová J. (2002). The effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs ibuprofen, flurbiprofen, and diclofenac on in vitro and in vivo growth of mouse fibrosarcoma. *Cancer Invest*, 20(4):490–498.
- Hofman F.M., Hinton D.R. (1991). Cytokine interactions in the central nervous system. *Reg Immunol*, 3(5):268-78.
- Hopkins B.D., Hodakoski C, Barrows D, Mense S.M., Parsons R.E. (2014). PTEN function: The long and the short of it. *Trends Biochem. Sci.*, 39:183–190.

- Hotfilder M, Knupfer H, Mohlenkamp G, Pennekamp P, Knupfers M, Van Gool S, Wolff J.E. (2000). Interferon-gamma increases IL-6 production in human glioblastoma cell lines. *Anticancer Res*, 20:4445-4450.
- Howe LR, Subbaramaiah K, Kent CV. (2013). Genetic deletion of microsomal prostaglandin synthase-1 suppresses mouse mammary tumor growth and angiogenesis Prostaglandins Other Lipid. *Mediat*, 106(6):99–105.
- 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 P.H., Xu A.M., White F.M. (2009). Oncogenic EGFR Signaling Networks in Glioma. *Science Signaling*, 2(87): 1-13.
- Huang P.H., Xu A.M., White F.M. (2015). Oncogenic EGFR Signaling Networks in Glioma. *Cancer*, 2(87):re6.
- Hynes N.E., Lane H.A. (2005). ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer*, 5:341–354.
- Inskip P.D., Sigurdson A.J., Veiga L, Bhatti P, Ronckers C, Rajaraman P, Boukheris H, Stovall M, Smith S, Hammond S, Henderson T.O., Watt T.C., Mertens A.C., Leisenring W, Stratton K, Whitton J, Donaldson S.S., Armstrong G.T., Robison L.L., Neglia J.P. (2016). Radiation-related new primary solid cancers in the childhood cancer survivor study: Comparative radiation dose response and modification of treatment effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 94(4): 800–807.
- Isenberg J.S., 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.
- Jaattela M. (1991). Biologic activities and mechanisms of action of tumor necrosis factor- α /cachectin. *Lab Invest*, 64:724-42.

- Jiang J, Dingledine R. (2013). Prostaglandin receptor EP2 in the crosshairs of antiinflammation, anti-cancer, and neuroprotection. *Trends Pharmacol Sci*, 34(7):413–23.
- Jiang J, Qiu J, Li Q, Shi Z. (2017). Prostaglandin E2 Signaling: Alternative Target for Glioblastoma? *Trends in Cancer*, 3(2):75-78.
- Jiao Y, Killela P.J., Reitman Z.J., Rasheed B.A., Heaphy C.M., Wilde R.F., Rodriguez F.J., Rosenberg S, Oba-Shinjo S.M., Marie S.K.N. (2012). Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget*, 3:709–722.
- Johnsen J.I., Lindskog M, Ponthan F. (2004). Cyclooxygenase-2 is expressed in neuroblastoma, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis and inhibit tumor growth in vivo. *Cancer Res*, 64(20):7210–7215.
- Johnson S.D., De Costa A.M.A, Young M.R.I. (2014). Effect of the premalignant and tumor microenvironment on immune cell cytokine production in head and neck cancer. *Cancer*, 6(2):756–770.
- Joint_Formulary_Committee. (2015). British national formulary 69th ed., BMJ Group and Pharmaceutical Press.
- Jones L.W., Ali-Osman F, Lipp E, Marcello J.E., McCarthy B, McCoy L, Rice T, Wrensch M, Il'Yasova D. (2010). Association between Body Mass Index and Mortality in Patients with Glioblastoma Multiforme. *Cancer Causes Control*, 21(12): 2195–2201.
- Kalinski P. (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J immunol*, 188(1): 21–8.
- Karami A, Hossienpour M, Noori E.M., Rahpyma M, Najafi K, Kiani A. (2021): Synergistic Effect of Gefitinib and Temozolomide on U87MG Glioblastoma Angiogenesis. *Nutrition and Cancer*.1-9.
- Kardosh A, Blumentha M, Wang W.J., Chen T.C., Schönthal A.H. Differential Effects of Selective COX-2 Inhibitors on Cell Cycle Regulation and Proliferation of Glioblastoma Cell Lines. *Cancer Biology & Therapy*, 3(1):55-62.

- Kaufmann S.H., Hengartner M.O. (2001). Programmed cell death: alive and well in the new millennium, *Trends Cell Biol.*, 11(12):526-534.
- Kegelman T.P., Das S.K., Hu B, Bacolod M.D., Fuller C.E., Menezes M.E., Emdad L, Dasgupta S, Baldwin A.S., Bruce J.N., Dent P, Pellecchia M, Sarkar D, Fisher P.B. (2014). MDA-9/syntenin is a key regulator of glioma pathogenesis. *Neuro-oncol*, 16(1):50-61.
- Kesanakurti D, Chetty C, Dinh D.H., Gujrati M, Rao J.S. (2013). Role of MMP-2 in the regulation of IL-6/Stat3 survival signaling via interaction with alpha5beta1 integrin in glioma. *Oncogene*, 32:327-340.
- Kho D, MacDonald C, Johnson R, Unsworth C.P., O'Carroll S.J. (2015). Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time. *Biosensors*, 5(2):199–222.
- Killela P.J., Reitman Z.J., Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz L.A., Friedman A.H., Friedman H, Gallia G.L., Giovannella B.C. (2013). TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110:6021–6026.
- Kim K.H., Park T.Y., Lee J.Y. (2014). Prognostic significance of initial platelet counts and fibrinogen level in advanced nonsmall cell lung cancer. *J Korean Med Sci.*, 29(4):507-11.
- Klemm F, Maas R.R., Bowman R.L., Kornete M, Soukup K, Nassiri S. (2020). Interrogation of the microenvironmental landscape in brain tumors reveals disease-specific alterations of immune cells. *Cell*, 181:1643.e17–60.e17.
- Knobbe C.B., Merlo A., Reifemberger G. (2002). PTEN signalling in gliomas. *Neuro-Oncology*, 4:196–210.
- Kodama T., Ikeda E., Okada A., Ohtsuka T., Shimoda M., Shiomi T., Yoshida K., Nakada M., Ohuchi E., Okada Y. (2004). ADAM12 is selectively overexpressed in human glioblastomas and is associated with glioblastoma cell proliferation and shedding of heparin-binding epidermal growth factor. *Am. J. Pathol.*, 165:1743–1753.

- Kopman G, Reutelingsperger C.P., Kuijten G.A., Keehnen R.M., Pals S.T., Van Oers N.H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84:1415–1420.
- Koppenol W.H., Bounds P. L., Dang C.V. (2011). Otto Warburg’s contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer*, 11:325–337.
- Kosmopoulos M, Christofides A, Drekolias D, Zavras P.D., Gargalionis A.N., Piperi C. (2018). Critical Role of IL-8 Targeting in Gliomas. *Current Medicinal Chemistry*, 25:1954-1967.
- Koul D. (2008). PTEN Signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biology & Therapy*, 7:(9), 1321-1325.
- Kowalski-Chauvel A, Gouaze-Andersson V, Baricault L, Martin E, Delmas C, Toulas C, Cohen E, Moyal J, Seva C. (2019). Alpha-6-Integrin Regulates FGFR1 Expression through the ZEB1/YAP1 Transcription Complex in Glioblastoma Stem Cells Resulting in Enhanced Proliferation and Stemness. *Cancers*, 11,406.
- Krall A.S. (2021). Asparagine couples mitochondrial respiration to ATF4 activity and tumor growth. *Cell Metab.*, 33:1013–1026.e6.
- Kruczyk M, Przanowski P, Dabrowski M, SwiatekMachado K, Mieczkowski J, Wallerman O, Ronowicz A, Piotrowski A, Wadelius C, Kaminska B, Komorowski J. (2014). Integration of genome-wide of Stat3 binding and epigenetic modification mapping with transcriptome reveals novel Stat3 target genes in glioma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1839(11):1341-1350.
- Labussiere M, Di Stefano A.L., Gleize V, Boisselier B, Mangesius G.S.M., Bruno A, Pattera R, Marie Y, Rahimian A, Finocchiaro G, Houlston R.S., Xuan K.H., Idbaih A, Delattre J.Y., Mokhtari K, Sanson M. (2014). TERT promoter mutations in gliomas, genetic associations and clinico-pathological correlations. *British Journal of Cancer*, 111:2024–2032.
- Lachman L.B., Brown D.C., Dinarello C.A. (1987). Growthpromoting effect of recombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor for a human astrocytoma cell line. *J7 Immunol*, 138:2913-16.

- Le Rhuna E, Preusser M, Roth P, Reardon D.A., van den Bulte M, Weller M, Reifenberger G, Weller M. (2019). Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treatment Reviews*, 80. 101896.
- Lee S.Y., Choi H.K., Lee K.J. (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.
- Lee Y.J., Seo H.W., Baek J.H., Lim S.H., Hwang S.G., Kim E.H. (2020). Gene expression profiling of glioblastoma cell lines depending on TP53 status after tumor-treating fields (TTFields) treatment. *Scientific Reports*, 10:12272.
- 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.
- Leidgens V, Seliger C, Jachnik B, Welz T, Leukel P, Vollmann-Zwerenz A. (2015). Ibuprofen and diclofenac restrict migration and proliferation of human glioma cells by distinct molecular mechanisms. *PLoS One*, 10(10):e0140613.
- Li C, Xing T, Tang M, Yong W, Yan D, Deng H, Wang H, Wang M, Chen J, Ruan D. (2008a). Involvement of cyclin D1/CDK4 and pRb mediated by PI3K/AKT pathway activation in Pb²⁺-induced neuronal death in cultured hippocampal neurons. *Toxicology and applied pharmacology*, 229:351-361.
- Li K, Lu D, Guo Y, Wang C, Liu X, Liu Y, Liu D. (2018). Trends and Patterns of Incidence of Diffuse Glioma in Adults in the United States, 1973–2014. *Cancer Med.*, 7:5281–5290.
- Li R, Li G, Deng L, Liu Q, Dai J, Shen J, Zhang J. (2010). IL-6 augments the invasiveness of U87MG human glioblastoma multiforme cells via up-regulation of MMP-2 and fascin-1. *Oncol Rep*, 23:1553-1559.
- Li X, Huang Y, Jiang J, Frank S.J. (2008b). ERK-dependent threonine phosphorylation of EGF receptor modulates receptor downregulation and signaling. *Cellular signalling*, 20:2145-2155.

- Li Y, Zhu H, Wei X, Li H, Yu Z, Hongmei Z, Liu W. (2017). LPS induces HUVEC angiogenesis in vitro through miR-146a-mediated TGF- β 1 inhibition. *Am J Transl Res*, 9(2):591-600.
- Li Y.X., Wang J.L., Gao M, Tang H, Gui R, Fu Y.F. (2016). Celecoxib-erlotinib combination delays growth and inhibits angiogenesis in EGFR-mutated lung cancer. *Am J Cancer*. 6(7):1494-1510.
- Little R.B., Madden M.H., Thompson R.C., Olson J.J., LaRocca R.V., Pan E, Browning J.E., Egan K.M., Nabors L.B. (2013). Anthropometric Factors in Relation to Risk of Glioma. *Cancer Causes Control*, 24(5):1025-31.
- Liu W, Ren H, Ren J, Yin T, Hu B, Xie S, Dai Y, Wu W, Xiao Z, Yang X. (2013). The role of EGFR/PI3K/Akt/cyclinD1 signaling pathway in acquired middle ear cholesteatoma. *Mediators of inflammation*, 2013:651207.
- Liu X, Pei C, Yan S, Liu G, Liu G, Chen W. (2015). NADPH oxidase 1-dependent ROS is crucial for TLR4 signaling to promote tumor metastasis of nonsmall cell lung cancer. *Tum Biol.*, 36(3):1493-502.
- Liu X.Y., Gerges N, Korshunov A, Sabha N, Khuong-Quang D.A., Fontebasso A.M., Fleming A, Hadjadj D, Schwartzentruber J, Majewski J. (2012). Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol.*, 124:615–625.
- Li X, Wu C, Chen N, Gu H, Yen A, Cao L. (2016). PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget*, 7:33440–33450.
- Loh J.K., Hwang S.L., Lieu A.S., Huang T.Y., Howng S.L. (2002). The alteration of prostaglandin E2 levels in patients with brain tumors before and after tumor removal. *J Neuro-Oncol*, 57:2.
- Lopez-Acevedo M, Grace L, Teoh D, Whitaker R, Adams D.J, Jia J, Nixon A.B., Secord A.A. (2014). Dasatinib (BMS-35482) potentiates the activity of gemcitabine and docetaxel in uterine leiomyosarcoma cell lines. *Gynecologic Oncology Research and Practice*, 1:2.

- 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.
- Luongo F, Colonna F, Calapà F, Vitale S, Fiori M.E., De Maria R. (2019). PTEN Tumor-Suppressor: The Dam of Stemness in Cancer. 11(8):1076.
- Malefyt R.W., Abrams J, Bennett B, Figdor C.G., Vries J.E. (1991). Interleukin 10 (IL-10) Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes: An Autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes. *J. Exp. Med.*, 174:1209-1220.
- Marlina S, Shu M.H., AbuBakar S, Zandi K. (2015). Development of a Real-Time Cell Analysing (RTCA) method as a fast and accurate screen for the selection of chikungunya virus replication inhibitors. *Parasit. Vectors*, 8(579): 1-10.
- Martínez-Reyes I. (2020). Mitochondrial ubiquinol oxidation is necessary for tumour growth. *Nature*, 585:288–292.
- Maruno M, Kovach J.S., Kelly P.J., Yanagihara T. (1997). Distribution of endogenous tumour necrosis factor α in gliomas. *Clin Pathol*, 50:559-562.
- Maust J.D. (2018). Combination Strategies for the Treatment of KRAS Mutant Colorectal and Pancreatic Cancer.
- Mayer I.A., Arteaga C.L. (2016). The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment. *Annu. Rev. Med.*, 67:11–28.
- McFarland B.C., Hong S.W., Rajbhandari R, Twitty G.B. Jr, Gray G.K., Yu H, Benveniste E.N., Nozell S.E. (2013). NF-kappaB-induced IL-6 ensures STAT3 activation and tumor aggressiveness in glioblastoma. *PLoS One*, 8: e78728.
- Melin B.S., Barnholtz-Sloan J.S., Wrensch M.R., Johansen C, Il'yasova D, Kinnersley B, Ostrom Q.T., Labreche K, Chen Y, Armstrong G, Liu Y, Eckel-Passow J.E., Decker P.A., Labussiere M, Idbaih A, Hoang-Xuan K, Di Stefano A.L., Mokhtari K, Delattre J.Y., Broderick P, Galan P, Gousias K, Schramm J, Schoemaker M.J., Fleming S.J., Herms S, Heilmann S, Nothen M.M., Wichmann H.E., Schreiber S, Swerdlow A, Lathrop M, Simon M, Sanson M, Andersson U, Rajaraman P,

- Chanock S, Linet M, Wang Z, Yeager M, GliomaScan C, Wiencke JK, Hansen McCoy L.H., Rice T, Kosel M.L., Sicotte H, Amos C.I., Bernstein J.L., Davis F, Lachance D, Lau C, Merrell R.T., Shildkraut J, Ali-Osman F, Sadetzki S, Scheurer M, Shete S, Lai R.K., Claus E.B., Olson S.H., Jenkins R.B., Houlston R.S., Bondy M.L. (2017). Genome-wide association study of glioma subtypes identifies specific differences in genetic susceptibility to glioblastoma and non-glioblastoma tumors. *Nature Genetics*, 49:789-794.
- Michaud-Levesque J, Bousquet-Gagnon N, Beliveau R. (2012). Quercetin abrogates IL-6/STAT3 signaling and inhibits glioblastoma cell line growth and migration. *Exp Cell Res*, 318:925-935.
- Miller G. (2009). Brain cancer. A viral link to glioblastoma? *Science*, 323(5910):30-31.
- Moniri R, Young A, Reinheimer K, Rayat J, Dai L.J., Warnock G.L. (2015). Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA). *Cytotechnology*, 67(2):379–386.
- Moore S.C., Rajaraman P, Dubrow R, Darefsky A.S., Koebnick C, Hollenbeck A, Schatzkin A, Leitzmann M.F. (2009). Height, Body Mass Index, and Physical Activity in Relation to Glioma Risk. *Cancer Res.*, 69(21):8349-55.
- Morrison R.S., Yamaguchi F, Bruner J.M., Tang M, McKeegan W, Berger M.S. (1994). Fibroblast Growth Factor Receptor Gene Expression and Immunoreactivity Are Elevated in Human Glioblastoma Multiforme. *Cancer Research*, 54(10):2794-9.
- Mostofa A.G.M., Punganuru S.R., Madala H.R., Al-Obaide M, Srivenugopal K.S. (2017). The process and regulatory components of inflammation in brain oncogenesis. *Biomolecules*, 7(2):34.
- Muniandy K, Gothai S, Tan W.S., Kumar S.S., Esa N.M., Chandramohan G, Al-Numair K, Aruselvan P. (2018). In vitro wound healing potential of stem extract of *Alternanthera sessilis*. *Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018:1-13.

- Nakahara Y, Okamoto H, Mineta T, Manuchi K. (2004). Expression of the Wilms' tumor gene product WT1 in glioblastomas and medulloblastomas. *Brain tumor pathol*, 21:113-116.
- Nakanishi M, Rosenberg D.W. (2013). Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Semin Immunopathol*, 35(2):123–137.
- Nakano Y, Kuroda E, Kito T, Uematsu S, Akira S, Yokota A. (2008) Induction of prostaglandin E2 synthesis and microsomal prostaglandin synthase-1 expression in murine microglia by glioma-derived soluble factors: Laboratory investigation. *J Neurosurg*, 108(2):311–9.
- Nandakumar P, Mansouri A, Das S. (2017). The role of the ATRX in Glioma Biology, (2017) The Role of ATRX in Glioma Biology. *Front. Oncol.*, 7:236.
- Neurath M.F., Finotto S. (2011). IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 22:83-89.
- Nitta T, Allegretta M, Okumura K, Sato K, Steinman L. (1992). Neoplastic and reactive human astrocytes express interleukin-8 gene. *Neurosurg. Rev.*, 15(3):203-207.
- Nitta T, Hishii M, Sato K, Okumura K. (1994). Selective expression of interleukin-10 gene within glioblastoma multiforme. *Brain Res*, 649:122–8.
- 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.
- Ogawa F, Amano H, Eshima K. (2014). Prostanoid induces premetastatic niche in regional lymph nodes. *J Clin invest*, 124(11):4882–4894.
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL. (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*, 64(19):6892-9.
- Oliver L, Olivier C, Vallette F.M. (2016). Prostaglandin e 2 plays a major role in glioma resistance and progression. *Trans Cancer Res*, 5(6):S1073–7.

- Oprita A, Baloi S.C., Staicu G.A., Alexandru O, Tache D.E., Danoiu S, Micu E.S., Sevastre A. S. (2021). Updated Insights on EGFR signaling pathways in glioma. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(2):587.
- Ostrom Q.T., Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y. (2013). CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006–2010. *Neuro Oncol.*, 15(Suppl):2ii–56.
- Ostrom Q.T., Gittleman H, Fulop J. (2015). CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol*, 17 Suppl 4:iv1-iv62.
- Ostrom Q.T., Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J.S. (2017). CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. *Neuro Oncol.*, 19(S5), 1–88.
- Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Hanen C. (1998). Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays, *Apoptosis*, 3:115.
- Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Hanen C. (1998). Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, 3:115.
- Özdemir Ö, Marinelli L, Cacciatore I, Ciulla M, Emsen B, Stefano A, Mardinoglu A, Turkez H. (2020). Anticancer effects of novel NSAIDs derivatives on cultured human glioblastoma cells. 76(7-8):329-335.
- Özduman K, Hacıhanefioğlu M, Pamir M.N. (2019). Glioblastom. *Türk Nöroşir Derg*, 29(3):305-334.
- Palanisamy V, Jakymiw A, Van Tubergen, E.A., D'Silva N.J. Kirkwood K.L. (2012). Control of cytokine mRNA expression by RNA-binding proteins and microRNAs. *J. Dent. Res*, 91(7): 651-658.

- Pantziarka P, Sukhatme V, Bouche G, Meheus L, P Sukhatme V. (2016). Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)—diclofenac as an anti-cancer agent. *Ecancer*, 10:610.
- Park M, Lee S. (2003). Cell Cycle and Cancer. *J Biochem Mol Biol*, 36(1):60-65.
- 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.
- Perng P, Lim M. (2015). Immunosuppressive mechanisms of malignant gliomas: parallels at non-CNS sites. *Front Oncol*, 5:153.
- Perry A, Wesseling P. (2016). Histologic classification of gliomas. *Handb. Clin. Neurol.*, 134: 71–95.
- Perry J.K., Liu D.X., Wu Z.S., Zhu T, Lobie P.E. (2013). Growth Hormone and Cancer: An Update on Progress. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, 20(4):307-13.
- Peterson H.I. (1983). Effects of prostaglandin synthesis inhibitors on tumor growth and vascularization Experimental studies in the rat. *Invas Metastas*, 3(3):151–159.
- Piperi C, Samaras V, Levidou G, Kavantzias N, Boviatsis E, Petraki K, Grivas A, Barbatis C, Varsos V, Patsouris E, Korkolopoulou P. (2011). Prognostic significance of IL-8-STAT-3 pathway in astrocytomas: correlation with IL-6, VEGF and microvessel morphometry. *Cytokine*, 55:387-395.
- Powe E, Parschauer D, Istifan J, Lin S, Duan H, Gryka R, Jean-Louis D, Tiwari A. K., Amos S. (2022). Luteolin enhances erlotinib's cell proliferation inhibitory and apoptotic effects in glioblastoma cell lines. *Frontiers in Pharmacology*, 1-11.
- Prasad G, Sottero T, Yang X, Mueller S, James D, Berger M, Aftab D. T., Prados M. D., Haas-Kogan D. A. (2009). Inhibition of PI3K/mTOR Pathways In Glioblastoma and Implications for Combination Therapy with Erlotinib, Temozolomide, and Radiation. *I. J. Radiation Oncology d Biology d Physics*, 75:3.

Promega CellTiter-Blue® Cell Viability Assay deney protokolü

- Prosniak M, Harshyne L.A., Andrews D.W., Kenyon L.C., Bedelbaeva K, Apanasovich T.V. (2013). Glioma grade is associated with the accumulation and activity of cells bearing M2 monocyte markers. *Clin Cancer Res*, 19:3776–86.
- Qi L, Yu H, Zhang Y, Zhao D, Lv P, Zhong Y. (2016). IL-10 secreted by M2 macrophage promoted tumorigenesis through interaction with JAK2 in glioma. *Oncotarget*, 7:71673–85.
- Qiu J, Shi Z, Jiang J. (2017). Cyclooxygenase-2 in glioblastoma multiforme. *Drug Discov Today*, 22(1):148.
- Rachidi S, Wallace K, Day TA. (2014). Lower circulating platelet counts and antiplatelet therapy independently predict better outcomes in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Hematol Oncol*, 7(1):65.
- Ralph W.M. (2004). Galen on Cancer. *Cancer desicions*. Achieved from the original on July 16, 2011.
- Ramis G, Thomas-Moya E, de Mattos Jose S.F., Rodriguez, F, Villalonga P. (2012). EGFR inhibition in glioma cells modulates rho signaling to inhibit cell motility and invasion and cooperates with temozolomide to reduce cell growth. *Plos one*, 7(6):1-14.
- Rana C, Piplani H, Vaish V. (2015). Downregulation of PI3-K/Akt/PTEN pathway and activation of mitochondrial intrinsic apoptosis by diclofenac and curcumin in colon cancer. *Mol Cell Biochem*, 402(1–2):225–241.
- Rana C, Vaish V, Piplani H, Nehru B, Sanyal S.N. (2012). Nuclear Factor-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*, 2:228–238.
- Rappaport S.M. (2012). Discovering environmental causes of diseases. *Epidemiol Community Health*, 66:99-102.

- Rathmell J.C., Fox C.J., Plas D.R., Hammerman P.S., Cinalli R.M., Thompson C.B. (2003). Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor independent survival. *Mol Cell Biol*, 23:7315–28.
- Ratnam N.M., Gilbert M.R., Giles A.J. (2019). Immunotherapy in CNS cancers: the role of immune cell trafficking. *Neuro Oncol*, 21:37–46.
- Raychaudhuri B, Vogelbaum M.A. (2011). IL-8 is a mediator of NF- κ B induced invasion by gliomas. *J. Neurooncol*, 101(2):227-235.
- Reckamp K.L., Gardner B.K., Figlin R.A., Elashoff D, Krysan K, Dohadwala M, Mao J, Sharma S, Inge L, Rajasekaran A, Dubinett S.M. Tumor response to combination celecoxib and erlotinib therapy in non-small cell lung cancer is associated with a low baseline matrix metalloproteinase-9 and a decline in serum-soluble E-cadherin. *J Thorac Oncol*. 2008; 3: 117-24.
- Reisser D, Pance A, Jeannin J.F. (2002). Mechanism of the antitumoral effect of the lipid A. *BioEssays*, 24:284.
- Rice T, Lachance D.H., Molinaro A.M., Eckel-Passow J.E., Walsh K.M., Barnholtz-Sloan J, Ostrom Q.T., Francis S.S., Wiemels J, Jenkins R.B., Wiencke J.K., Wrensch M.R. (2016). Understanding inherited genetic risk of adult glioma a review. *Neurooncol Pract*, 3:10-16,
- Riley J.K., Takeda K, Akira S, Schreiber R.D. (1999). Requirement for two distinct receptor derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem*, 274:16513–21.
- Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. (2011). Mutations in the p53 tumor suppressor gene important milestones at the various steps of tumorigenesis. *Genes Cancer*, 2(4): 466-474.
- Roessler K, Suchanek G, Breitschopf H, Kitz K, Matula C, Lassmann H. (1995). Detection of tumor necrosis factor- α protein and messenger RNA in human glial brain tumors: comparison of immunohistochemistry with in situ hybridization using molecular probes. *J Neurosurg*, 83:291-7.

- Rossi M.L., Hughes J.T., Esiri M.M., Coakham H.B., Brownell D.B. (1987). Immunohistological study of mononuclear cell infiltrate in malignant gliomas. *Acta Neuropathol*, 74(3):269–77. doi: 10.1007/BF00688191
- Rousseau M.C., Hsu R.Y., Spicer J.D., McDonald B, Chan C.H., Perera R.M. (2013). Lipopolysaccharide-induced toll-like receptor 4 signaling enhances the migratory ability of human esophageal cancer cells in a selectin dependent manner. *Surgery*, 154(1): 69-77.
- Sareddy G.R., Kesanakurti D, Kirti P.B., Babu P.P. (2013) Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Diclofenac and Celecoxib Attenuates Wnt/b-Catenin/Tcf Signaling Pathway in Human Glioblastoma Cells. *Neurochem Res*, 38:2313–2322.
- Sarrazy V, Vedrenne N, Billet F, Bordeau N, Lepreux S, Vital A, Jauberteau M O, Desmoulière A. (2011). TLR4 signal transduction pathways neutralize the effect of Fas signals on glioblastoma cell proliferation and migration. *Cancer Letters*, 311:195–202.
- 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.
- Sawant D.V., Yano H, Chikina M, Zhang Q, Liao M, Liu C. (2019). Adaptive plasticity of IL-10⁺ and IL-35⁺ Treg cells cooperatively promotes tumor T cell exhaustion. *Nat Immunol*, 20:724–35.
- Schafer Z.T., Brugge J.S. (2007). IL-6 involvement in epithelial cancers. *J Clin Invest*, 117: 3660-3663.
- Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu X.Y., Jones D.T.W., Pfaff E, Jacob K, Sturm D, Fontebasso A.M., Quang D.A.K., Tönjes M. (2012). Driver mutations in histone

- H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*, 482(7384):226-31.
- Sellers K. (2015). Pyruvate carboxylase is critical for non-small-cell lung cancer proliferation. *J. Clin. Invest.*, 125:687–698.
- Selmaj K.W., Farooq M, Norton W.T., Raine C.S., Brosnan C.F. (1990). Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for the tumor necrosis factor. *J7 Immunol*, 144: 129-35.
- Semple B.D., Kossmann T, Morganti-Kossmann M.C. (2010). Role of chemokines in CNS health and pathology: A focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, 30(3):459-473.
- Shan Y, He X, Song W, Han D, Niu J, Wang J. (2015). Role of IL-6 in the invasiveness and prognosis of glioma. *Int J Clin Exp Med*, 8(6):9114-9120.
- Shan F, Shao Z, Jiang S, Cheng Z. (2016). Erlotinib induces the human non-small-cell lung cancer cells apoptosis via activating ROS-dependent JNK pathways. *Cancer Medicine*, 5(11):3166–3175.
- Shanker A, Brooks A.D., Tristan C.A., Wine J.W., Elliott P.J., Yagita H, Takeda K, Smyth M.J., Murphy W.J., Sayers T.J. (2008). Treating metastatic solid tumors with bortezomib and a tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor agonist antibody. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(9):649–662.
- She Q.B., Solit D.B., Ye Q, O'Reilly K.E., Lobo J, Rosen N. (2005). The BAD protein integrates survival signaling by EGFR/MAPK and PI3K/Akt kinase pathways in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer cell*, 8:287-297.
- Shear M.J., Turner F.C. (1943). Chemical treatment of tumors; isolation of hemorrhagic-producing fraction from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) culture filtrate. *J Natl Cancer Inst*, 4:81.
- Sheng J, Sun H, Yu F.B., Li B, Zhang Y, Zhu Y.T. (2020) The role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Int J Med Sci*, 17(8):1095.

- Shimura T, Noma N, Oikawa T, Ochiai Y, Kakuda S, Kuwahara Y, Takai Y, Takahashi A, Fukumoto M. (2012). Activation of the AKT/cyclin D1/Cdk4 survival signaling pathway in radioresistant cancer stem cells. *Oncogenesis*, 1:e12.
- 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, Tofilon P.J., Bruner J.M., Owolabi O, Lang F.F. (2001). Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Res*, 61(11):4375–81.
- Siddiqui T, Lively S, Ferreira R, Wong R, Schlichter L.C. (2014). Expression and contributions of TRPM7 and KCa2.3/SK3 channels to the increased migration and invasion of microglia in anti-inflammatory activation states. *PLoS One*, 9: e106087.
- Siminska D, Korbecki J, Kojder K, Kapczuk P, Fabiańska M, Gutowska I, Machoy-Mokrzyńska A, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. (2021). Epidemiology of Anthropometric Factors in Glioblastoma Multiforme—Literature Review. *Brain Sci.*, 11(1):116.
- Singh A.B., Harris R.C. (2005). Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell. Signal*, 17:1183–1193.
- Singh M.K., Chaudhuri S, Bhattacharya D, Kumar P, Datta A, Chaudhuri S. (2015). T11 target structure induced modulations of the pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine expressions in experimental animals for glioma abrogation. *Int. Immunopharmacol*, 24(2):198-207.
- Sinkala M. (2023). Mutational landscape of cancer-driver genes across human cancers. *Nature, Scientific Reports*, 13:12742.
- 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.

- 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.
- 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 W, Ruder A.M., Hu L, Li Y, Ni R, Shao W. (2009). Genetic epidemiology of glioblastoma multiforme: Confirmatory and new findings from analyses of human leukocyte antigen alleles and motifs. *PLoS One*, 4(9):e7157.
- Speranza M.C., Nowicki M.O., Behera P, Cho C.F., Chiocca E.A., Lawler S.E. (2016). BKM-120 (Buparlisib): A phosphatidyl-inositol-3 kinase inhibitor with anti-invasive properties in glioblastoma. *Nature Scientific reports*, 1-9.
- Sridhar R. Chirasani S.R., Leukel P, Gottfried E, Hochrein J, Stadler K, Neumann B, Oefner P.J., Gronwald W, Bogdahn U, Hau P, Kreutz M, Oliver M. (2013). GrauerDiclofenac inhibits lactate formation and efficiently counteractslocal immune suppression in a murine glioma model. *Int. J. Cancer*, 132:843–853.
- Stratton M.R., Campbell P.J., Futreal P.A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458:719-724.
- Stylli S.S., Kaye A.H., Lock P. (2008). Invadopodia: at the cutting edge of tumour invasion. *J Clin Neurosci*, 15:725–37.
- Sun X, Mao Y, Wang J, Zu L, Hao M, Cheng G, Qu Q, Cui D, Keller ET, Chen X, Shen K, Wang J. (2014). IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts induces tamoxifen resistance in luminal breast cancer. *Oncogene*, 2014.
- Surowiak P, Materna V, Matkowski R. (2005). Relationship between the expression of cyclooxygenase 2 and MDR1/Pglycoprotein in invasive breast cancers and their prognostic significance. *Breast Cancer Res*, 7(5):R862–R870.
- Swiatek-Machado K, Kaminska B. (2020). STAT Signaling in Glioma Cells. Karolina Swiatek-Machado and Bozena Kaminska. *Adv Exp Med Biol.*, 1202:203-222.

- Takahashi Y, Akahane T, Sawada T, Ikeda H, Tempaku A, Yamauchi S, Nishihara H, Tanaka S, Nitta K, Ide W, Hashimoto I, Kamada H. (2015). Adult classical glioblastoma with a BRAF V600E mutation. *World Journal of Surgical Oncology*, 13:100.
- 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.
- Taylor T.E., Furnari F.B., Cavenee W.K. (2012). Targeting EGFR for treatment of glioblastoma: molecular basis to overcome resistance. *Curr Cancer Drug Targets*, 12(3):197-209.
- Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P, Mendoza C. (1998). Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure, *Mol. Hum. Reprod.*, 4:757.
- Thakkar J, Dolecek T.A., Horbinski C, Ostrom Q.T., Lightner D.D., Barnholtz-Sloan J.S. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Rev.*, 23(10):1985–96.
- Thuringer D, Hammann A, Benikhlef N, Fourmaux E, Bouchot A, Wettstein G, Solary E, Garrido C. (2011). Transactivation of the epidermal growth factor receptor by heat shock protein 90 via Toll-like receptor 4 contributes to the migration of glioblastoma cells. *J. Biol. Chem*, 286:3418-3428.
- Trifunovic J, Miller L, Debeljak Z, Horvat V. (2015). Pathologic patterns of interleukin 10 expression-a review. *Biochem Med*, 25:36–48.
- Tripaldi R, Stuppia L, Alberti S. (2013). Human Height Genes and Cancer. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, 1836(1):27-41.
- 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.
- Turke A.B., Song Y, Costa C, Cook R, Arteaga C.L., Asara J.M., Engelman J.A. (2012a). MEK inhibition leads to PI3K/AKT activation by relieving a negative feedback on ERBB receptors. *Cancer research*, 72:3228-3237.

- Turke A.B., Zejnullahu K, Wu Y.L. (2010). Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell*, 17(1):77-88.
- Ulgen E, Can O, Bilguvar K, Oktay Y, Akyerli C.B., Danyeli A.E., Yakicier M.C., Sezerman O.U., Pamir M.N., Ozduman K. (2019). Whole exome sequencing-based analysis to identify DNA damage repair deficiency as a major contributor to gliomagenesis in adult diffuse gliomas. *J Neurosurg*, 132(5):1435-1446.
- Paulina V, Skiriute D, Skauminas K, Tamasauskas A. (2013). GATA4 and DcR1 methylation in glioblastomas. *Diagnostic Pathology*, 8:7.
- Van Hecken A, Schwartz J.I. (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.
- Venneti S, Huse J.T. (2015). The evolving molecular genetics of low-grade glioma. 22(2): 94–101.
- Venza I, Visalli M, Fortunato C, Ruggeri M, Ratone S, Caffo M, Caruso G, Alafaci C, Tomasello F, Teti D, Venza M. (2012). PGE2 induces interleukin-8 derepression in human astrocytoma through coordinated DNA demethylation and histone hyperacetylation. *Epigenetics*, 7(11):1315-1330.
- Vinagre J, Almeida Ana, Populo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, Coelho R, Celestino R, Prazeres H, Lima L, Melo M, Rocha A.G., Preto A, Castro P, Castro L, Pardal F, Lopes J.M., Santos L.L., Reis R.M., Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M, Lima J, Maximo V, Soares Paula. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nature Communications*, 4:2185: 1-6.
- Vinagre J, Pinto V, Celestino R, Reis M, Pópulo H, Boaventura P, Melo M, Catarino T, Lima J, Lopes J.M. (2014). Telomerase promoter mutations in cancer: An emerging molecular biomarker? *Virchows Arch.*, 465:119–133.
- Von Rahden B.H.A, Stein H.J., Pühringer F. (2005). Coexpression of cyclooxygenases (COX-1, COX-2) and vascular endothelial growth factors (VEGF-A, VEGF-C) in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res*, 65(12):5038–5044.

- Walker E.V., Davis F.G. (2019). CBTR founding affiliates. Malignant primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in Canada from 2009 to 2013. *Neuro Oncol.*, 21:360–369.
- Wang G, Ye Y, Zhang X, Song J. (2014). Bradykinin stimulates IL-6 production and cell invasion in colorectal cancer cells. *Oncol Rep*, 32: 1709-1714.
- Wang Q, Wang Z, Chu L, Li X, Kan P, Xin X, Zhu Y, Yang P. (2015). The effects and molecular mechanisms of MiR-106a in multidrug resistance reversal in human glioma U87/DDP and U251/G Cell Lines. *PLoS One*, 10(5):e0125473.
- Wang S, Gao X, Shen G, Wang W, Li J, Zhao J. (2016). Interleukin-10 deficiency impairs regulatory T cell-derived neuropilin-1 functions and promotes Th1 and Th17 immunity. *Sci Rep.*, 6:24249.
- Wang H, Zhang C, Xu L, Zang K, Ning Z, Jiang F, et al. (2016). Bufalin suppresses hepatocellular carcinoma invasion and metastasis by targeting HIF1 α via the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Oncotarget*, 7:20193–20208.
- Warburg O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123:309–314.
- Ward A.F., Braun B.S., Shannon K.M. (2012). Targeting oncogenic Ras signaling in hematologic malignancies. *Blood*, 120:3397–3406. [CrossRef] [PubMed]
- 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.
- Watters J.J., Schartner J.M., Badie B. (2005). Microglia function in brain tumors. *J Neurosci Res*, 81:447–455.
- Watts E.L., Perez-Cornago A, Appleby P.N., Albanes D, Ardanaz E, Black A, Bueno-de-Mesquita H.B., Chan J.M., Chen C, Chubb S.A.P. (2019). The Associations of Anthropometric, Behavioural and Sociodemographic Factors with Circulating Concentrations of IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2 and IGFBP-3 in a pooled analysis of 16,024 men from 22 Studies. *Int. J. Cancer*, 145(12):3244-3256.
- Wei Q, Singh O, Ekinci C, Gill J, Li M, Mamatjan Y, Karimi S, Bunda S, Mansouri S, Aldape K, Zadeh G. (2021). TNF α secreted by glioma associated macrophages

- promotes endothelial activation and resistance against anti-angiogenic therapy. *Avta neuropathol commun*, 9:67.
- Widodo S.S., Dinevska M, Furst L.M., Stylli S.S., Mantamadiotis T. (2021). IL-10 in glioma. *British Journal of Cancer*, 125:1466–1476.
- Wiedmann M.K.H., Brunborg C, Di Ieva A, Lindemann K, Johannesen T.B., Vatten L, Helseth E, Zwart J.A. (2017). The Impact of Body Mass Index and Height on the Risk for Glioblastoma and Other Glioma Subgroups: A Large Prospective Cohort Study. *Neuro Oncol.*, 19(7):976-985. [CrossRef] [PubMed] doi: 10.1093/neuonc/now272.
- 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.
- Woroniecka K, Chongsathidkiet P, Rhodin K, Kemeny H, Dechant C, Farber SH. (2018). T-cell exhaustion signatures vary with tumor type and are severe in glioblastoma. *Clin Cancer Res.*, 24:4175–86.
- Wrensch M, Jenkins R, Chang J, Yeh R, Xiao Y, Decker P, Ballman K, Berger M, Buckner J, Chang S, Giannini C, Halder C, Kollmeyer T, Kosel M, LaChance D, McCoy L, O'Neill B, Patoka J, Pico A, Prados M, Quesenberry C, Rice T, Rynearson A, Smirnov I, Tihan T, Wiemels J, Yang P, Wiencke J. (2009). Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility. *Nature Genetics*, 41:905-908,
- Xu H, Lai W, Zhang Y, Liu L, Luo X, Zeng Y, Wu H, Lan Q, Chu Z. (2014). Tumor-associated macrophage-derived IL-6 and IL-8 enhance invasive activity of LoVo cells induced by PRL-3 in a KCNN4 channel-dependent manner. *BMC Cancer*, 14:330.
- Xu X, Farach-Carson M.C., Jia X. (2014). Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation. *Biotechnol Adv* 32(7):1256-1268.
- Yadav D, Lowenfels A.B. (2013). The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Disease and Therapy of Pancreatic Disorder*, 144(6):1252-1261.

- Yang H, Wang B, Wang T, Xu L, He C, Wen H. (2014). Toll-Like Receptor 4 Prompts Human Breast Cancer Cells Invasiveness via Lipopolysaccharide Stimulation and Is Overexpressed in Patients with Lymph Node Metastasis. *Plos One*, 9(10).
- Yao Y, Ye H, Qi Z, Mo L, Yue Q, Baral A. (2016). B7-H4(B7x)-mediated cross-talk between glioma-initiating cells and macrophages via the IL6/JAK/STAT3 pathway lead to poor prognosis in glioma patients. *Clin Cancer Res*, 22:2778–90.
- 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.
- Yarden Y., Sliwkowski M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2:127–137.
- Yu W, Zhang L, Wei Q, Shao A. (2020). O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT): Challenges and New Opportunities in Glioma Chemotherapy. *Front. Oncol.*, 9:1547.
- Yun S.P., Ryu J.M., Jang M.W., Han H.J. (2011). Interaction of profilin-1 and f-actin via a b-arrestin-1/JNK signaling pathway involved in prostaglandin E2-induced human mesenchymal stem cells migration and proliferation. *J Cell Physiol*, 226(2):559–71.
- Zadka L, Kram P, Koscinski J, Jankowski R, Kaczmarek M, Piatek K. (2017). Association between interleukin-10 receptors and the CD45-immunophenotype of central nervous system tumors: a preliminary study. *Anticancer Res*, 37:5777–83.
- Zandi R., Larsen A.B., Andersen P., Stockhausen M.T., Poulsen H.S. (2007). Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell. Signal*, 19:2013–2023.
- Zhang G, Gurtu V, Kain S.R., Yan G. (1997). Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V, *Biotechniques*, 23:525–531.

- Zhang Y, Dube C, Gibert Jr. M., Cruickshanks N, Wang B, Coughlan M, Yang Y, Setiady I, Deveau C, Saoud K, Grello C, Oxford M, Yuan F, Abounader R. (2018). The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers*, 10:297.
- Zhang M, Quan H, Fu L, Li Y, Fu H, Lou L. (2021). Third-generation EGFR inhibitor HS-10296 in combination with famitinib, a multi-targeted tyrosine kinase inhibitor, exerts synergistic antitumor effects through enhanced inhibition of downstream signaling in EGFR-mutant non-small cell lung cancer cells. *Thorac Cancer*, 12:1210–1218.
- Zhang Y, Zhang H.E., Liu Z. (2016). MicroRNA-147 suppresses proliferation, invasion and migration through the AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer. *Oncol Lett*, 11:405–410.
- 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.
- Zhao H.F., Wang J, Shao W, Wu C.P., Chen Z.P., To S.T. (2017). Recent advances in the use of PI3K inhibitors for glioblastoma multiforme: current preclinical and clinical development. *Mol Cancer*, 16:100.
- Zhu Q, Zhang X, Zhang L, Li W, Wu H, Yuan X, Mao F, Wang M, Zhu W, Qian H, Xu W. (2014). The IL-6-STAT3 axis mediates a reciprocal crosstalk between cancer-derived mesenchymal stem cells and neutrophils to synergistically prompt gastric cancer progression. *Cell Death Dis.*, 5:e1295.
- 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.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Züleyha BARAN

Yabancı Dil: İngilizce

Eğitim ve Meslek Geçmişi

1. 2018 – Devam ediyor: Doktora- Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Farmakoloji ABD.
2. 2008-2013 Lisans: Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
3. 2002-2005 Lise: Beşiri Lisesi