



**T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ
ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**SHSY-5Y(NÖROBLASTOMA) VE L929
(FİBROBLAST) HÜCRE HATLARINDA
THERANEKRONUN ENTEGRE STRES YANITI
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İN VİTRO OLARAK
İNCELENMESİ**

İrem Simge ÖZGÜL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Mahmud Mustafa ÖZKUT

2025 – AFYONKARAHİSAR

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SHSY-5Y (NÖROBLASTOMA) VE L929 (FİBROBLAST) HÜCRE
HATLARINDA THERANEKRONUN ENTEGRE STRES YANITI
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İN VİTRO OLARAK İNCELENMESİ**

İrem Simge ÖZGÜL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Mahmud Mustafa ÖZKUT

**Bu çalışma; Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Birimi tarafından 24.LİS.005 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

2025 - AFYONKARAHİSAR

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Yüksek Lisans Öğrencisinin

Danışmanın

Adı Soyadı: İrem Simge ÖZGÜL

Ünvanı Adı Soyadı:

Dr. Öğr. Üyesi Mahmud Mustafa ÖZKUT

İmza:

İmza:

SHSY-5Y(NÖROBLASTOMA) VE L929(FİBROBLAST) HÜCRE HATLARINDA THERANEKRONUN ENTEGRE STRES YANITI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İN VİTRO OLARAK İNCELENMESİ

İrem Simge ÖZGÜL

**Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

Şubat 2025

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Mahmud Mustafa ÖZKUT

ÖZET

Nöroblastoma, genellikle bebeklik ve erken çocukluk döneminde görülen, nöral krest hücrelerinden kaynaklanan sempatik sinir sistemi kaynaklı solid bir tümördür. L929, insan fibroblastlarından elde edilen normal bir hücre hattı olarak kullanılmaktadır. Çalışmalarda genellikle ilaca bağlı toksisitenin varlığı için kullanılmıştır. Entegre stres yanıtı(ISR), bir dizi fizyolojik değişiklik ve farklı patolojik koşullara karşı gelişen bir sinyal yoludur. Vücuttaki çeşitli besin yoksunluğu, hipoksi, virüs enfeksiyonu, oksidatif stres gibi koşullara karşı üç farklı kinaz olan; PERK, PKR, GCN-2 ile yapmaktadır.

Theranekron, ‘Tarantula Cubensis’ örümceğinden hazırlanan; nörotoksik etkilerinin yanı sıra hücre rejenerasyonu ve hemolitik enzim inhibe edici aktivitelere sahip peptitlere sahip bir ajandır. Bu çalışmada, literatürde ilk kez Nöroblastoma ve fibroblastik hücrelerde potansiyel anti-kanser özellikleri entegre stres sinyal yolağı üzerinden Theranekron uygulaması ile araştırılmıştır.

SHSY-5Y ve L929 hücre hatları çoğaltılmıştır. Theranekron için doz belirlemesi MTT testi ile yapılmış ve IC50 değeri 1/10 olarak belirlenmiştir. Etkin doz %90 konfluensiye gelmiş iki hücre hattı içinde 24 saat uygulandı. PERK, PKR, GCN-2 entegre stres markırları ile immünohistokimyasal olarak her iki hücre hattı boyandı. Apoptoz için Tunel ile değerlendirildi. İstatiksel olarak gruplar arası karşılaşmalar yapıldı.

Theranekron uygulaması SHSY-5Y kanser hücre hattında kullanılan antikorlar immünoreaktivitesini arttırırken uygulama yapılmayan kanser hücre hattında bunun azaldığı istatiksel olarak anlamlı bulundu. L929 açısından ilaçlı gruplarda bu üç immünoreaktivitenin ilaçsız yani kontrol L929 a göre azaldığı istatiksel olarak anlamlı bulundu.

Tunel boyamalarında SHSY-5Y nöroblastoma kanser hücre hattı için özellikle ilaçlı grupta hücre ölümü artarken L929 ilaçlı grubunda hücre ölümünün az bir ifadeyle olduğu izlendi. Yani theranekron etkisini entegre stres moleküllerini kanserde arttırarak ölüme götürdüğü fakat normal vücut hücrelerinde theranekronun göz ardı edilebilir bir etkisi olduğu anlaşıldı.

Buna bağlı olarak belli dozlarda kanserlerde ilaç olarak kullanılabileceği gerçeğini öne çıkardı. Theranekronla ilgili çalışmaların azlığı göz önüne alındığında çalışmamızın iyi bir referans olabileceğini öngörmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Entegre stres yanıt, Kanser, PERK, Theranekron

IN VITRO INVESTIGATION OF THE EFFECT OF THERANEKRON ON INTEGRATED STRESS RESPONSE IN SHSY-5Y (NEUROBLASTOMA) AND L929 (FIBROBLAST) CELL LINES

İrem Simge ÖZGÜL

**Afyonkarahisar University of Health Sciences
Institute of Graduate Education Department of Histology and Embryology**

Master's Thesis

February 2025

Supervisor: Dr. Öğretim Üyesi Mahmud Mustafa ÖZKUT

ABSTRACT

Neuroblastoma is a solid tumor originating from the sympathetic nervous system originating from neural crest cells, usually seen in infancy and early childhood. L929 is used as a normal cell line derived from human fibroblasts. It has often been used in studies for the presence of drug-related toxicity. The integrated stress response (ISR) is a signaling pathway that develops against a number of physiological changes and different pathological conditions. There are three different kinases that are used against various conditions in the body such as nutrient deprivation, hypoxia, virus infection, oxidative stress; It is performed with PERK, PKR, GCN-2. Theranekron is an agent prepared from the spider 'Tarantula Cubensis'; it has peptides with neurotoxic effects as well as cell regeneration and hemolytic enzyme inhibitory activities. In this study, for the first time in the literature, potential anti-cancer properties in neuroblastoma and fibroblastic cells were investigated by the application of Theranekron via the integrated stress signaling pathway. The SHSY-5Y and L929 cell lines were duplicated. The dose determination for Theranekron was performed with the MTT test and the IC50 value was determined as 1/10. The effective dose was administered for 24 hours within two cell lines with 90% confluence. Both cell lines were immunohistochemically stained with PERK, PKR, GCN-2 integrated stress markers. He was evaluated with Tunel for apoptosis. Statistically, there were intergroup encounters. Dec. It was found statistically significant that the antibodies used in the SHSY-5Y cancer cell line with Theranekron application increased their immunoreactivity, while this decreased in the cancer cell line that was not applied. From the point of view of L929, it was found statistically significant that these three immunoreactivity decreased in the medicated groups compared to the control L929 without drugs. In the tunnel staining, it was observed that cell death increased especially in the medicated group for the SHSY-5Y neuroblastoma cancer cell line, while cell death was low in the L929 medicated group. In other words, it turned out that theranekron Decin leads to death by increasing integrated stress molecules in cancer, but theranekron has a negligible effect on normal body cells. Accordingly, he highlighted the fact that it can be used as a drug for cancer in certain doses. Given the scarcity of studies on theranekron, we anticipate that our study may be a good reference.

Keywords: Apoptosis, Integrated stress response, Cancer, PERK, Theranekron

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	ii
KABUL VE ONAY	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.1.1. Kanser Hücrelerini Genel Özellikleri	4
2.1.2. Kanser Genetiği	11
2.1.3. Tümör Mikro Çevresi	12
2.1.3.1. Tümör Kaynaklı Stromanın Kökenleri	14
2.1.3.2. Tümörle İlişkili Stromal Hücreler (TASC)'in Alt Türlerinin İsimlendirilmesi	14
2.1.3.3. Kanserle İlişkili Fibroblastlar (TAFs/CAFs).....	15
2.1.3.4. Kanserle İlişkili Fibroblastlar (CAF'ler)	15
2.1.3.5. Tümörle-İlişkili Endotelial Hücreler.....	16
2.1.3.6. İmmün Hücreler	16
2.1.3.7. Tümörle İlişkili Makrofajlar	17
2.1.3.8. Damar Sistemi.....	18
2.1.3.9. Ekstraselüler Matriks (ECM).....	19
2.1.4. Kanser Mikroçevresi.....	19
2.1.5. Kanser Türleri İçin Bazı Belirteçleri	21
2.1.6. Türkiye ve Kanser.....	23
2.1.7. Dünya ve Kanser.....	24
2.2. Nöroblastoma	24
2.2.1. Nöroblastomanın Kökeni.....	28

2.2.2. Nöroblastom' da Tümör Gerilemesi	30
2.2.3. Genetik Risk Faktörleri	30
2.2.4. Biyolojik ve Genetik Özellikler.....	32
2.2.5. Nöroblastomda Tümör Belirteçleri.....	33
2.2.6. Nöroblastom Tümörlerinde Kanser Kök Hücreleri	35
2.3. L929.....	36
2.4. Entegre Stres Yanıtı	37
2.4.1. Entegre Stres Tepkisi ve Hücre Sağkalımı	39
2.4.2. Entegre Stres Tepkisi ve Otofajinin Aktivasyonu.....	40
2.4.3. Entegre Stres Tepkisi ve Hücre Ölümü.....	42
2.4.4. PERK	45
2.4.5. PKR	46
2.4.6. GCN2.....	48
2.5. Theranekron.....	49
3. GEREÇ VE YÖNTEM	53
3.1. Etik Kurul	53
3.2. Deney Grupları	53
3.3. Kimyasallar	53
3.4. İn Vitro Çalışmalar	55
3.4.1. Hücre Üretilmesi.....	55
3.4.2. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması.....	55
3.4.3. Hücrelerin Stoktan Çıkartılması	55
3.4.4. Hücrelerin Pasajlanması	56
3.4.5. Hücre Stoklanması.....	56
3.5. MTT Testi	56
3.6. İmmünohistokimya.....	57
3.7. Tunel Yöntemi	58
3.8. İstatiksel Analiz	59
4. BULGULAR.....	60
4.1. Hücre Kültürü Değerlendirmesi	60
4.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme	61
4.2.1. PERK İmmünoreaktivitesi.....	61
4.2.2. PKR İmmünoreaktivitesi	62

4.2.3. GCN-2 İmmünorekativitesi	62
4.3. Tunel sonuçları	68
4.4. MTT Sonucu.....	71
5. TARTIŞMA	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	78
7. KAYNAKLAR.....	79
8. EKLER.....	86
8.1. İntihal Raporu.....	86
8.2. Akademik Özgeçmiş.....	92
8.3. Etik Kurul.....	93

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

°C: Santigrat

TGFβ: Transform büyüme faktörü

P53: Tümör protein 53

Kİ-67: Antigen Kiel 67

EGFR: Epidermal Büyüme Faktörü

cm: Santimetre

gr: Gram

HER2: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

BRCA1: Breast Canser Geni 1

TME: Tümör mikroçevresi

NK: Doğal Öldürücü

EGFR: Epidermal Büyüme Faktörü

ECM: Ekstra selüler matriks

EMT: Epitelden Mezenkimale Geçiş

NB: Nöroblastoma

L929: Fibroblast

ISR: Entegre Stres Yanıt

UPR: Katlanmamış Protein Yanıtı

eIF2α: Ökayotik Başlatma Faktörü

PERK: PKR benzeri Endoplazmik Retikulum Kinazı

PKR: Protein Kinaz R

GCN-2: Genel Kontrol Baskılanamaz 2

ATF4: Transkripsiyon Faktörü 4

OMS: Opsoklonus Miyoklonus Sendromu

MMP: Metalloproteinazlar

BMP: Kemik Morfogenetik Proteini

PHOX2B: Çift Benzeri Homeobox 2B

Trn: Theranekron

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Kanser hücrelerinde telomer yapısının telomeraz enzimi ile yenilenmesi...5
Şekil 2.2.	İnsan telomeraz enzimi gösterimi. 5
Şekil 2.3.	Ki67 proteinin gösterimi. 9
Şekil 2.4.	Tümör hücrel ve hücrel olmayan elemanları gösterimi..... 13
Şekil 2.5.	Tümörmikroçevresi genel görünümü. 20
Şekil 2.6.	Nöral krest orjinli olan hücreler 28
Şekil 2.7.	Noradrenergik (ADRN) tipi ve Mezankimal (MES) tipi nöroblastomun özeti. 33
Şekil 2.8.	Sinir hücresi kök hücrelerinin nöroblastoma hücrelerine dönüşümü.....35
Şekil 2.9.	Entegre stres yanıtları sinyalizasyon yolakları. 43
Şekil 2.10.	Tarantula örümceği.....50
Şekil 4.1.	SHSY-5Y hücre kültüründeki görüntüsü.....60
Şekil 4.2.	L929 hücre kültüründeki görüntüsü. 61
Şekil 4.3.	L929 hücre hattında ilaçlı ve kontrol grupları için PERK, PKR, GCN-2 antikorlarının İmmünohistokimyasal reaktivitesi.....63
Şekil 4.4.	L929 fibroblast hücre hattında ilaçlı ve kontrol grupları için PERK, PKR, GCN-2 antikorlarının İmmünohistokimyasal reaktivitesi.....64
Şekil 4.5.	L929; PERK, PKR, GCN-2 İmmünohistokimyasal boyama sonuçları istatistiksel analizi ($p<0.05$). 65
Şekil 4.6.	SHSY-5Y nöroblastoma hücre hattında ilaçlı ve kontrol grupları için PERK, PKR, GCN-2 antikorlarının İmmünohistokimyasal reaktivitesi. 66
Şekil 4.7.	SHSY-5Y nöroblastoma hücre hattında ilaçlı ve kontrol grupları için PERK, PKR, GCN-2 antikorlarının İmmünohistokimyasal reaktivitesi.. 67
Şekil 4.8.	SHSY-5Y; PERK, PKR, GCN-2 immünohistokimyasal boyama sonuçları istatistiksel analizi ($p<0.05$). 68
Şekil 4.9.	SHSY-5Y ve L929 hücre hatlarının ilaçlı ve kontrol gruplarında görülen hücre nükleusundaki pozitif boyanma gösteren TUNEL görüntüsü. 69
Şekil 4.10.	SHSY-5Y ve L929 hücre hatlarının ilaçlı ve kontrol gruplarında görülen hücre nükleusundaki pozitif boyanma gösteren TUNEL görüntüsü.. 70

Şekil 4.11. Shsy-5y ve L929 tunel boyamanın istatistiksel sonuçlarının grafiği ($p<0.05$).	71
Şekil 4.12. MTT Sonuç Grafiği	72



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tümör hücrelerinin biyolojik davranışlarını belirleyen en kritik adaptif süreçlerden biri, hücrel stres koşullarına karşı geliştirilen entegre stres yanıtıdır (Integrated Stress Response, ISR). ISR, protein translasyonunun global düzeyde baskılanması ve belirli gen ekspresyon programlarının seçici olarak aktive edilmesi yoluyla hücrel homeostazın yeniden düzenlenmesine aracılık eden merkezi bir moleküler mekanizmadır. Bu mekanizma, yalnızca hücre içi dengeyi yeniden tesis etmekle kalmayıp, aynı zamanda kanser hücrelerinin proliferatif kapasitesini, metabolik esnekliğini ve tedaviye karşı direnç geliştirme potansiyelini de doğrudan etkilemektedir (Pakos-Zebrucka ve ark., 2016; Costa-Mattioli ve Walter, 2020).

ISR'nin temel düzenleyici bileşenleri arasında yer alan sensör kinazlar — endoplazmik retikulum stresi ile aktive olan PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), viral enfeksiyonlar ve çift zincirli RNA aracılığıyla aktive olan Protein kinase R (PKR) ve aminoasit yetersizliği gibi metabolik baskılarla tetiklenen General Control Nonderepressible-2 (GCN2) — hücrelerin farklı stres uyarılarına verdiği yanıtları moleküler düzeyde çeşitlendirmektedir (Harding ve ark., 2019; Tameire ve ark., 2021). Bu kinazların ortak hedefi olan eIF2 α 'nın fosforilasyonu, translasyonel baskı ve adaptif transkripsiyonel programların başlatılması üzerinden hem geçici hücrel korunmaya hem de uzun vadeli tümör progresyonuna aracılık etmektedir (Sidrauski ve ark., 2015).

Özellikle tümör mikroçevresi (TME), ISR'nin düzenlenmesinde belirleyici bir faktördür. Hipoksi, besin kıtlığı, immün hücre infiltrasyonu ve stromal etkileşimler, ISR sensör kinazlarını sürekli tetikleyen baskılar yaratarak tümör hücrelerinin farmakolojik ajanlara verdikleri yanıtları yeniden şekillendirmektedir. PERK, PKR ve GCN2 aracılığıyla aktive edilen ISR, bu nedenle yalnızca hücre içi stres adaptasyonunu değil, aynı zamanda mikroçevresel bağışıklık yanıtını, sitokin sekresyonunu ve stromal hücre davranışlarını da modüle etmektedir (Tameire ve ark., 2019).

Mevcut literatürde ISR'nin kanser biyolojisindeki rolü genel hatlarıyla tanımlanmış olsa da, Theranekron'un farklı hücre hatlarında ISR sensör kinazları aracılığıyla nasıl farklılaştırılmış yanıtlar oluşturduğu halen yeterince aydınlatılamamıştır. Çoğu çalışma, tek bir hücre hattında veya tekil stres koşullarında ISR'nin etkilerini incelemiştir; ancak

Theranekron'un nöroblastoma ve fibroblast hücre hatlarında ISR dinamiklerini nasıl şekillendirdiği ve mikroçevresel adaptasyonlarla nasıl kesiştiği sistematik biçimde ele alınmamıştır. Bu boşluk, hem kanser biyolojisinin temel mekanizmalarının anlaşılmasını sınırlamakta hem de ISR sensör kinazlarını hedef alan yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesini güçleştirmektedir.

Bu çalışmada, Theranekron'un entegre stres yanıtı yolağı üzerindeki düzenleyici etkilerinin nöroblastoma ve fibroblast hücre hatlarında kapsamlı biçimde değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Özellikle PERK, PKR ve GCN2 kinazlarının aracılık ettiği moleküler mekanizmaların, farklı hücre hatlarında Theranekron'a verilen yanıtı nasıl şekillendirdiği karşılaştırmalı olarak analiz edilecektir.

Elde edilecek verilerin, hücre hattına özgü ISR profillerini ortaya koyarak, tümör mikroçevresi ile etkileşim halinde gelişen stres adaptasyonlarının Theranekron yanıtı üzerindeki etkilerini derinlemesine aydınlatması beklenmektedir. Böylece bu çalışma, kanser tedavisinde ISR sensör kinazlarını hedefleyen stratejiler için yalnızca yeni bir kavramsal çerçeve sunmakla kalmayacak, aynı zamanda Theranekron'un ISR odaklı terapötik potansiyeline dair özgün bulgular sağlayacaktır.

Bu çalışmanın özgünlüğü, Theranekron'un ISR sensör kinazları (PERK, PKR, GCN2) aracılığıyla nöroblastoma ve fibroblast hücre hatlarında oluşturduğu farklı moleküler yanıtları karşılaştırmalı olarak inceleyen ilk sistematik araştırmalardan biri olmasında yatmaktadır. Bu yönüyle çalışma, yalnızca hücre hattı bazlı adaptasyon farklılıklarını ortaya koymakla kalmayacak, aynı zamanda tümör mikroçevresinin ilaç yanıtı üzerindeki modülatör rolünü de ISR perspektifinden değerlendiren öncü bir yaklaşım sunacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanserle ilgili ilk çalışmalar M.Ö. 2500’lü yıllara dayanmaktadır. Kanserle ilgili ilk yazılı kaynaklar M.Ö. 1600’lü senelerde yazılmaya başlanan yedi adet papirüstür. Bu belgeler ancak 19. Yüzyılda açığa çıkmıştır. M.Ö.400’lü yıllarda Hipokrat ve Gallen gibi hekimler, kanserin varlığı ve özelliklerinden bahsetmişlerdir. Hipokrat, bu dönemlerde tümörün merkez yapısının olduğundan ve bu yapılardan çıkan kolların diğer organlara uzandığından bahsetmiş ve bu özellikleri nedeniyle kansere Yunanca’da yengeç anlamına gelen “karkinoma” ismini vermiştir. M.S. 1000’li yıllarda ise Türk bilim adamlarından İbn-i Sina’nın, kanunlarında kanserden bahsettiği bilinmektedir (Zeybek 2003).

Bazı kanser araştırmacıları, 19. yüzyılın sonuna gelindiğinde farklı doku tiplerinde karakteristik mitotik anormallikler gözlemlemişlerdir. Birkaç yıl sonrasında, 1914’te Theodor Boveri, bu tümörlerin anormal sayıda kromozoma sahip hücrelerden kaynaklandığını öne süren bir teori yayınladı ve kanserin gelişiminde genetik farklılıkların rolü hakkında bir dizi hipotezi ortaya atmıştır. 20. Yüzyılın ilk yarısında araştırmalar için son derece kritik bir ilerleme kaydedilmiştir. Boveri’nin teorisi 1960 yılında, Philadelphia kromozomu olarak tanımlanan ve kronik miyeloid lösemi (KML) hastalarında sıklıkla bulunan G grubunun küçük bir kromozomunun tanımlanması ile gösterilmiştir. Kromozomlar daha sonra diğer neoplazilerde tespit edilmiş ve kanserin genetiği önemli ölçüde ilerlemiştir. 2001 yılında, insan genomu hakkında ilk edinilen bilgiler ile moleküler biyolojideki ilerleme sayesinde; DNA’nın tümörlerin gelişimi, organizmanın bazı hastalıklara duyarlılığı ve ilaçların metabolizasyonu üzerindeki rolünün çözülmesine büyük ölçüde katkı sağlamıştır (Boveri 1914; Manchester 1995).

Kanser, canlıyı oluşturan hücrelerden herhangi bir çeşitinin yapı ve fonksiyon bakımından normalden farklılık göstererek, kontrolsüz bir biçimde çoğalması anlamına gelmektedir. Hızla üremeye başlayan bu atipik hücreler bir yandan ait oldukları dokuda/organda işlev bozukluklarına sebep olurken öte yandan da diğer doku ve organlara da yayılmaktadırlar. Köken aldığı dokuya göre, çok değişik ve farklı hastalık tabloları oluşturmaktadır. Bu nedenle de kanser tek ve özel bir hastalık olmayıp, köken aldığı hücreye göre, farklı özellikler gösterir. Kanser, hastalık yükü, öldürücülüğü ve

insidans artış eğilimi ile hem dünya hem de ülkemiz için bir halk sağlığı konusu ve problemidir. Dünyada 2008 yılında 12.4 milyon kişiye kanser teşhisi konulmuş ve 7.6 milyon kişi kanser nedeniyle ölmüştür (Hatipoğlu 2007).

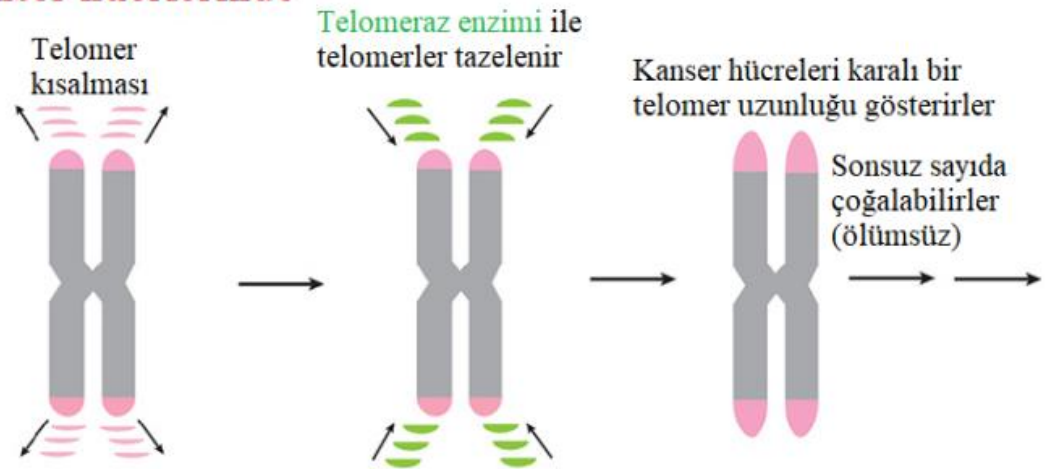
Kanser araştırmaları günümüzde 2 tip tedavi yönüne doğru evrilmiştir. Kanser araştırmalarının odak noktası kişiselleştirilmiş hedefe yönelik tedavi ve kanserin heterojenliğine doğru yapılan çalışmalardır. Yakın zamanda tanımlanan bazı biyobelirteçler rahim ağzı kanseri için PAX623 ve kolorektal kanser için BMP324 gibidir. Biyobelirteçlerin kanser türlerine özgü performansı farklılık göstermektedir (Qian ve ark.,2023). Kanser hücreleri, DNA'nın uçlarına tekrarlayan nükleotidler ekleyen ve telomer uzunluğunu aynı zamanda hücre bölünmesi yeteneğini geri kazandıran telomeraz enziminin artan ekspresyonunu ortaya çıkarır. Buda kanser hücrelerinin ölümsüz hücreler olması yönünde en önemli özelliklerinden biri olduğunu göstermektedir. Normal hücrelerden kanser hücrelerinin ayrıldığı en önemli noktalardan biri burasıdır (Artandi ve DePinho, 2009).

2.1.1. Kanser Hücrelerini Genel Özellikleri

1. Farklılaşma: Kanserler genellikle tek bir normal hücrenin farklılaşması sonucunda meydana gelirler. Farklılaşma, soya özgü hücre proliferasyonunun ekspresyonunu düzenlediği için önemli bir süreçtir. Farklılaşma aynı zamanda birçok biyolojik süreci etkileyen karmaşık, çok aşamalı bir süreçtir ve hücre farklılaşmasındaki kusurlar, kanser ve ilgili hastalıklarda 30 yıla aşkın süren çalışmalarla ortaya çıktı (Sachs 1980; Scott ve Maercklein, 1985; Wille ve Scott, 1986).

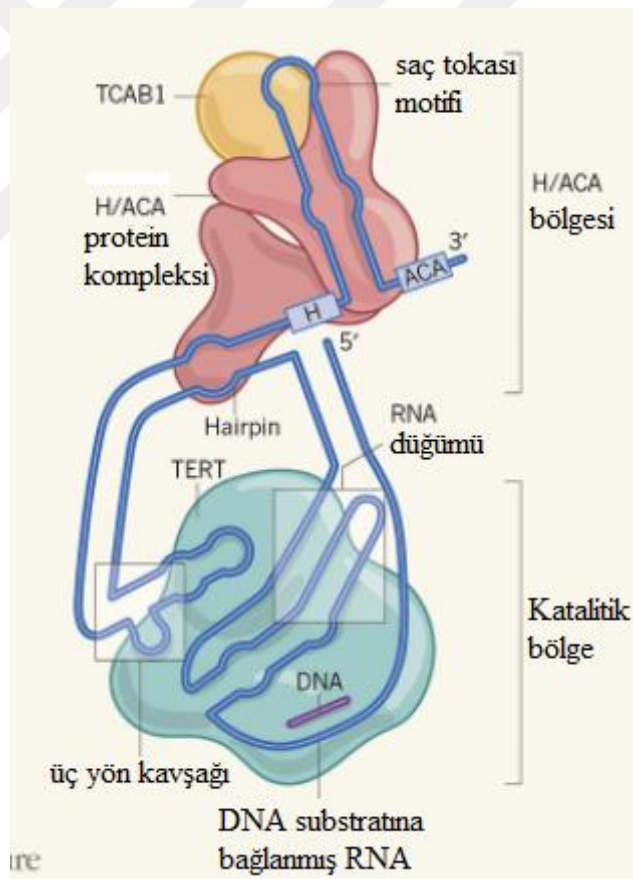
2. İmmortalite: Normal hücreler sınırlı sayıda olan bölünme yeteneklerine sahiptir. Kanser hücreleri ise sınırsız ve aşırı derecede hızlı bölünürler. İmmortalitede en önemli kısım kromozomum uç yapılarını oluşturan telomerdir. Hücreler çoğalırken, normal hücrelerde telomerler kısalırken kanserli hücrelerde telomer yapısı tekrar yenilenebilme özelliğine sahiptir (Şekil 2.2). Yapılan çalışmalarda bunu da telomeraz adlı enzimin yaptığı belirlenmiştir. Böylece telomerlerin boyu normal hücredeki gibi kısalmayarak sabit kaldığı görülmüştür (Kontomanolis ve ark., 2021).

Kanser hücrlerinde



Şekil 2.1. Kanser hücrelerinde telomer yapısının telomeraz enzimi ile yenilenmesi.

<http://scholarworks.moreheadstate.edu> (Erişim tarihi: 26 Ağustos 2025).



Şekil 2.2. İnsan telomeraz enzimi gösterimi.

<https://bilimblogum.wordpress.com> (Erişim tarihi: 26 Ağustos 2025).

Kanserli hücrelere yol açan hasarların çoğu, hücre bölünmesi için baskılayıcı sinyallerin eksikliğinden kaynaklanabileceği gibi, bu sinyallere karşı duyarlılığının eksikliğinden de kaynaklanabilir. Normalde hücre bölünmesini baskılayan TGF- β da meydana gelen mutasyonlar normal hücrelerde aşağı bir regülasyon göstererek ilgili faktörün doğru çalışmasını engellemektedir. Baskılayıcı sinyaller de gönderen bazı integrinlerin işlevselliğinin olmaması, kanser fenotipine de katkıda bulunabilir. Hücre zarından çekirdeğe sinyal ileten proteinlerin mutasyonu da yine fenotipik değişikliğe sebep olabilir. Kromozomların uçları, kromozomlar üzerinde koruyucu etki gösteren telomerler olan 5-6 nükleotidin tekrarlanmasıyla oluşur. Her bölünmede, bu telomerlerinin uçlarından 50-100 nükleotid dizisi kaybolur. Bu nedenle, birçok hücre bölünmesinden sonra, telomerler, koruyucu yeteneklerini bir süre sonra kaybederler, bunlar daha sonra yakından birleşerek karyotip bozukluklarına ve hücre ölümüne neden olabilirler (Artandi ve DePinho, 2009).

3. Mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama: Genom kararsızlığı ve mutasyonunun etkinleştirici özelliği, kanser oluşumu ve patogenezinin temel bir bileşenidir. Genomik ve kanser çalışmalarının ortaya çıkması; kanser hücrelerinin genomu boyunca mutasyonlarının tanımlanmasını sağlamıştır. kromatin mimarisini organize eden, modüle eden ve sürdüren genlerdeki mutasyonlar ve gen ekspresyonları düzenlenmiştir. Böylece fonksiyonel olarak kanser özellikleri ile ilişkilendirilmiştir. Mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama, tamamen epigenetik faktörler tarafından düzenlenen gen ifadesindeki değişiklikleri yansıtmaktadır. Epigenetik modifikasyonlar tümör mikrocevresi tarafından tümör modülasyonuna, heterojenitesine ve stromal hücrelerin düzenlenmesine katkıda bulunur. Mutasyona uğramayan epigenetik yeniden programlama, işlevsel yeteneklerin edinilmesini sağlayan bir farklılıktır.

4. Polimorfik mikrobiyomlar: Farklı dokularda veya neoplazmalarda bulunan mikrobiyomların, immün modülasyon, genom mutasyonu gibi fonksiyonel kapasiteleri kazanılmasına katkıda bulunurlar. Bazı mikrobiyomların, özellikle bakteri türlerini içeren koruyucu ve tümör teşvik eden müdahale etme özelliğiyle ilgili fonksiyonel çalışmalar olduğunu ortaya koyulmuştur. Mikrobiyotanın bu Modülatör rolleri sağladığı mekanizmalar hala tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır ancak iki genel etki üzerinde durulmaktadır. İlk etki bakteriyel toksinlerin ve DNA ya ve onun replikasyon sürecine doğrudan veya dolaylı olarak zarar veren diğer moleküllerin üretilmesi nedeniyle kronik

epitelyumun mutajenezidir. Ek olarak bakteriler hücre dışı proliferatif sinyalleri taklit eden moleküller ve kolonik epitel hücrelerinin tümör oluşumunu destekleyen hücre yaşlanmasına doğru yönlendiren sinyaller üretme yeteneğine sahiptir. Mikrobiyomlar bakterilerden immünmodülatör faktörlerin üretimi de dahil olmak üzere birçok yoldan adaptif ve doğuştan gelen bağışıklık sisteminin modülasyonunu içeren geniş bir etki alanı yaratır.

5. Fenotipik plastisitenin kilidinin açılması: Genotiplerin farklı çevresel koşullar altında farklı fenotipler üretmesi denir. Çevresel heterojenliğe uyum sağlaması ve organizmanın çevreye yanıt olarak davranışındaki, morfolojisindeki ve fizyolojisindeki bazı farklılıkları ifade etmesidir. Fenotipik plastisite, bir bireyin yaşamı boyunca kalıcı olabilen veya olmayan, çevresel olarak indüklenen değişikliklerine denir. Kansersiz hücrelerin çoğalması sırasında, tümör hücreleri toplu olarak hücresel plastisite olarak adlandırılan moleküler ve fenotipik değişikliklere uğrar. Bu tür değişiklikler mikroçevresel ipuçlarından, genetik ve epigenetik değişikliklerden veya tedaviye dayatılan seçici baskılardan kaynaklanmış ve böylece tümör heterojenitesine ve terapi direncine katkıda bulunmuşlardır. Epitelyal-mezenkimal plastisite, tümör hücresi plastisitesinin en iyi bilinen durumudur.

6. Bağışıklık sisteminden kaçmak: Bağışıklık sisteminden kaçma kanserin en belirgin özelliklerinden biridir. Bağışıklık sistemi iki ana işlevi yerine getirmek üzere gelişmiştir: ilki patojenik tehlikenin ortadan kaldırılması, ikincisi; kendi dokularına ve simbiyotik organizmalara karşı toleranstır. Kanser hücreleri bağışıklıktan kaçmak için 2 önemli yol kullanmaktadırlar. Bunlardan ilki soğuk tümörler ki buralarda bulunan efektör hücre infiltrasyonu, ikincisi ise sıcak tümörler infiltrate tümör hücreleri olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Kanser hücrelerinin bu şekilde mikroçevrenin kanserdeki önemini vurgulamaktadır. Bu doğrultuda, tümör hücreleri kazandıkları yetenekler sebebiyle, bir şekilde tümör hücrelerinin bağışıklık sisteminin daha farklı üyeleri tarafından tespit edilmesinden kaçarlarsa veya immün hücreler tarafından ortadan kaldırılmaktan kurtulurlar. Bu da immünolojik öldürme sisteminin sınırlandırılmasına ve böylece ölümden kaçmasına sebep olur.

7. Genom kararsızlığı ve mutasyonlar: Genomik kararsızlık ve buna bağlı olarak kansere neden olan genlerin mutasyonu, kanser gelişimini destekleyen iki anahtar

özellikten biridir. Hücre genomu, normal metabolizmanın çeşitli kimyasal reaktif ürünleri ve çevresel etkenler nedeniyle her hücre bölünmesinin replikasyonu sırasında rutin DNA hasarına maruz kalır. Mutant bir genotipe sahip olan bu kanser hücreleri, diğer hücrelere göre daha avantajlı hâle gelmekte ve böylece daha fazla proliferasyon ile bulunduğu ortamda hâkimiyet sağlamaktadır. Tümör baskılayıcı genlerdeki değişiklikler, histon modifikasyonu ve DNA metilasyonu gibi birçok kalıtsal epigenetik faktörden de kaynaklanır.

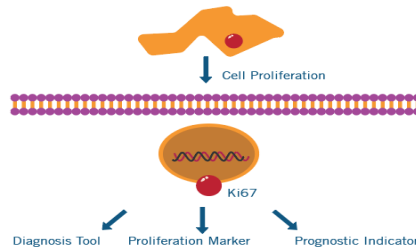
8. Büyüme baskılayıcılardan kaçınmak: Normal hücreler, çevreden çoğalmayı engelleyici sinyaller alarak hücre proliferasyonunu kontrol eder. Sessiz bir durumda kalabilir ve homeostaz da korunmuş olurlar. Kanser hücreleri ise tümör baskılayıcı genleri baskılayarak ve bazı hücre döngüsü kontrol noktalarını atlayarak büyüme karşıtı sinyallere karşı etkisiz hâle gelir. Hücreler çevrelerini izlerler ve ortamdan aldıkları sinyallere göre çoğalmalarına, hareketlerine ve hücre ölümüne karar verirler. Bu kararların alınmasında ve hücre döngüsünde kontrol görevi yapan önemli proteinler retinoblastoma ve p53'tür. p53 ve retinoblastoma proteininin işlev kaybı birçok kanserin gelişimiyle bağlantılı olan iki tümör baskılayıcısı olarak bilinmektedir. Her ikisi de hem hücre döngüsü hem de apoptozun düzenlenmesinde merkezi olarak bir rol oynamaktadır. Retinoblastoma proteini büyüme karşıtı sinyalleri iletirken, p53 proteini hücre içindeki stresi ve anormal olayları belirler. Retinoblastoma proteini ve hücre döngüsündeki kusurlar kalıcı hücre çoğalmasına sahip çoğu kanser hücresi türünde görülür. P53 proteinindeki fonksiyonel kaybın bir sonucu olarak kanser hücreleri, ortamdaki kritik hasarları algılamaktan kaçınabilir ve böylece apoptozu sınırlar veya önler (Özbayer 2022).

9. Genetik instabilite(heterojenite): DNA tamirinde meydana gelen sorunlar ana kaynağı oluşturur. Kanser hücrelerinin homojen bir yapı olmasını engeller. Bu kanser heterojenliği, 19. yüzyılın başından beri deneysel patologlar tarafından incelenmektedir. İlk olarak hücre morfolojideki farklılıklar ile karakterize edilen kanser heterojenliği, birkaç yüzyıl boyunca yüzey belirteç ekspresyonu ve daha sonra tümör büyüme oranlarındaki değişimler ve tedaviye yanıt ile düzenlendi. Moleküler teknolojilerdeki ilerlemeler, kanser heterojenliğinin altında yatan karmaşık mekanizmaların ortaya çıkarılmasında ve insan kanserleri arasındaki gerçek çeşitlilik kriterinin ortaya çıkarılmasında etkili olmuştur. Tümör heterojenliği, bir primer tümör içinde ve

metastazlarında veya farklı hastalarda aynı histopatolojik alt tipteki tümörler arasında, farklı biyolojik davranışlar ortaya çıkarılabilen farklı genotiplere ve fenotiplere sahip hücre alt popülasyonlarının varlığından kaynaklandığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Jacquemin ve ark., 2022).

Tümörler büyür, yayılır ve mikro çevreleriyle birlikte gelişir, bu da zamana bağlı olarak subklonal hücre değişkenliğine yani intratümöral heterojenite sebep olur. Zaman içinde, değişkenlik, nispeten kısa bir sürede ortaya çıkabilen tek bir tümörün genetik çeşitliliğindeki dinamik varyasyonlar için geçerlidir. Değişen yerel koşullara bağlı olarak oluşabilir. Bu alt popülasyonların evrimi, kısa veya uzun vadede değişen mikro koşullara bağlı olarak kaynağında genetik, epigenetik değişikliklerle gerçekleşir. Bu alt popülasyonların ortaya çıkmasının altında yatan faktörler genetik, epigenetik ve metabolik olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu alt popülasyonlar farklı aşama ve durumlarda farklı hücre tiplerine dönebilme özelliği gösterirler. Çarpıcı bir şekilde nöronal progenitörlerin insan prostat primer tümörlerine sızdığı bulunmuştur. Bunun da mikro çevreye etki eden faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Mauffrey ve ark., 2019).

Proliferasyonun, büyüme faktörlerinden bağımsız olarak devamlı artışı kültür ortamındaki kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerindendir. Kanser hücreleri besin yetersizliğinde bile büyümeye yönelme özelliklerinden dolayı bir bakıma kendi ölümlerini de hazırlarlar. Hücre proliferasyon antijeni Ki-67, döngüsel memeli hücrelerinde yapısal olarak eksprese edilir. Bu nedenle, tümörleri sınıflandırmak için bir hücre proliferasyon belirteci olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Ki-67 antijeni, 320kDa ve 359kDa'lık moleküler ağırlıkları bilinen iki izo formuna sahip bir nükleer DNA bağlayıcı protein tipi olarak karşımıza çıkmaktadır (MacCallum ve Hall, 2000; Gerdes ve ark., 1983).



Şekil 2.3. Ki67 proteinin gösterimi.

<https://biocare.net> (Erişim tarihi: 26 Ağustos 2025).

Ki-67 proteini, yalnızca aktif olarak bölünen hücrelerde üretilir ve hücrenin DNA'sının çoğunu içeren yapı olan çekirdektedir. Araştırmacılar genellikle Ki-67'yi kanser hastalarından alınan doku örneklerinde hangi hücrelerin aktif olarak bölündüğünü belirlemek için bir belirteç olarak kullanırlar. Son 10 yılda yapılan çalışmalarda, hücrelerin bölünmesi için Ki-67'nin gerekli olduğunu göstermiş ve hücreler bölünmeden önce ribozomları kullanarak yeni proteinler ürettikleri bununda Ki-67'nin sayesinde olduğu gösterilmiştir. Böylelikle acaba ribozom üretiminde Ki-67'nin rolü sorgulanmıştır. Ki-67 nin aktivitesinin inhibe etme kanser hücrelerinin proliferasyonu durdurabileceği hala bir araştırma konusu olarak karşımızda durmaktadır. Ama proliferasyon sırasındaki proteinlere etki ettiği güçlü bir şekilde düşünülmektedir. E tabiki bunun tersi etki yapabileceği de araştırmacılar tarafından araştırılmakta ve fare deneyleri devam etmektedir (Sobecki 2016).

10. Metastaz: Kanser hücrelerinin kaynaklandıkları organdan diğer uzak organlarda yayılması, kanserin nihai ve en ölümcül özelliklerinden biridir. Kanser hastalarının büyük çoğunluğu, primer tümörler nedeniyle değil, bu tümörlerin metastatik hareketleri sonucu ölmektedir. Primer tümörden gelen hücrelerin kademeli olarak mukozadan daha derin dokulara girme kapasitesini kazandığı bir dizi biyolojik olayları kapsayan büyük bir süreçtir; kan, lenfatikler yoluyla uzak organlara yayılırlar ve oralarda çoğalarak kendi tümörlerini farklı dokularda meydana getirmeye çalışırlar. Bunun sonucunda da kanser hücreleri metastazı gerçekleştirmiş ve ilgili birey veya canlının tüm vücuduna yayılımı sağlamış olur. Böylece geri dönüşülmeyen bir süreç kanser metastazı için başlar ve bireyler genellikle ölümle sonuçlanan bir sonuca doğru giderler (Massague ve Ganesh, 2021; Talmadge ve Fidler, 2010). Tümör hücrelerinin farklı fenotipik hücre durumlarını benimsemesi ve proliferasyonlarını desteklemek için ve tümör çevresindeki hücrelerin stromal hücre gibi davranıp bağışıklık sisteminden kaçtığı görülmüştür. Genellikle cerrahi ve radyasyon gibi lokal yöntemlerle tedavi edilebilen birincil tümörlerin aksine, metastatik kanser, organları doğrudan kolonize ederek çalışmalarını tehlikeye atarak değişmiş sekretomlar yoluyla metabolizmalarını farklılaştırarak birden fazla organı etkileyen ve sonunda ölüme yol açan sistemik bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır (Talmadge ve Fidler, 2010).

Metastazın aşamaları: Metastaz, zaman içinde üst üste gelebilen üç aşamaya ayrılır; yayılma, uyku hali ve kolonizasyon. Bu sırada kanser hücreleri, dokuları istila etmek, geçiş sırasında hayatta kalmak ve organları kolonize etmek için bir dizi adım geçirir ve bu toplu metastatik kaskad olarak tanımlanır. Yayılma sırasında tümör hücreleri, bazal membrandan daha derin doku katmanlarına istila eder ve nişe özgü büyüme faktörlerinin yokluğunda hayatta kalma yeteneği kazanır. Proksiyal kan damarlarına veya lenfatiklere intravazasyon ve sonunda transendotelyal göç kapiller bozulma meydana gelir. Nöronlar boyunca göç, peritoneal, plevral kaviterler gibi bitişik boşluklara doğrudan lokal yayılma yoluyla uzak organlara ekstrasvazasyonla metastaz hızlı bir şekilde devam eder. Aslında önce vücut hücrelerini kullanarak kendini hayatta tutar. Daha sonra kendi damarlanmasını yani beslenmesini sağlayarak metastatik süreçte çok etkili bir hal alır (Massague ve Ganesh, 2021; Lambert ve ark., 2017).

2.1.2. Kanser Genetiği

Kanser, somatik hücrelerin kalıtsal bir bozukluğudur. Birden fazla mutasyondan kaynaklanan benzersiz bir hastalık türüdür. Her mutasyon, tümörün boyutunda, düzensizlikte ve malignitede kademeli bir artışla ilişkili hücrelerin çoğalmasına yol açar. Kanserlerin bir yüzdesi (%4-8) etiyolojik olarak germ hücre mutasyonları ile bağlantılıdır ve ailelerde artan sıklıkta görüldüğü belirlenmiştir. Hastalar mutasyona uğramış bir tümör baskılayıcı geni kalıtsal olarak alır; bununla birlikte, sağlıklı alel tarafından üretilen tümör baskılayıcı protein hakimdir ve bu sebeple fenotip normal olarak görünmektedir. Böylece, bir kişinin yaşamı boyunca, diğer alelin olmaması ve sonuç olarak normal ürün ekspresyonunun kaybı meydana gelir. Bu durumda da 'kanser gelişimi' ile sonuçlanır (Wang ve ark., 2013).

Kanserler, farklı gen kombinasyonlarının sapması yoluyla ortaya çıkabilir veya mutasyona uğrayabilir ve aşırı eksprese edilebilir. Karsinogenez sırasında, genlerdeki değişiklikler veya mutasyonlar, normal bir hücrenin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına neden olan hücre döngüsü sırasındaki kontrol noktalarının göz ardı edilmesine yol açar. Bu nedenle kanser hücrelerinin iki kalıtsal özelliği vardır: ilki onlar ve soyları hücre bölünmesi üzerindeki normal kısıtlamalara karşı çoğalırlar, ikincisi normalde diğer hücreler için ayrılmış bölgeleri istila eder ve orada kolonize olurlar.

Yıllar geçtikçe, çeşitli bilim alanları, kanserin başlangıcını çevreleyen gizemi çözmeye çalışmıştır, ancak biriken bilgi ve klinik uygulamasından bağımsız olarak, kanser gelişim mekanizmasının tam olarak anlaşılması hala gerekli bir durumdur. Son zamanlarda, farklı biyobelirteçler iyimser yanıt vermiş ve kanser progresyonunun başarılı bir şekilde tahmin edilmesi için bu biyobelirteçler kullanılmıştır. Örneğin Epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) bir üyesi olan moleküler biyobelirteç HER2 (ERB2), meme kanserinin tespiti için kliniklerde kullanılmaktadır. Kanser moleküler belirteçleri, derin dizileme kanser kök hücreleri ve dolaşımdaki tümör hücreleri kullanılarak karşılaştırılır ve değerlendirilir. Ayrıca, moleküler belirteçler, moleküler tekniklerdeki ilerlemelerin kanseri moleküler bazda profillemeyi ve karakterize etmeyi mümkün kıldığı klinik ortamlarda potansiyel kullanımları açısından değerlendirilir. En önemli kalıtsal kanserler arasında meme kanseri, retinoblastom, nöroblastom, Wilms tümörü, tiroid kanseri ve kolorektal kanser bulunur. Bu vakalarda mutasyonların saptanması, bireylerin izlenmesi ve önlemlerin alınmasında ve erken terapötik önlemlerde çok önemlidir. Özellikle meme kanseri, otuz yaşından önce teşhis edilen tüm meme kanseri vakalarının 1/4'ünü oluşturur (Meera ve ark., 2018).

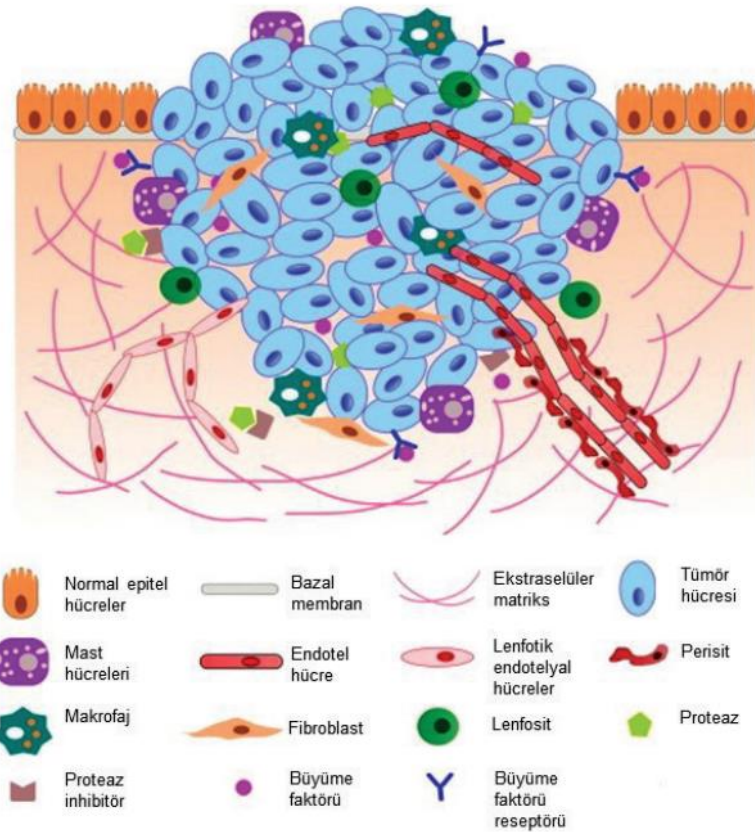
Kalıtsal kanserlerin % 45 'inde BRCA1 tümör baskılayıcı geninde mutasyon, diğer % 45'inde ise BRCA2 geninde mutasyon vardır. Her iki gen de östrojenler tarafından uyarılır. Ekspresyon ürünleri transkripsiyon faktörleri olarak işlev görür ve BRCA1 östrojen kaynaklı transkripsiyonu baskılar. Genlerin farklı alanlarını etkileyen mutasyonlar, karşılık gelen fizyolojik proteinlerin etkisini inhibe eden işlevsel olmayan proteinlere yol açar. Meme kanserine yatkınlık, mutasyona uğramış alelin varlığından kaynaklanırken, normal alelin yaklaşımda olan kaybı karsinogeneze yol açar (Kontomanolis ve ark., 2021).

2.1.3. Tümör Mikro Çevresi

Tümörün bulunduğu hücresel ortam olan Tümör mikroçevresi (TME); tümör hücreleri, kan damarları, Ekstraselüler Matriks (ECM)'yi, normal hücreleri ve sinyal moleküllerini içerir.

TME'de; stromal hücreler, fibroblastlar, bağışıklık hücreleri (T lenfositleri, B lenfositleri, doğal öldürücü hücreler (NK) ve tümörle ilişkili makrofajlar), ayrıca perisitler ile adipositlerin de dâhil olduğu farklı normal hücre türleri vardır. TME'deki stromal hücreler

ve fibroblastlar, hepatosit büyüme faktörü (HGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi büyüme faktörlerini ve bazı kemokinleri salgılayabilirler. Bu faktörler malign hücrelerin büyümesini ve hayatta kalmasına yardımcı olurlar. Aynı zamanda diğer hücrelerin TME'ye göçünü uyaran bir kemoatraktan olarak da işlev gösterirler. TME'de bulunan farklı T hücreleri ve B hücrelerinin, iyi ya da kötü prognozla ilişkili olup olmadığı belirsiz ve tartışmaya açık bir konudur. Bununla birlikte, çoğu solid tümör için, TME'de bulunan NK hücrelerinin ve doğal öldürücü T (NKT) hücrelerinin ise iyi prognoz ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Spesifik hücre tipi olarak, ECM, TME'nin diğer bir ana bileşenidir. ECM, farklı fiziksel ve biyokimyasal özelliklere sahip proteinler, glikoproteinler, proteoglikanlar ve polisakaritler gibi bileşikler beraberinde oluşturur. Tümör mikro çevresindeki hücreler için fiziksel bir yapı iskelesi sağlamanın yanında çok sayıda önemli büyüme faktörlerinin de beraberinde içerir. Tümörün gelişiminde önemli bir rol oynayan ECM'nin, TME'deki stromal hücrelerin davranışını bozabildiği, anjiyogenez ve inflamasyonu kolaylaştırabildiği bilinmektedir.



Şekil 2.4. Tümör hücrel ve hücrel olmayan elemanları gösterimi.

<https://norosirurji.dergisi.org> (Erişim tarihi: 26 Ağustos 2025).

2.1.3.1. Tümör Kaynaklı Stromanın Kökenleri

TME, tümör kütlesi ve destekleyici hücrelerden oluşan heterojen bir hücre topluluğudur. Destek görevi gören bu hücrelerin, yakın stroma kaynaklı olduğu ve tümör hücre çoğalması, anjiyojenezi, invazyonu ve metastazı gibi olayları desteklediği bilinmektedir. Ayrıca terapötik dirence aracılık eden mekanizmaları desteklediği de söz konusudur. Stromal hücreler arasında; fibroblastlar, adipositler, perisitler, vasküler endotelial hücreler ve kemik iliği mezenkimal stromal hücreleri bulunabilir. Normal yara iyileşmesi ve inflamatuvar süreçler sırasında, yerel stromal hücreler, tepkisel stroma fenotiplerini değiştirebilir. Bununla birlikte, bazı koşullar altında tümör hücreleri bu tepkisel stromal hücreleri birlikte seçebilir ve bu hücreleri tümörle ilişkili olan stromal hücrelere dönüştürme özelliği vardır. Tümörle ilişkili bu stromal hücrelerin ek olarak, gelişen/genişleyen mikro çevreye tümör ve protümörjenik hücreler kazandırabilecek protümörjenik faktörler salgıladığı da bilinmektedir. Tümör hücreleri ile konak stroma arasındaki etkileşimler, tümörün büyümesi ve ilerlemesinde çok önemlidir. Genel olarak değerlendirildiğinde, tümörler bileşimlerinde heterojen bir yapıya sahiptir. Bu heterojenliğin kaynağı, tümörün ilerlemesine yardımcı olan, tümör için çok sayıda büyüme faktörü ve aracı molekül salgılayan kemik iliği MSC ile, adipositler ve endotelial hücreler gibi yakındaki kanserli olmayan konakçı stromal hücrelerdir. Son zamanlarda, tümörler tarafından stromal hücre alımı/takviyesi için hedef olarak çeşitli olarak tanımlanmış konakçı dokular vardır. Bu kaynaklar arasında kemik iliği, bağ dokusu, yağ dokusu ve kan damarları vardır.

2.1.3.2. Tümörle İlişkili Stromal Hücreler (TASC)'in Alt Türlerinin İsimlendirilmesi

Tümör mikro çevresinde, fibroblastlar, miyofibroblastlar, perisitler, endotelial hücreler, makrofajlar, dendritik hücreler ve diğer immün hücreler bulunmaktadır. Fibroblastik popülasyonlar için; tümörle, kanserle ve karsinomla ilişkili fibroblastlar tümör/kanser ile ilişkili stromal hücreler olarak isimlendirilir. Kanserle ilişkili fibroblast; hastalığa maruz kalan, ancak bu hastalıkla ya da yayılmasıyla vücutta herhangi bir yerde olabilen bir fibroblasttır. Karsinomla ilişkili fibroblast, epitelyal orijinli bir tümörle doğrudan temasa geçebilen hücrelerken, tümörle ilişkili fibroblast ise bir tümörle doğrudan temas hâlinde ya da hemen bitişiğinde bulunabilen bir fibroblasttır. Ayrıca, tüm tümörle ilişkili hücreler "tümörle ilişkili stromal hücreler" (TASC) isimlendirmesi altında sınıflandırılabilmiştir.

2.1.3.3. Kanserle İlişkili Fibroblastalar (TAFs/CAFs)

Fibroblastlar, ECM'nin yeniden şekillenmesi ve yara iyileşmesi gibi süreçler esnasında geçici doku onarımı ve sağlıklı dokuların yapısını ve işlevini düzenleme görevindedirler. Bununla birlikte elde edilen bulgular, fibroblastların tümör içindeki stromal hücrelerin çoğunluğunu oluşturduğunu göstermektedir. Aktive edilmiş fibroblastlar olarak tanımlanabilen TAF/CAF'lerin, yara iyileşmesi ve inflamasyon süreçlerinde işlev gören normal fibroblastlar ile benzer özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Aktive edilmiş CAF'lerin çoğu, tümör mikro çevresinde bol miktarda bulunan büyüme faktörleri ve sitokinlere yanıt olarak toplanan ve aktive olan yerleşik fibroblastlar tarafından üretilirler. Bu hücreler ayrıca kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden kaynaklanabildikleri gibi epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) veya endotelyal mezenkimal geçiş (EndMT) yoluyla da tümör stromasında da üretilebilirler.

CAF'ler aktive olmalarının ardından, ECM'nin yeniden şekillenmesine sağlayan işlevleri yerine getirirler. Ayrıca, bu hücreler tümörün büyümesini, anjiyogenezini destekleyen ve terapötik tedaviye katkı sağlayan önemli bir büyüme faktörü ve sitokin kaynağı olarak da işlev görürler. Tümörün ilerlemesi sırasında, TAF/CAF'lerin çoğalma kapasiteleri artar ve çeşitli mekanizmalar aracılığıyla tümör büyümesini destek olurlar. Ayrıca bu hücreler terapötik direnç katkıları vardır. Ek olarak perisitleri ve endotel hücrelerini faktörleri uyarmasıyla anjiyogenezi artırdıkları ve ECM'nin yeniden şekillenmesinde rol oynadıkları belirtilmiştir. MSC ve fibroblastlardan türetilen TAF/CAF'lerin tanımlanmalarında, fibroblast-spesifik protein-1 ve fibroblast aktive edici protein gibi belirli belirteçler kullanılmıştır. Ancak, TAF/CAF kaynaklarının farklılığı, tümör mikro çevresinin heterojenliği ve normal konak fibroblastlarına benzer özellikler göstermeleri nedenleri ile ayırt edilmesi zor hale gelmiştir.

2.1.3.4. Kanserle İlişkili Fibroblastlar (CAF'ler)

CAF'ler, TME'deki stromal hücreler arasında en bol bulunan hücreler olup stromal hücrelerin büyük bir bölümünü oluştururlar. Tümör oluşumu, metastaz, anjiyogenez ve immün kaçış süreçlerinde çok önemli bir yerleri vardır. Bu hücrelerin tümör ilerlemesini destekleyen ve kanser hücrelerinin küçük popülasyonlarının tedaviden kaçmasına neden olan önemli sinyaller salgıladığı belirtilmiştir. Hücre-hücre kontağı aracılığıyla ilaç direnci, hücre dışı veziküllerin salgılanması ve ECM'nin yeniden şekillenmesinde önemli

bir yere sahiptir. Bu hücrelerin, birçok tümör tipinde çoğunlukta olmaları ve protümörojenik rollere sahip olmaları sebebiyle alternatif terapötik hedef olabilecekleri düşünülmüştür. Bu kısımda da birçok çalışma yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir. Bahsi geçtiği gibi TASC'lerin, tümör mikro çevresinin oluşumunu artıran/düzenleyen çeşitli çözünür faktörlerinin salgılanmasını sağlar. Bu faktörlere örnek olarak; proinflamatuvar sitokinler (IL-6, IL-8, IL-1B), matriks metalloproteinazlar ve büyüme faktörleri olarak örnek verilebilir.

2.1.3.5. Tümörle-İlişkili Endotelyal Hücreler

Tümörle ilişkili endotelyal hücreler (TEC), çoğalma ve göç gibi durumlarda normal endotelyal hücrelerden farklı davranırlar. Ayrıca büyüme faktörlerine ve kemoterapötik ilaçlara verilen yanıtlarda da normal endotelyal hücrelerden çok daha farklıdır. Aynı zamanda tümör hücrelerinin, tümörle ilişkili endotelyal hücrelerin terapötik yanıtı etkileyen immünsupresif aktivitelerini de tetiklediği gösterilmiştir. TEC'lerin invaziv özelliklerindeki bozukluklar ve damar sistemindeki yapısal anormallikler ile ilişkili olarak tümör damarlarında kan akışını bozdukları bilinmektedir. TEC'ler tarafından bazı faktörlerin (E-selektin, ICAM1, ICAM2 ve VCAM1) ifadesinin azaltılması durumunda, tümöre özgü olan sitotoksik T hücrelerinin tümör içine entegrasyonu bozulur. Ayrıca, TEC 'ler T hücre fonksiyonunu baskılama özelliğine sahiptir, immünsupresif miyeloid hücrelerin anti-tümör immün yanıtlarını bozabilmektedir.

2.1.3.6. İmmün Hücreler

Tümörmikro çevresinde hem makrofajlar, mast hücreleri, nötrofiller, dendritik hücreler, miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücreler ve NK hücreleri gibi doğuştan gelen bağışıklık hücreleri, hem de T ve B lenfositleri gibi adaptif bağışıklık hücreleri mevcuttur. Bu hücrelerin aktivasyon durumları ve TME içindeki lokalizasyonları birbirinden farklıdır. Bağışıklık hücreleri terapötik etkinliği hem destekleyebilir hem de engelleme durumu olabilir. Bağışıklık yanıtının tümör gelişimini engellediği genel olarak kabul edilen bilimsel bir görüştür. Ancak, elde edilen bulgular neticesinde tam tersi bir şekilde, TME' deki bağışıklık hücrelerinin, onkogenezi desteklemek için dönüşüm sağlayan hücrelerle yakından iletişim ve etkileşime girdiği de görülmüştür. Bu hücreler tümör hücreleriyle doğrudan temas yoluyla etkileşime girerler. Bir de tümörün davranışını ve tedaviye yanıtını şekillendiren kemokin ve sitokin sinyalleri yoluyla da etkileşime girdikleri

görülmüştür. Tümörün ilerlemesi sırasında bölgede meydana gelen değişiklikler, kronik inflamasyona benzetilir ve bu kronik inflamasyonlu dokuların genellikle yüksek kanser oluşturma riski olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. TME içinde, CD8 bellek T hücreleri ve CD4 T yardımcı 1 (Th1) hücreleri gibi birçok farklı T hücre popülasyonuna ait farklı hücre grupları olduğu bilinmektedir. Bu hücrelerinin salgıladığı faktörlerden biri olan interferon gamma (IFN γ), kanser gelişimini baskılayan bir sitokin olduğu bilinmektedir. Tümör mikro çevresinde, iyi öngörüm ile ilişkili olduğu düşünülen doğuştan sitotoksik lenfositler, NK ve NKT hücreleri de bulunduğu bilinmektedir.

2.1.3.7. Tümörle İlişkili Makrofajlar

Çoğu kanser türünün mikro çevresinde bol miktarda bulunan tümörle ilişkili makrofajlar (tumor-associated macrophages: TAMs), genellikle kötü klinik sonuçlarla ilişkilidir. Bu hücrelerin, tümörlerdeki baskın popülasyonlarından biri olması sebebiyle, kanser hücreleri ile olan etkileşimleri aslında tümör bağışıklık ortamının büyük bir kısmını şekillendirir. Tümörle ilişkili makrofajların, TME'de terapötik yanıtın düzenleyicileri olduğu söylenmiştir. Solid tümörlerde, tümörle ilişkili makrofajların ana kaynağı, tümörlerin içinde çoğalan yerleşik makrofajlardan ziyade dolaşan monosit adını verdiğimiz kan hücreleridir. Kemik iliğindeki monositler kan dolaşımı yoluyla tümörlere girebilir ve sonrasında makrofajlara da farklılaşma özelliğine sahiptir. TAM'ların, kanser hücresi immün kaçışını kolaylaştırmak, anjiyogenik değişimi desteklemek ve tümör hücresi invazyon ve metastazını hızlandırmak gibi görevleri vardır. TAM'lar, endotel hücrelerinin ve vasküler ağların oluşumunu destekleyen, ve bu durumda en çok göze çarpan vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi önemli proanjiyogenik faktörleri sağlayarak anjiyogenik süreci de beraberinde teşvik eder.

Makrofajlar, polarizasyon durumlarına göre M1 ve M2 alt tiplerine ayrılabilir. M1 makrofajları, IFN γ tarafından aktive edilebilir. M2 makrofajları ise IL-4, IL-10 gibi Th2 sitokinlerine yanıt olarak farklılaşır. M1 makrofajlarının tümör öldürücü etkiler gösterdiği, M2 makrofajlarının ise tümör oluşumunu teşvik ettiği kabul edilir. Yapılmış olan in vitro ve in vivo çalışmalar, TAM'ların bazı kemoterapötik ajanlara ayrıca anti-VEGF tedavisine karşı direnç aracılık ettiğini göstermiştir. Ayrıca, TAM'lar, baskılayıcı sitokin üretme kabiliyeti kazanarak TME'de T-hücre baskılanmasına katkıda bulunurlar. Miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücreler (myeloid-derived suppressor cells: MDSCs),

miyeloid progenitör hücreler, olgunlaşmamış makrofajlar, olgunlaşmamış granülositler ve olgunlaşmamış dendritik hücreler içeren miyeloid kökenli hücrelerin heterojen popülasyonundan oluşur. Bu hücreler, tümör oluşumu sırasında genişlerler ve çeşitli T-hücre yanıtlarını bastırabilme yeteneğine sahiptirler. Bu hücreler, hızla tümör bölgesine aktif olarak göç edebilir ve TAM'lar ile, anjiyogenez destekleyebilirler (Sağlam Uçar 2022).

2.1.3.8. Damar Sistemi

Yetişkin dokularında, çoğu kan damarları hareketsiz haldedir. Anjiyogenez, dışı üreme döngüsü sırasında ve yara iyileşmesi ile ilişkili olarak dokuların yeniden şekillenmesi gibi patofizyolojik koşullar altında meydana gelir. Aslında hücrel ve moleküler programların hem fizyolojik koşullarda hem de tümör anjiyogenezinde beraber seyrettiği söylenebilir. Ancak tümörlerde aktive olmuş proanjiyogenik sinyalleşme, tümörle ilişkili damarları belirgin şekilde düzensiz ve kararsız hâle getirir. Tümör anjiyogenezinin, proanjiyogenik faktörleri ifade eden kanser hücreleri tarafından düzenlendiği bilinmektedir. Bununla birlikte, TME'deki stromal hücrelerin, birçok tümör tipinde kronik anjiyogenezin başlaması ve sürdürülmesinde etkili olduğuna dair de kanıtlar bulunmuştur. Anjiyogenez, kanserin ayırt edici özelliği olarak kabul edilen tümör büyümesi ve metastazında çok kritik yönü vardır. Normal kan damarlarıyla karşılaştırıldığında, bir tümör içindeki damar sistemi, değişen yapısal ve işlevsel özellikler sebebiyle sınırlı besin kaynağı bulunmaktadır. Tümörde oluşan hipoksi, tümör hücrelerinin gen ifadelerinde değişiklik yapabilir. Bunun sonucunda da hücre sağ kalımı ve apoptoz indüksiyonuna karşı da direnç oluşturulur. Vasküler ağlardaki çeşitlilik, farklı TME'nin oluşumuna sebebiyet vererek, ilaçların tümördeki hücrelere dağılımını ve terapötik yanıtlarını da etkilemiş olur. FGF ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi büyüme faktörleri anjiyogenez sürecini düzenlemesine katkıda bulunur.

Anjiyogenez, tümör gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir esastır. Yapılan çalışmalarda çeşitli insan malignitelerini tedavi edebilmek için birçok anti-anjiyogenik ilaç geliştirilmiş ve bu ilaçlar test edilmiştir. Ancak bu anti-anjiyogenik ilaçların hastaların küçük bir grubunda sadece geçici iyileştirmeler gösterdiği gözlemlenmiştir. Tedavinin başarısız olmasının temel sebeplerinden biri, tümör damar yapısının bozulmasıyla birlikte hipoksinin tetiklenmesi ve bu durumun da TME'nin tümör yeni damar oluşumunu ve

büyümesini desteklemesi olabileceği düşünülmüştür. Öte yandan, VEGF ve VEGF reseptörünün (VEGFR) inhibisyonu ile ilgili olarak yapılmış olan çalışmalarda ise anti-anjiyogenik tedavilerin, ilaç dağıtımını artıracak fonksiyonel bir damar yapısı oluşturabileceğine dair çalışmalar yapılmıştır.

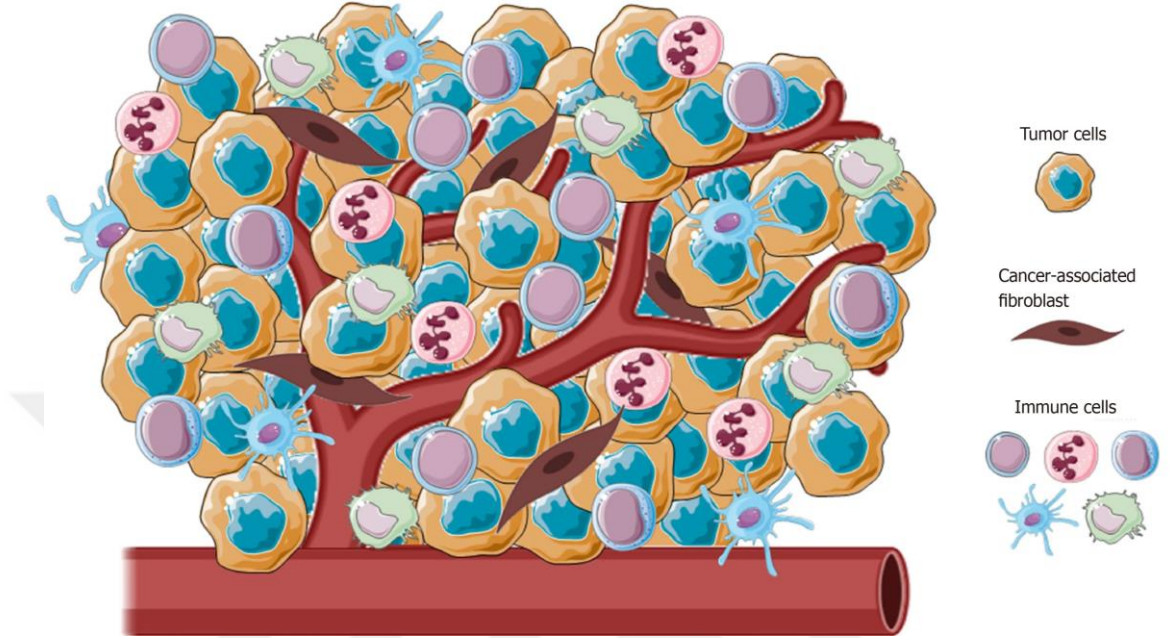
2.1.3.9. Ekstraselüler Matriks (ECM)

Normal doku stroması ile karşılaştırıldığında, tümör stroması, TME içindeki hücre tipleri tarafından üretilen değiştirilmiş bir ECM ile ilişkilidir. Oluşan bu karmaşık ağ sistemi sadece tümör hücrelerinin invazyon ve metastaz yapma yeteneğinde önemli rol oynamakla kalmamıştır. Aynı zamanda ilaç tedavilerindeki duyarlılığı da etkilemiştir. Tümör oluşumuna spesifik hücre tiplerinin katkılarının yanında, ECM de kanserin erken aşamalarında hastalığın başlangıcını sınırlama, sonraki aşamalarda ise hastalığın malign hâle gelmesine destek sağlama kapasitesine sahip olduğu söylenmiştir. ECM, kollajen, fibronektin ve laminin gibi çeşitli bileşenleri bulundurur. Bu bileşenler solid tümörlerde, mekanik güç sağlamalarının yanında, büyüme faktörlerinin işlevlerine ve sitokin bağlama özelliklerine katkı sağlarlar. ECM'nin bileşimi ve yapılanması, hücre-hücre etkileşimlerinde, tümör hücre yapısında ve ilaçların dağılımında fiziksel bir bariyer görevi görür. İyi organize edilmiş kollajen ağına ve hacim olarak azalmış ECM'ye sahip tümörler, daha düşük ilaç girişi ve dağılımı sergiler. Ayrıca, ilaçların ECM bileşenlerine bağlanarak ayrı kalmaları, ilacın tümörün daha derin kısımlarına nüfuz etmelerini engeller (Sağlam Uçar 2022).

2.1.4. Kanser Mikroçevresi

Kanser hücreleri ve konak hücreler arasındaki iletişim; konakçı hücreleri yeniden programlayarak, damar sistemini ve hücre dışı matrisi yeniden şekillendirerek tümör destekleyici ortamı düzenlerler. Bu dinamik süreç, kanser hücreleri ile tümör mikroçevresi'nin yerleşik kanserli olmayan hücreleri arasındaki heterotipik etkileşimlere bağlı bir durumdur. Tek hücreli transkriptomik veriler, toplu tümör ekspresyon profilleri ve uzamsal transkriptomik kullanılarak analiz ve modellemedeki bazı çalışmalar, tümör mikroçevresin'de hücreler arası sinyal ağlarının varyasyonlarının da ortaya koymuştur. Hücre-hücre teması ve parakrin sinyalleme de dahil olmak üzere, bu hücreler arası diyalogun düzenlendiği birçok mekanizma bulunmaktadır. Temaslı iletişime; integrinler,

kaderinler, selektinler ve immünoglobulin süper ailesi üyeleri, adezyon molekülleri aracılığıyla (Visser ve Joyce, 2023).



Şekil 2.5. Tümör mikroçevresi genel görünümü.

<https://evrimagaci.org> (Erişim tarihi: 26 Ağustos 2025).

Tümör mikroçevresi, tümör gelişim yörüngeleri üzerinde seçici bir etkiye sahiptir. Kötü huylu tümörlerde, kanser gelişiminin tümör ve TME hücreleri arasındaki dinamik ve karşılıklı etkileşimler tarafından düzenlendiği kabul edilmektedir. İyi huylu tümörlerin mikro çevresini kötü huylu tümörlerinkiyle karşılaştıran çalışmalar yeterli değildir. İyi huyludan kötü huyluya geçişte bile, tümörle ilişkili stromal hücrelerin rolü ile ilgili bilgiler sınırlıdır (Visser ve Joyce, 2023).

Tümör mikroçevresinin homeostazı ve evrimi; malign, endotelial, stromal ve immün hücreler dahil olmak üzere tüm hücresel bölmelerle beraber seyretmektedir. Bu etkileşim, yalnızca bir enerji kaynağı değildir. Aynı zamanda farklı hücresel bölmeler arasında iletişim sinyalleri hücre dışı metabolitleri de barındırır. Bu metabolik karmaşıklığa bir örnek olarak, kanserle ilişkili fibroblastlar ve adipositler, TME'ye alanin ve lipidler gibi besinler sağlayarak kötü huylu hücreleri destekleyebilir (Nieman ve ark., 2011). Kanser hücreleri, tümöre sızan bağışıklık hücrelerini kendi yararlarına kullanmak için metabolik yan ürünleri kullanabilir (Chen ve ark., 2017).

Tümör mikroçevre (TME), immün hücreler, tümörle ilişkili fibroblastlar, çevredeki kan damarları, hücre dışı matriks ve sinyal molekülleri dahil bir dizi bileşenden oluşur. Bu hücreler neoplazmanın ilerlemesine hız katar. Sağlıklı dokuların aksine TME, anormal kan damarları, yüksek interstisyel sıvı basıncı (IFP), spesifik metabolizma, azalmış pH değeri ve hipoksi gibi farklı fizyolojik özellikleri içinde bulundurur. Bu nedenle, etkili kanser teranostikleri için, bu terapötik ajanlar, astumovasküler sistem, TAF'ler, stromacelller ve ECM'nin çok katmanlı bir kalkanına nüfuz etmelidir. Bazı çalışmalarda, tümör hücrelerinin çeşitli tedavi yanıtlarını azaltılabildiği görülmüştür. Böylece, tümör hücrelerinin terapötik saldırılardan korunmuştur (Wu ve Dai, 2017).

2.1.5. Kanser Türleri İçin Bazı Belirteçleri

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), proliferasyon, sağkalım, göç ve tümörjenez gibi çeşitli sinyal yollarının ve fizyolojik yanıtların önemli bir belirteçidir. EGFR, GBM (Glioblastoma) hastalarının yaklaşık % 40 'ında amplifiye edilir. Genellikle yüksek dereceli klasik tümörlerle ilişkilidir. GBM'de onlarca ek EGFR kopyası olabilir. EGFR amplifasyonu olan hastaların yaklaşık yarısı, ancak olmayanların hiçbirinde, ekzon 2-7'nin (EGFRvIII) silinmesine bağlı yapısal olarak aktif bir mutasyon görülmez. EGFR vIII, bilinmeyen mekanizmalar yoluyla dinamik düzenleme altında olan ve "çift dakika" olarak adlandırılan küçük kromozomal dışı DNA parçalarıdır. Yaygın olarak EGFR'nin amplifikasyonunun veya mutasyonunun kötü sağkalımın bir göstergesi olduğu düşünülse de, bazı çalışmalar bu sonucu çıkaramamıştır. Bu moleküler markörün, reseptör tirozin kinaz (RTK) inhibitörlerine yanıt için bir öngörücü olarak hizmet edebilir. EGFR ile amplifiye tümörler başlangıçta RTK inhibisyonuna yanıt verirken, veriler genellikle bu tedavi şekline dirençli halde olabilir.

p53: Glioma da dahil olmak üzere hemen hemen her kanserde rol oynayan, en iyi bilinen tümör baskılayıcı proteinlerden biridir. Delesyonu meydana gelebilir, ancak yol, yukarı akış düzenleyicileri MDM2, MDM4 ve p14ARF'nin yanı sıra ATM ve ATR gibi aşağı akış efektörleri dahil olmak üzere bir dizi faktörle daha sık modüle edilir. TCGA verilerine dayanarak, GBM'nin %78'i bu yol içinde bir yerde mutasyonları vardır. Düşük dereceli gliomlarda bulunan p53 yolağındaki değişikliklerin yüksek dereceye ilerlemeye teşvik edilebilir. Primer GBM'lerde sıklıkla fosfat ve tensin homolog (PTEN) mutasyonları vardır. İkincil GBM'ler daha sıklıkla p53 geninin doğrudan mutasyonları

vardır. Bu markının yolu, hücre döngüsü regülasyonu, apoptoz, farklılaşma ve DNA hasar yanıtı gibi pek çok farklı hücreyel yanıtta işlevlidir. Bu proteinin hastalık üzerinde hangi prognostik ve prediktif yanıtı sahip olduğu hala büyük ölçüde tam olarak bilinmemektedir.

PI3K: Fosfoinositid 3-Kinaz (PI3K), PIP2'nin aşağı akış hedefi PKB/Akt'ı aktive eden PIP3'e dönüştürülmesinden sorumludur. PI3K yolu normalde EGFR ve diğer büyüme faktörü reseptörleri tarafından aktive edilmektedir. Hemen hemen tüm GBM' ler bu yolun bir yerinde artmış aktivite gösterir, fakat GBM' nin %15'inden daha azı PI3K'nın kendisinde aktive edici mutasyonlara sahip olduğu görülmektedir. PTEN, bu yolun negatif bir düzenleyicisidir ve bu nedenle mTOR1/2 aktivitesinin dolaylı aktivasyonu yoluyla hayatta kalma, proliferasyon ve göçte öne çıkar. GBM'nin yaklaşık % 40' ı bu proteinde mutasyonlara sahiptir ve % 70' i PTEN lokusunda heterozigotluk kaybı gösterir. Prognostik belirteç olarak PTEN kaybının değeri doğrulanmamış bir tartışma konusudur (Nikiforova ve Hamilton, 2011).

Ras / Raf / MAPK: Çoğunlukla Pronöral GBM'nin bir alt kümesinde meydana gelmiş ve trombositlerden türetilmiş büyüme faktöratör reseptörü alfa'nın (PDGFR α) amplifikasyonudur. Bu reseptör öncelikle üreme, sağkalım, farklılaşma ve apoptozda işlev gören transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini doğrudan düzenleyen Ras / Raf / MAPK yolunu aktive etmektedir. Yol ayrıca EGFR sinyalizasyonu ile aktive edilirken aşağı akış bileşenlerinin mutasyonları yoluyla doğrudan veya dolaylı olarak aktive edilebilir. Ras'ın kendisi birçok tümörde yaygın bir aktivasyon şeklidir. GBM'de nadiren görülür. Yukarı akış Ras antagonisti, nörofibromin 1 (NF1), birincil GBM'nin yaklaşık % 20'sinde silinir veya mutasyona uğrar.

CD15: Evreye özgü embriyonik antijen-1 veya CD15 (LeX olarak da adlandırılır), karbonhidrat yapısına sahip antijenik bir epitoptur. CD15, murin için bilinen bir belirteçtir, ancak insan pluripotent kök hücreleri için değildir. Bu protein, CD133–/CD15+ hücrelerinin in vivo tümörler oluşturduğu tespit edildiğinde GBM'de ön plana çıktı ve bunun yeni bir moleküler belirteç olabileceği fikrini ortaya çıkardı. Bununla birlikte, o zamandan beri diğer makaleler, CD15 + ve CD15 hücrelerinin farelerde tümör oluşturma yeteneğinde hiçbir fark bulamadı. Ayrıca, bu proteinin ekspresyonu ile sağkalım ve tedavi yanıtında bir fark bulunamamıştır (Harley ve Kornblum, 2017).

2.1.6. Türkiye ve Kanser

Kanserle savaşın ülkemizdeki tarihçesi Türkiye'nin kanser ile savaşı ilk kez Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumunun 1947 yılına kadar dayanmaktadır. 1962 yılında Ankara'da Ahmet Andıçen Onkoloji Hastanesi faali duruma geçmiştir. İlk olarak resmi kanserle savaş mücadelesi ise 1962 yılına temel sağlık hizmeti veren birimlerde kanserle mücadeleye yönelik şube şefliği kurulmasıyla başlangıç yapmıştır. 1982 yılında kanser ihbarı zorunlu hastalıklar kapsamına alınmıştır. 1989 yılında Kanser Savaş Birliği Üyeliği gerçekleşmiştir 1992 yılında Kanser kayıt ve insidans çalışmalarına başlanmıştır. 1996 yılında Kanser erken teşhis ve tarama merkezi projeleri kurulmuştur (YENİDÜNYA, E. (2014). Farklı olarak kolon, karaciğer, kemik ve meme kanseri hücre hatlarında anti-kanser etkilerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.).

Ülkemizde ortalama olarak kanser insidansı yüz binde 196'dır. Bu değer erkekler için 256.4/100.000, kadınlar için ise 158.1/100.000'dür. Mevcut artışlar ile projeksiyon yapıldığında ülkemizde 2030'lu yıllarda kanser insidansının iki misline çıkarak yüz binde 450'lere ulaşacağı düşünülmektedir. Ülkemizde en sık ölüme neden olan kanser türleri akciğer-trakea-bronş, mide, lösemi, mesane, kolorektal kanserle, multiple myelom; kadınlarda meme, over ve kolorektal kanserlerdir (Türkiye Sağlık Raporu 2012. Halk Sağlığı Uzmanları Derneği 2012; ss 1-527.).

Ülkemizde Halk Sağlığı Kurumu, Kanser Daire Başkanlığı'na yaş grubuna ve risk faktörlerine göre ulusal kanser tarama programları sınıflandırılmıştır. Bu tarama programları Aile Sağlığı Merkezleri (ASM) ve Toplum Sağlığı Merkezleri (TSM) bünyesindeki Kanser Erken Teşhis, Tarama ve Eğitim Merkezleri (KETEM) tarafından yürütülmekte, tarama test sonucu anormal olarak saptanan bireyler ileri merkeze nakledilmektedir (Kanser İstatistikleri 2017. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı.).

2.1.7. Dünya ve Kanser

Küresel çapta 2012’de 14,1 milyon yeni kanser vakası (erkeklerde 7 427 000 ve kadınlarda 6 663 000) ve 8,2 milyon kanser kaynaklı ölüm (erkeklerde 4 653 000 ve kadınlarda 3 548 000) görüldüğü düşünülmektedir. Küresel kanser yükünün zaman içinde artabileceği üç hipotez vardır. İlk olarak dünya nüfusunun 2008’deki 6,7 milyar seviyesinden 2012’de 7,4 milyara ulaşarak 2030’da beklenen 8.3’e yükselmesi yaş bazında oranlar sabit olsa bile kanser yükünde bir artışa sebep olabilir. İkincisi, kanser riskinin yaşa bağlı olarak büyük ölçüde artışının ışığında popülasyonun boyutu ve yaş bazında oranların sabitlendiği durumda yük, nüfusun yaşlanmasıyla artacaktır. Kanser yükünde bir artışa neden olabilecek üçüncü unsur ise popülasyonun büyüklüğü ve yaş dağılımı değişmese bile insidans oranları temelinde yatan bir artıştır. Bu verilere dayanarak, demografik değişimleri ve kanser insidansında yıllık %1’lik bir artış öngörerek, 2030’da yaklaşık olarak yıllık 26.4 milyon yeni kanser vakası ve 17 milyon kanser kaynaklı ölüm gerçekleşebilir (Lopez ve ark., 2007).

Bir çalışmada, 50 kolorektal, 50 meme ve 24 prostat kanserli hastanın dâhil edildiği bir çalışmada bilgilendirme sonrası hastaların %41,1’nin diyet değişikliği yaptığı, %22,6’sının sigarayı azalttığı veya bıraktığı, % 13.7’sinin fiziksel aktivite yapmaya başladığı belirlenmiştir. Bu çalışmada diyet değişikliğinde farkındalık, yaş ve eğitim anlamlıdır. Ayrıca erkek kolorektal kanserli hastalarla karşılaştırıldığında kadın hastaların sırasıyla 15 ve 17 kat oranda sigara alışkanlığında değişiklik yaptığı belirlenmiştir. Ancak literatürde kanser tanısı alan hastaların yakınlarında kanserden korunmaya yönelik tutum ve davranış değişikliği olup olmadığına ilişkin yeterince çalışma bulunamamıştır. Erken teşhisin kanser mortalitesini azalttığını gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Kanser tarama testleri, koruyucu ve birinci basamak sağlık hizmeti veren aile hekimlerinin en can alıcı periyodik sağlık muayenelerinden biridir (Kostopoulou ve Katsouyanni, 2006).

2.2. Nöroblastoma

Nöroblastom (NB), sempatik sinir sisteminin gelişimsel bir malignitesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Nöral krest hücrelerinden kaynaklanan sempatik sinir sistemi kanseridir. Bebeklik ve erken çocukluk döneminde oluşan bir tümördür. NB, göç eden nöral krest hücreleri ve bunların soylarından, tercihen adrenal medulla veya paraspinal gangliyonlarda ortaya çıktığı bilinmektedir. NB, tüm pediatrik kanserlerin yaklaşık % 10’

unu oluşturur. Genellikle çocukluktaki ilk 5 yılı etkiler. Bir yaşı altındaki çocuklarda en sık tanı konulan bir neoplazma olarak karşımıza çıkmaktadır. Başlangıçta NB lokalize veya metastatik hastalık olarak ortaya çıkabilir. Hastaların tanısı, yaşı, evre, histolojik özellikler ve moleküler değişiklikler gibi çeşitli prognostik faktörlere göre farklı risk gruplarında sınıflandırma yapılır. NB, özellikle sağkalım oranı neredeyse %40'a ulaşan kemo-dirençli nüksü sürdüren yüksek riskli görülen hastalarda çocukluk çağı kanser mortalitesine önemli ölçüde katkıda bulunur (Padovan-Merhar ve ark., 2016).

Nöroblastom, pediatrik onkolojinin büyük bir sorundur. Belirli genetik/epigenetik değişikliklere müdahale etmeyi amaçlayan yeni hedefe yönelik tedavilerin tasarımı, hastaya özel hassas tıp yaklaşımlarına ulaşmak için faydalı bir stratejiyi temsil eder. NB, düzenleyici ağlar içinde ve hastalık fenotipini oluşturmak veya değiştirmek için birbiriyle ilişkili yollarda hareket eden, kodlayan veya kodlamayan birkaç sürücü ve baskılayıcı genin etkileşimine bağlı olan dikkate değer bir biyolojik ve genetik heterojenlik gösteren karmaşık bir neoplazmadır. Kapsamlı genomik peyzaj çalışmaları, nöroblastom da dahil olmak üzere pediatrik kanserlerin yetişkin kanserlerinden daha düşük mutasyon oranlarına sahiptir. Ayrıca, pediatrik kanserlerde, sıklıkla mutasyona uğramış sürücü genler, çoklu sürücü genlerinin birlikte mutasyonunun daha yaygın olduğu yetişkin kanserlerinin aksine, tipik olarak birbirini dışlayan bir şekilde meydana gelir. Bu farklılıklar, pediatrik ve yetişkin tümörlerinin farklı kökenlerini de göstermektedir (Maris 2010).

Son birkaç on yılda, immünoterapi, kök hücre nakli ve temel kemoterapideki gelişmelerle, nöroblastom tedavisi ökritik derecede iyileşmiş ve hastalığın yükünü azaltmıştır. Yüksek riskli hastalar için hayatta kalma şansı %50'den azdır ve nöroblastoma bağlı mortalite oranı yüksek kalmaktadır. Çocuklarda ise kansere bağlı tüm ölümlerin %12-15'ini oluşturmaktadır. Nöroblastom, spontan regresyonlu asemptomatik benign maligniteden, geniş çapta yayılabilen ve sıklıkla ölümcül olabilen çok agresif proliferatif tümörlere kadar değişebilen geniş bir klinik spektrum ortaya çıkarır (Ponzoni ve ark., 2022).

Nöroblastoma, genetik açıdan bakıldığında; 1p, 11q, 14q delesyonları ve 17q kazancı gibi sayısal veya yapısal kromozomal değişiklikleri bulundurur. Ayrıca daha kötü prognoz ile ilişkili olan çeşitli gen değişiklikleri de sunabilir. Spesifik olarak, tümörler MYCN

amplifasyonu ve Anaplastik lenfoma kinaz (ALK) ve PHOX2B'nin germ hattı veya somatik mutasyonları, ATRX ve TERT lokuslarında tekrar düzenlemeler oluşturabilir. Yüksek riskli hastalarda baskın olan MYCN amplifasyonu ATRX ve TERT farklılıkları telomer idamesine yol açar ve RAS ve/veya p53 yolağı mutasyonları ile kombinasyon halinde tümör agresifliğini arttırmış olur. Ayrıca, gen ekspresyonunun deregülasyonu, özellikle MYCN, ALK, PHOX2B ve LIN28B'nin aşırı ekspresyonu, hücre proliferasyonu ve farklılaşması arasındaki dengeyi değiştirerek NB'nin başlatılmasında ve ilerlemesinde önemlidir (Van Limpt ve ark., 2005).

Tümör oluşumunun diğer yaygın bölgeleri; omurga boyunca, karın veya göğüs kafesinde bulunan sempatik gangliyonlardır. Primer tümörün adrenal bezdeki lokalizasyonu, sempatik gangliyonlara göre daha kötü bir prognozla ilişkilidir. Ortalama tanı yaşı 18 ay olarak belirlenmiştir. Nöroblastomun klinik spektrumu, genellikle tedavi direncinin eşlik ettiği agresif hastalıktan, bir hasta alt grubunda terapötik müdahale olmaksızın tam spontan regresyona neden olan düşük riskli hastalığa kadar oldukça çeşitlidir. Bu çok yönlü klinik tablo, altta yatan bir moleküler çeşitlilikten kaynaklanmaktadır. Nöroblastomlar, gelişimsel kökene, telomer idame mekanizmalarına ve/veya belirli tekrarlayan genetik olayların varlığına göre gruplara ayrılabilir. Bu farklı alt tipler, moleküler antiteler ve gruplar farklı klinik prognoza sahiptir. Konvansiyonel tedavilere ek olarak spesifik moleküler hedefe yönelik tedavilerle tedavi edilmesi önerilir (Brodeur 2003;Matthay 2016).

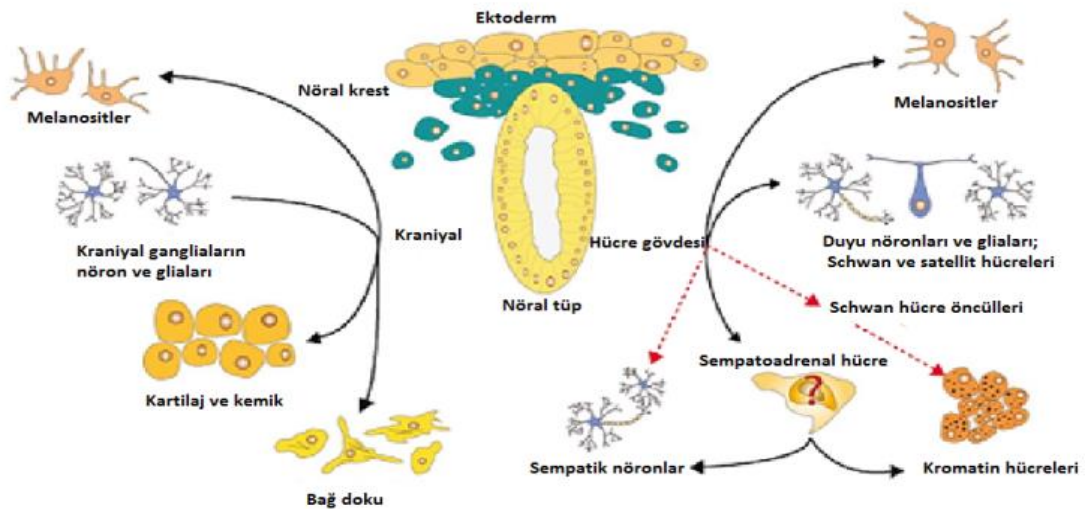
Profiller, nöroblastom hücreleri adrenerjik veya mezenkimal özellikler sunabilir. Mezenkimal özelliklere sahip nöroblastomlar daha farklılaşmamış, kök hücre benzeri, nöroblastom hücre hatları ve in vitro kültürlerin yanı sıra nükseden tümörler ve metastazlarda zenginleştirilmiştir. Nöroblastom tümörlerinin ekspresyon profillerini tek hücreli RNA dizilemesi kullanarak adrenal bezin gelişmekte olan hücreleriyle karşılaştıran son yapılan çalışmalarda, nöroblastom tümörlerinin gelişmekte olan nöroblast hücrelerine en çok benzediği belirlenmiştir. Klinik nöroblastom alt tipleri farklı derecede farklılaşma gösterir. Düşük riskli tümörler diferansiye geç nöroblastlara benzerken, yüksek riskli MYCN amplifiye Nöroblastomlar daha farklılaşmamış nöroblastlara benzer. Mezenkimal özelliklere sahip yüksek riskli nöroblastomların ekspresyon profilleri, köprü ve bağlayıcı progenitör hücrelere benzer ve bu nedenle diğer tüm alt tiplere göre daha fazla kök hücre benzeridir (Jansky ve ark.,2021).

Nöroblastomun klinik prezentasyonu, tümör biyolojisine ve/veya hastanın yaşı ve lokal veya uzak yayılma derecesi gibi belirli klinik özelliklere göre değişmektedir. Adrenal primer tümörler abdominal kitle şeklinde ortaya çıkabilirken, sempatik sinir köklerinden köken alan tümörler orijin bölgesine göre değişen semptomlarla meydana gelir. Horner sendromu, sıklıkla boyunda ortaya çıkan tümörleri olan hastalarda ortaya çıkar. Boyun veya göğüs tümörü olan hastalarda hava yolu uzlaşması meydana gelebilir. Vasküler yapılar herhangi bir anatomik lokalizasyonda nöroblastomlardan etkilenebilirken, nöral foramina invazyonu omurilik veya kauda equina'nın sıkışmasına sebep olabilirler. Metastazlar hastaların yaklaşık %50'sinde tanı sırasında ön plandadır. Kemik iliği, kemik ve lenf düğümleri başlıca tutulum bölgeleridir. En sık 1 yaş < bebeklerde görülen yaygın karaciğer hastalığı, hepatik sentetik disfonksiyon ve koagülopati veya abdominal kompartman sendromu ile ilişkilendirilebilir. Metastatik hastalığı olan hastalar sıklıkla kemik ve/veya kemik küresi hastalığına bağlı ateş, halsizlik, ağrı ve/veya sitopeni ile başvuru yaparlar. Tümörlerden vazoaktif intestinal peptit salgılanması sebebiyle bol sulu ishal veya istemsiz sakkadik göz hareketleri, iskelet kası miyoklonusu ve serebel lar ataksi ile karakterize opsoklonus miyoklonus sendromu (OMS) dahil olmak üzere nadir paraneoplastik olaylar meydana gelebilir. OMS muhtemelen nöroblastomla ilişkili antinöronal antikorların gelişimi yansıtabilir (Bo Qiu ve ark., 2022).

NB, nöral krest içindeki hücrelerden, muhtemelen sempatik ganglion ve adrenal katekolamin salgılayan kromaffin hücrelerine farklılaşan sempatoadrenal progenitör hücrelerden türetiliği söylenebilir. Diyagnozdaki prezentasyon ve semptomlar, genel olarak adrenal medullada veya sempatik gangliyonlar boyunca herhangi bir yerde tümörün yerini yansıtmaktadır. Tanı konulan hastaların yaklaşık %50'sinde metastaz bulunur. Kemik iliği metastazları olguların yaklaşık olarak %80'ine karşılık gelir. Metastazlar kemiklerde ve bölgesel lenf bezlerinde de bulunur. Uluslararası Nöroblastom Patolojisi Komitesine göre, tümörde bulunan Schwannian stroma miktarını ve mitoz karyoreksis indeksini (MKI) içeren histolojik bulgulara göre NB tümörlerini farklı alt tiplere sınıflandırmaktadır. Genel olarak, kötü diferansiye veya diferansiye olmayan hastalara daha kötü bir prognoz sağlamaktadır. Yaş da önemli bir prognostik göstergedir; <18 aylık hastalarda, MKI yüksek değilse, kötü diferansiye NB hala olumlu bir prognoz olarak kabul edilir. Yaş>18 aylık hastalarda, kötü diferansiye NB her zaman olumsuzdur (Cogo ve ark., 2020).

2.2.1. Nöroblastomanın Kökeni

Nöral krest hücreleri, yalnızca omurgalılarda bulunan bir hücre popülasyonudur. Nöral krest, embriyonik ektodermden kaynaklanır ve kapandıktan sonra nöral tüpten gelişir. Nöral krest hücrelerinin çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşması, çeşitli anatomik yapıların ortaya çıkmasına da katkı sağlar. Bu hücrelerin polaritesini kaybettiği ve azalmış adezyon kazandığı bir süreç olan epitelden mezenkimale geçişe (EMT) bağlı olarak ortaya çıkar. Bu da nöral krest hücrelerinin nöral tüpten delaminasyona uğramasına ve göç etmesine izin verir. Bu hücreler tek tek veya toplu olarak kalıplaşmış yollar boyunca göç eder. Embriyoda çok sayıda, genellikle uzak kısımlarına ulaşır ve sonunda melanositler, kraniyofasiyal kıkırdak hücreleri ve kemikler, düz kas hücreleri, periferik nöronlar ve glial hücreler dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine farklılaşırlar. Epigenetik ve transkripsiyonel programlardan oluşan bir kompleks; nöral krest hücrelerinin delaminasyonunu, göçünü ve göç sonrası farklılaşmasını düzenler. Bu programlar histon modifikasyonu, DNA metilasyonu ve kemik morfogenetik proteinlerinin ve transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu içerir. Nöral krest hücreleri beş fonksiyonel tipe ayrılabilir: vagal, sakral, kraniyal, kardiyak ve gövde hücreleri şeklindedir. Bu nedenle, nöral krest hücreleri; multipotent progenitörlerden farklılaşmış hücre tiplerine, periferik sinir sisteminin nöronlarından ve gliasından melanositlere, kranias ve kraniyofasiyal iskeletin kemik hücrelerine hızla geçen bir geçiş hücre tipini temsil eder (Bronner and Simoes-Costa, 2016).



Şekil 2.6. Nöral krest orjinli olan hücreler (Maris ve ark., 2007).

Başlangıçta, nöral krest hücrelerinin, göç sonrası aşamaya ulaştıklarında multipotent özelliklerini veya plastisiteyi yavaş yavaş kaybettiği düşünülüyordu. Bugüne kadar, yüksek plastisiteye ve in vitro küre oluşturma yeteneğine sahip bazı alt popülasyonların, geç embriyonik ve postnatal aşamalarda ve hatta yetişkin vücutta çeşitli dokularda tutulduğu kanıtlanmıştır. Yetişkin organizmada, nöral krestin progenitör hücreleri, deri, dorsal kök gangliyonları, adrenal medulla, kemik iliği ve bir dizi başka doku dahil olmak üzere birçok doku tipinde bulunur. Yetişkin nöral krest türevi hücrelerin kök hücrelerin özelliklerini koruduğu gösterilmiştir. Birkaç çalışma, bu tür nöral krest kök hücre popülasyonlarının sıklıkla hem embriyonik kök hücrelerin hem de nöral krest progenitör hücrelerinin transkripsiyonel ekspresyon profillerini taklit ettiğini gösterilmiştir. Yetişkin organizmanın dokularında nöral krest progenitör hücrelerinin varlığı ve geniş dağılımı, nöral krestten kaynaklanan tümörlerin ortaya çıkmasına katkıda bulunabilir (Motohashi and Kunisada, 2015).

Nöral krestin multipotent progenitör hücreleri, yetişkin organizmada çok çeşitli tümörlere dönüşebilir. Nöral krest progenitör hücrelerinin farklı lokalizasyonu ve spesifikasyonu nedeniyle, bunlardan kaynaklanan tümörler heterojen bir grup oluşturur. Böylece vücudun farklı yerlerinden kaynak oluşturabilirler. Bunlar; melanom ve nöroblastom gibi yaygın yetişkin ve pediatrik kanserlerin yanı sıra paraganglioma, feokromasitoma, schwannoma, esthesioneuroblastoma, malign periferik sinir kılıfı tümörleri, granüler hücreli tümörler, nörofibrom, perineürioma, nörotekoma, sinir kılıfı miksoması ve medüller tiroid kanseri gibi daha az yaygın tümör türlerini içerir (Gupta 2005).

Birçok araştırmacı, nöral krestten kaynaklanan tümörlerin, nöral krest hücrelerinin kendini yenileme ve göç etme konusundaki kendi yetenekleri nedeniyle metastatik hastalık gelişimine yatkın olabileceğini sunmaktadır. Snail, Twist, SoxE ve FoxD ailelerinin üyeleri de dahil olmak üzere nöral krest gelişimi için önemli olan farklı transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu birçok kanserde yukarı yönde regüle edilir. Hem nöral krest hücreleri hem de tümör hücreleri benzer EMT süreçlerinden geçebilmektedir. Böylece her iki hücre tipi de hücre istilasını ve göçünü kolaylaştıran matris metaloproteinazları (MMP'ler) ve bir disintegrin ve metaloproteinazları (ADAM'lar) yukarı yönde eksprese eder. Bu benzerlikler, tümör oluşumu sürecinin altında yatan genetik değişikliklerin, kısmen, embriyogenezden sonra genellikle tamamen baskılanan nöral krest hücrelerinin delaminasyonu ve göçü için gerekli faktörlerin ve sinyallerin

yeniden aktivasyonu nedeniyle karşımıza çıkabilir. Bir nöral krest hücresinin bir katekolaminerjik/adrenal kromaffin hücresine mi yoksa sempatik bir nörona mı farklılaştığı, kemik morfogenetik proteinlerine (BMP'ler) bağlıdır. Sox10 ve Mash1 dahil olmak üzere bir dizi transkripsiyon faktörü, BMP'ler tarafından indüklenir. Böylece göç eden nöral krest hücrelerinin sempatoadrenal hücrelere farklılaşmasını düzenlemede katkı bulunur (Thevenneau ve Mayor, 2012).

2.2.2. Nöroblastom' da Tümör Gerilemesi

Nöroblastom teşhisi koyulmuş bebeklerde, özellikle evre 4S hastalığı olanlarda (yani, deri, karaciğer veya kemik iliği ile sınırlı metastazı olan <1 yaşındaki hastalar) spontan olgunlaşma ve gerilemede tanımlanma yapılmıştır. Ayrıca, bebeklerin 3 aylıkken nöroblastom için idrar katekolaminleri ölçülerek taranması, tarama sırasında yaşamın ilerleyen dönemlerinde ortaya çıkan tümör sayısından çok daha fazla nöroblastomun tespit edildiği belirlenmiştir. Spontan tümör regresyonunun mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Bu tümörler klinik olarak ortaya çıkmadan önce gerilemesi de mümkündür. Evre 4S nöroblastomlu çocuklarda; vakaların en az yarısında kendiliğinden gerilediği bilinmektedir. Bu da telomer krizinin tümör regresyonunda rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Tümör gerilemesinin altında yatan muhtemel anahtar mekanizmalardan biri, nöroblastomun sinir büyüme faktörü (NGF)'ne bağımlılığıdır. Gelişmekte olan sempatik nöronlardaki NGF tükenmesi, TP53, TP63 gibi birçok pro-apoptotik geni indükler. Bu genler ayrıca evre 4S tümörleri de dahil olmak üzere olumlu ilerleyen nöroblastomlarda yüksek seviyelerde eksprese edilir.

2.2.3. Genetik Risk Faktörleri

1970'lerde, nöroblastomun retinoblastom ile benzer bir genetik temele sahip olduğu öne sürülmüştür. Daha sonra ailesel hastalığı açıklayan 'iki vuruşlu' bir model oluşturuldu. (ilk vuruş bir germ hattı mutasyonu, ardından edinilmiş bir somatik mutasyonun ikinci vuruşu geldi). Retinoblastomdan farklı olarak, ailesel nöroblastom vakaları son derece nadir olarak görülür. Vakaların yalnızca %1-2'sinde bulunur. 2008 yılında, ALK'daki germ hattı fonksiyon kazanımı mutasyonları, ailesel nöroblastom için ana hastalığa yatkın bir faktör olarak belirlenmiştir. 'İkinci vuruş' henüz tanımlanmamakla birlikte diğer ALK alelinin bir mutasyonu kadar basit değildir. Mutasyona uğramış alelin amplifikasyonu veya normal alelin silinmesi de söz konusu olabilir (Matthay ve ark., 2016).

Nöroblastomanın; tanı yaşı, histoloji ve metastazı açısından soy ağaçlarında önemli bir klinik davranış heterojenliği gözlenmiştir. Ailesel nöroblastom çok nadir olmasına rağmen, bu soyağaçları nöroblastomun genetik itici güçlerini tanımlamak için eşsiz bir durumdur. Nöroblastomda tanımlanan ilk yatkınlık geni, nöral krestten türetilmiş otonomik nöronların gelişiminde önemli bir rol oynayan hücre döngüsü çıkışı ve nöronal farklılaşmayı destekleyen eşleştirilmiş transkripsiyon faktörünü kodlayan bir gen olan PHOX2B (Eşleştirilmiş Benzeri Homeobox 2b) olarak tanımlanmıştır. PHOX2B'nin germ hattı mutasyonları kalıtsal nöroblastom vakalarının %<10'unda görülür. Somatik PHOX2B mutasyonları ise sporadik vakalarda nadiren görülür. PHOX2B mutasyonları konjenital merkezi hipoventilasyon sendromu ve Hirschsprung hastalığı gibi nöral krest kaynaklı bozukluklarda karşımıza çıkmaktadır. Polialanin olmayan tekrar genişleme mutasyonları olan ailelerde; tipik olarak en şiddetli fenotip olan nöroblastoma Hirschsprung hastalığı-hipoventilasyon sendromu ilişkisini yaşamışlardır. Bu nedenle, bu gözlemler, PHOX2B tarafından düzenlenen farklılaşma yolundaki bozulmaların, ortak bir genetik faktör olabilir (Takita 2021).

Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), nöroblastomun, nöroblastom oluşumunu etkileyebilen yaygın polimorfik alellerle ilişkili karmaşık bir genetik hastalık olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bugüne kadar nöroblastomla ilgili doğrulanmış genetik ilişkiler tanımlanmıştır. Her ilişkinin hastalığın başlangıcı üzerinde nispeten mütevazı bir etkisi mevcuttur. Ancak birden fazla ilişki, nörogelişim sırasında malign dönüşümü teşvik etmek için bireysel bir hastada birlikte çalışabilir. GWAS, yalnızca hastalığın başlamasına katılmakla kalmayıp aynı zamanda hastalığın ilerlemesi ve sürdürülmesinde de rol oynayan, translasyonel ilgisi olabilecek önemli hücresel ağlarla karşımıza çıkabilir. GWAS tarafından tanımlanan birçok nöroblastoma yatkınlık geninin, yerleşik hastalıkta güçlü onkojenik veya tümör baskılayıcı işlevlere sahiptir. Bu da hastalığın başlangıcında iş birliği yapan gen ekspresyonu üzerindeki ince etkilerin, tümörler geliştikçe stokastik ve/veya epigenetik olarak seçildiği tartışma konusu olarak belirlenmiştir. Arttırıcılar gibi distal düzenleyici elemanlar muhtemelen bu seçimde kritik bir role bürünmüştür (Manolio 2009).

Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ile nöroblastomun gelişimini etkileyebilen en az 12 yüksek anlamlı polimorfik alel vardır. Her ilişkinin hastalık başlangıcı konusunda mütevazı bir bireysel olmasına rağmen, nörogelişim sırasında

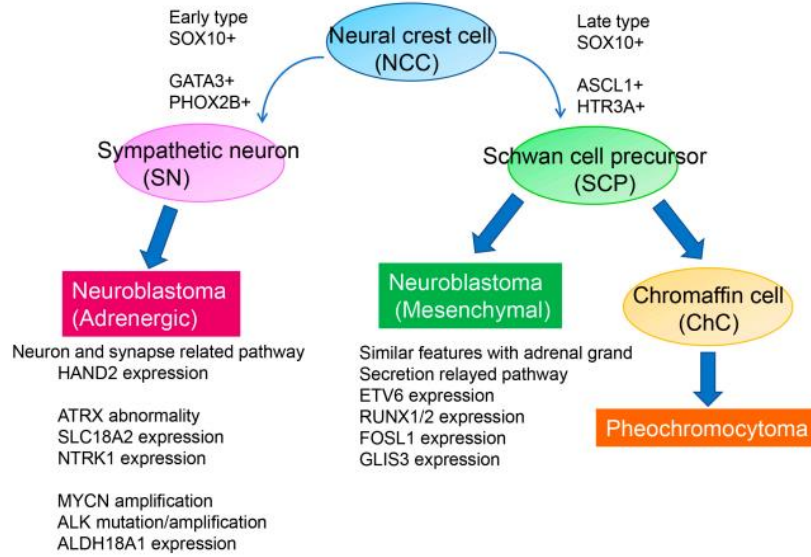
malign dönüşümü teşvik etmek için bireysel bir hastada çoklu pertürbasyonlar iş birliği yapabilir. CASC15, BRCA1 ile ilişkili RING domain protein 1 (BARD1), LMO1, DUSP12, DDX4, IL31RA, HSD17B12, HACE1, LIN28B, LINC00340, LOC729177 (FLJ44180) ve NEFL dahil olmak üzere nöroblastom duyarlılık geni olmuştur. Bu genler hastalığa bağlı onkojenik veya tümör baskılayıcı fonksiyonlar gösterirler. Bu duyarlılık lokuslarının keşfi, nöroblastom oluşumunu yönlendiren altta yatan biyolojiye dair ipuçları için GWAS sinyallerini analiz etmenin faydasını göstermektedir (Decock ve ark., 2011; Fetahu and Taschner-Mandl, 2021).

2.2.4. Biyolojik ve Genetik Özellikler

Uluslararası Nöroblastom Patoloji Sınıflandırma Sistemi, Shimada histopatolojik sınıflandırma sistemine dayanmaktadır. Bu sistem olumlu ve olumsuz özellikleri ayırt etmektedir. Bunlar arasında nöroblastik farklılaşmanın morfolojik özellikleri, Schwannian stromal gelişim ve mitoz-karyorhis indeksi (MKI) yer alır. Histolojiye ek olarak, en güçlü ayırıcı genomik ve biyolojik faktörler DNA ploidi, MYCN amplifikasyonu ve spesifik tekrarlayan segmental kromozomal değişikliklerdir. MYCN ve DNA ploidi en güçlü prognostik etkilere sahiptir. Segmental kromozomal değişikliğin varlığı, nöroblastom tümörlerinde nüks için en güvenilir belirleyicidir. Anaplastik lenfoma kinaz (ALK) geni hem ailesel hem de sporadik nöroblastom tümörlerinde önemli olarak tanımlanmıştır. Aday genlerin dizilimi, ailesel vakaların %50' sinden fazlasında ve sporadik nöroblastom vakalarının %5-15'inde ALK mutasyonlarını tanımlamıştır. ALK, kontrolsüz hücre proliferasyonuna ve sağkalım özelliklerine neden olan nöroblastomun yerleşik bir onkojenik itici gücüdür ve terapötik müdahale için spesifik bir moleküler hedef sağlar (Newman ve ark., 2018).

Ailesel nöroblastom ile ilişkili daha yaygın bir lezyon ALK lokusunda bulunur. Nöroblastomlu ailelerin yaklaşık %80'inde ALK'da mutasyon görülür ve bunlar nadiren sporadik nöroblastomun germ hattı ve tümör hücrelerinde de bulunur. Bu mutasyonların çoğu tirozin kinaz alanında bulunur ve yapısal fosforilasyona yol açar, bu da nöroblastomda bulunan ALK mutasyonlarının onkojenik sürücüler olabileceğini gösterir. Midkin ve pleiotrofin, ALK'nın doğal ligandları olarak bilinir. Nöral krestin gelişmekte olan sempatoadrenal progenitöründe ALK ekspresyonu yüksektir ve MAPK ve RAS ile

ilişkili protein 1 sinyal iletim yolları dahil olmak üzere çoklu önemli yollar yoluyla proliferasyon ve farklılaşma arasındaki dengeyi düzenleyebilir (Stoica ve ark., 2002).



Şekil 2.7. Noradrenergik (ADRN) tipi ve Mezankimal (MES) tipi nöroblastomun özeti. Nöroblastom, nöroblastomun süper artırıcı manzarasına dayanarak Noradrenergik (ADRN) tipi ve Mezankimal (MES) tipi olarak sınıflandırılmıştır. Sinir krest farklılaşması sürecinde yaygın olarak ifade edilen genler ve her tür için genetik anormallikler gösterilmektedir (Takita 202; Van Groningen ve ark., 2017).

2.2.5. Nöroblastomda Tümör Belirteçleri

Nöroblastom oldukça heterojen bir tümördür. Tek bir tümör çok çeşitli karakteristik fenotipler içerebilir. Bunlar nöroblastlar, melanositler ve Schwann, perineurial veya uydu hücreleri gibi nöronal olmayan hücreler olabilir. Nöroblastomun heterojenliğinin ve onu oluşturan hücrelerin olgunluk derecesinin (yüksek riskli ve düşük riskli tümörler) klinik davranış ve prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu özellikler; hem tümör sınıflandırmasında hem de hastalığın prognozu için kullanılır. Yazarlar, çoğu nöroblastomun, farklılaşmamış "mezenkimal hücreler" ve birbirine dönüşebilen ancak bu dönüşümün farklı aşamalarında normal hücrelere benzeyen adrenerjik hücreler vardır. Ayrıca farklı gen ekspresyon profillerine sahip iki ana tip tümör hücresi içerdiğini de bulmuşlardır. "Mezenkimal tipteki hücreler, izogenik adrenerjik hücrelere kıyasla; sisplatin, doksorubisin ve etoposid gibi standart nöroblastom kemoterapi ilaçlarına in vitro olarak daha yüksek direnç etkisi sergilemiştir. Ayrıca, nöroblastomlu hastalardan

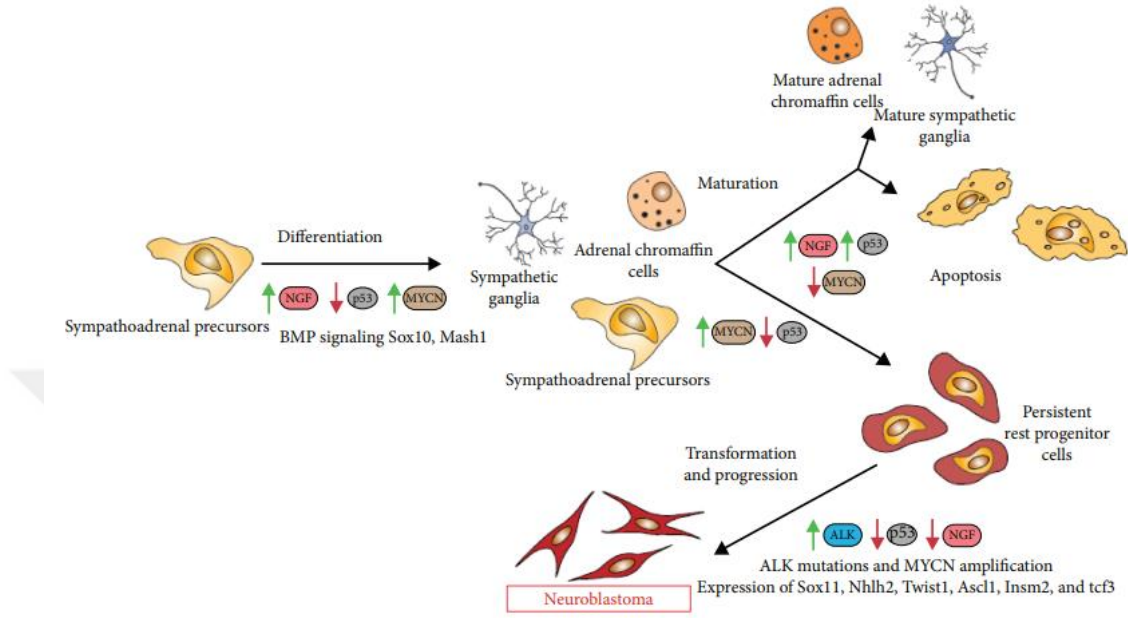
kemoterapi sonrası veya nüks sonrası elde edilen biyopsi materyali "mezenkimal tümör" hücreleri ile önemli ölçüde zenginleştirilmiştir (Shimada 2001).

Nöroblastom tümörlerinden elde edilen hücre hatlarında da belirli heterojenlik gözlenir. İnsan nöroblastom hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalarda üç farklı fenotip tanımlanmıştır. Kısa nöritli küçük yuvarlak hücre gövdelerine sahip sempatoadrenal nöroblastlar, yani N-tipi hücreler, nöronal hücre belirteçlerini eksprese eden en sık görülen çeşittir. Bu hücreler ya substrata küçük bir dereceye kadar bağlanır, ya da kültürde serbest şekilde yüzen veya yapışan kümeler halinde metastaz yaparlar. N tipi hücreler zayıf tümörjeniktir: farelerin %30 ila %100'ünde yavaş büyüyen tümörler oluştururlar. Yumuşak agarda yavaş büyüme yeteneği gösterirler. İkinci tip hücreler, sıkı bir şekilde substrata bağlı, teması inhibe edilmiş bir tek tabaka olarak büyüyen ve yüksek bir sitoplazma / çekirdek oranına sahip nöronal olmayan öncü hücreler tanımlanır. Bu hücrelere S-tipi hücreler (substrat yapışık) denir. Boyutları büyük, düzleştirilmiş bir morfolojiye sahip olarak karşımıza çıkarlar. S tipi hücreler, onları melanositler, glial ve düz kas hücreleri gibi nöral krestten kaynaklanan nöronal olmayan hücreler olarak tanımlayan işaretleyici proteinleri eksprese etme yeteneğine sahiptir. Bu fenotipe sahip hücreler tümörjenik değildir. Çıplak farelerde tümör oluşumu gözlenmez (Kholodenko ve ark., 2018).

N ve S tipi hücreler arasındaki ara morfolojiyle I-tipi hücreler olarak adlandırılan üçüncü bir tip vardır. Aslında kök benzeri hücrelerdir. I-tipi hücreler, kültürde nöritli veya nöritsiz küçük, düzleştirilmiş, orta derecede yapışık halde bulunan hücre grubudur. Kendini yenileme ve çift yönlü farklılaşma yeteneğine sahiptir. Oldukça ilkel olan bu kök hücreler, N veya S tipi hücrelere dönüşebilir. I-tipi hücre hatları, hem N hem de S fenotiplerinin işaretleyici proteinlerini eksprese etme yeteneğine sahiptir (Ross 2015).

Nöroblastomu yönlendiren çekirdek düzenleyici devre, embriyonik gelişim sırasında eksprese edilen ancak doğum sonrası büyük ölçüde kapatılan proteinlerinden oluşur. Adaptif immün sistemin bu sözde onkofetal antijenleri hedefleyemediği düşünülmektedir. Çünkü yüksek afiniteli, kendi kendine reaktif T hücreleri, otoim'i önlemek için silinir. Bu nedenle, çocukluk çağı kanserinin immünojenik olmadığı ve bu nedenle alternatif terapötik stratejilere öncelik verilmelidir. Nöroblastom, pediatrik solid kanserler arasında

immünoterapinin hasta sonuçlarını ve tedavi oranlarını önemli ölçüde iyileştirmek için hem ön hat hem de nüks tedavi protokollerine dahildir (John Anderson ve ark., 2022).



Şekil 2.8. Sinir hücresi kök hücrelerinin nöroblastoma hücrelerine dönüşümü (Kholodenko ve ark., 2018)

2.2.6. Nöroblastom Tümörlerinde Kanser Kök Hücreleri

Kanser kök hücreleri hücrel plastisite sergiler. Tümörojenitelerini arttırmak ve tümör ortamında hayatta kalmalarına ve çoğalmalarına yardımcı olan yeni özellikler kazanmak için moleküler düzeyde tekrardan düzenlenirler. İçsel ve dışsal faktörler, kanser kök hücreleriyle ilişkili hücrel plastisiteyi ve heterojenliği etkileyebilme özelliğine sahiptir. Kanser kök hücre modeline göre; kanser kök hücrelerinden köken alan tümörlerin hiyerarşik bir düzen sergilemesi gerekir. Nöroblastomda böyle bir hiyerarşi söz konusu değildir. Son 10 yılda yapılan çalışmalarda, tümörojenitelerine ve bazı belirteçlerin ekspresyonuna bağlı olarak hem in vivo hem de in vitro koşullar altında nöroblastomda kanser kök hücrelerin bir alt popülasyonu sunulmuştur. Nöroblastomda kök hücre popülasyonlarını tam olarak tanımlayan tutarlı bir belirteç belirlenmemiştir. Spesifik bir kök hücre popülasyonunun tanımlanması; kanser kök hücrelerin oldukça dinamik davranışı, hipoksi ve MYCN amplifikasyonu gibi normal kanser hücrelerinde köklülüğü indükleyebilen faktörler sebebiyle zor ve karmaşık bir süreçtir. Ayrıca, kanser kök hücreleri kendi kendini yenileyebilir ve heterojen soylara farklılaşabildikleri için ayrı bir heterojenlik kaynağı olarak sayılır. Birincil terapötik bir endişedir. Birçok durumda

kanser kök hücreler ilaç tedavisinden sonra oldukça zenginleşir. Olumsuz prognozlu tümörler ayrıca metastatik bölgelerde kanser kök hücrelerin spesifik şekilde zenginleştirir (Jensen ve ark., 2015).

Nöroblastomun kökeninin bir kanser kök hücresinden kaynaklandığını destekleyecek yeterli bulgu yoktur. Buna rağmen dış faktörlerin sebep olduğu farklılaşma olayları ve multipotent hücrelerin dahilinde nöroblastom tümörlerinin saplanma davranışı gösterir. MAPK, Akt/mTOR ve STAT gibi kanser kök hücreleriyle ilgili sinyal yollarının indüklenmesinin, terapötik olarak yararlanılabilen tümör hücrelerinin agresifliği ile ilişkili olduğunu belirtmiştir. Birden fazla kök hücre popülasyonunu hedef alan ilaçlar belirlenmiştir. Böylece terapötiklerde kullanılabilir, bu malignitede kanser kök hücrelerin önemi de dikkat çekmiştir. Nöroblastomun heterojen davranışı muhtemelen hem klonal evrimi hem de kanser kök hücreler tarafından dinamik düzenlemeyi belirlemede rol oynamıştır (Gomez ve ark., 2022).

2.3. L929

L929 fibroblast hücreleri, Mus musculus organizmasından elde edilen subkütan bağ dokusundan alınan Fibroblast hücreleridir. Yapışkan özellik gösterirler. Uygun bir transfeksiyon yuvası olarak bilinir. Temel L tipi, normal subkütanareolar ve 100 günlük erkek C3H/An faresinin yağlı dokusundan üretilmiştir. L tipi klonu Mart 1948’de üretilmiştir. L tipi sürekliliği olan kültürde kurulan ilk hücre tipidir. Aynı zamanda 929 klonlanan ilk tip olarak kaydedilmiştir. (Theerakittayakorn ve Bunprasert 2011).

L929 fare fibroblastları gibi devamlı çoğalan hücre dizileri, tekrarlanabilir büyüme hızları ve biyolojik tepkileri nedeniyle materyallerin sitotoksik özelliklerinin test edilmesi için kullanılan en güzel örneklerin başında gelir. L929 fibroblast hücreleri osteojenik farklılaşmaya ve adipojenik farklılaşmaya maruz kalacak şekilde indüklenebilir olmaları en önemli özellikleridir. L929 fare fibroblast hücrelerinin özellikle; hücre vitabilitesi analizleri, toksisite testleri, antikanser ajanların etkinliğinin değerlendirilmesi gibi alanlarda çok sık tercih edilen bir hücre grubudur. Ayrıca, şimdiye kadar yayınlanan araştırmaların çoğunda devamlı hücre dizilerinin birincil hücrelerden diğerlerine kıyasla daha hassas yanıt verdiği gözlemlenmiştir (Thonemann ve ark., 2002).

2.4. Entegre Stres Yanıtı

Çeşitli hücrel streslere yanıt olarak Entegre Stres Yanıtı (ISR) adı verilen yüksek oranda korunmuş bir hücre içi sinyal yoludur. ISR, gen ekspresyonunu ve protein sentezini düzenler. Protein kaçışında, kalite kontrolünde ve çekirdek ile sitoplazma arasındaki alt organel iletişimde önemli bir rol oynar. Yani ISR, hücrelerin normal işlevlerini korurken çeşitli stresli koşullarla etkili bir şekilde başa çıkmalarına olanak sağlar. Çeşitli uyaranlar (örneğin, ultraviyole ışık, besin yoksunluğu, viral enfeksiyon, hipoksi , vb.) ökaryotik hücrelerde proteostazı bozar ve bu aşamada ISR ortaya çıkar. Katlanmamış protein yanıtı (UPR) ve ISR gibi protein homeostazının korunmasına veya eski haline getirilmesine yardımcı olan hücre içi yanıtlar da vardır. ISR, transkripsiyon ve translasyonu düzenleme yeteneği ile diğerlerinden ayrılır. Bu benzersiz özelliğiyle, protein taşınması ve kalite kontrolünde yer alan bu çok organel tepkiler bağımsız değil, oldukça sıkı bir şekilde birbirine bağlıdır (Lu ve ark., 2024).

ISR'nin temel bileşeni EIF2 α , ISR'nin temel bileşenidir ve aynı zamanda ISR'deki dört kinazın hedefidir. EIF2, α , β ve γ olmak üzere üç alt birimden oluşur ve bunların arasında α -alt biriminin Ser51 sit'i yukarıda belirtilen dört kinaz tarafından fosforile edilebilir. P-eIF2 α , eIF2 α ve eIF2B'nin uygun lokalizasyonuna müdahale ederek eIF2B'nin rekabetçi olmayan bir inhibitörü olarak işlev görür. Ek olarak, P-eIF2 α , stresin başlangıcında eIF2-GTP-Met-tRNAi üçlü kompleksinin (TC) sentezini inhibe eder ve sonunda protein sentezini baskılar. Akut fazda ISR, hücrel homeostazı ve sağkalımı sürdürmek için hücrel protein sentezini azaltır ve hücre içi protein yanlış katlanması ve stres altında bozulmuş protein taşınmasının neden olduğu hasarı hafifletir. Bununla birlikte, kronik ISR'de bu etki tersine çevrilir, burada ATF4, C/EBP homolog proteini (CHOP) ile ilişkili apoptotik sinyal yolunu aktive ederek hücre ölümüne yol açar (Lu ve ark., 2024).

Hücre strese girdiğinde, dört serin / treonin kinaz hem tarafından düzenlenen inhibitör (HRI), genel kontrol baskılanamayan 2 (GCN2), protein kinaz R (PKR) veya PKR benzeri endoplazmik retikulum kinaz (PERK) dimerizasyon ve otofosforilasyon yoluyla aktive olur. Aktive edilmiş kinazlar, ökaryotik başlatma faktörü-2'nin (eIF2 α) alfa alt birimini fosforile eder, bu da hücrenin enerjiyi korumanın ve stresin azaltılmasına yardımcı olan seçilmiş genlerin translasyonunu yönlendirmede küresel translasyonel inhibisyona sebep olur (Bussiere ve Miller, 2021).

PKR, viral çift sarmallı RNA'yı (dsRNA) tanır; GCN2, serbest aminoasitleri (AA) içermeyen hücrelerde biriken, yüklenmemiş tRNA'ları algılayarak; PERK, ER stresi olarak bilinen ER'de yanlış katlanmış protein birikimini tespit eder; HRI için sitozolik proteotoksinite genel bir tetikleyici olmasına rağmen demir eksikliği, oksidatif stres ve ısı şoku gibi çeşitli streslere cevap verir (Coşkuntan 2021).

ISR, kanser hücrelerinin, ister hücre intrinsik ister daha geniş TME düzeyinde olsun, belirli ipuçlarının tanınmasına bağlı olarak hücresel durumlarını dinamik olarak değiştirebilir. Öncesinde, eIF2a'nın PERK fosforilasyonu yoluyla ISR ile örtüşen bir başka önemli hücresel stres yanıtı olan UPR'nin, katlanmamış proteinlerin aşırı yüklenmesinin neden olduğu ER stresinin yoğunluğunu ve süresini tanımlamada önemli bir rolü görülmüştür. Bu yolun stres uyaranlarını tanımlama yeteneği, hücre kaderini belirlemede kritik bir yere sahiptir. Hücreleri ya hayatta kalma yollarının homeostatik aktivasyonuna ya da apoptozun uyumsuz aktivasyonuna doğru yönelmesini sağlar. UPR'ye benzer şekilde, ISR de hücre kaderini ve hücre durumunu modüle etmekte daha etkili rol oynar. Bu da hastalık bağlamında sağkalımın artmasına yol açar ve kanser tedavisine direnç için mekanizmalar ortaya koyar (Tian ve ark., 2021).

ISR aktivasyonu sadece tümörlerin mezenkimal duruma çok başarılı bir şekilde girme yeteneğini arttırmakla kalmaz. Aynı anda terapötik müdahalelere de direnç kazandırır. Kötü diferansiye tümörler kemoterapiyi tolere edebilirken, iyi diferansiye tümörler tedaviye daha duyarlıdır. Ayrıca, ISR, kemoterapötiklerin kanser tedavisi sırasında amaçlanan etkilere sahip olmalarını engellemekle doğrudan doğruya doğruya etkilidir. Pankreas kanserinde ISR, pankreas kanseri için yaygın bir kemoterapi olan gemsitabine direnç sağlamada önemlidir (Palam ve ark., 2015).

ISR genellikle hayatta kalmak için kanserin ilerlemesinde adaptasyonları teşvik ederek homeostazi eski haline getirmede işlevi görür. ISR'nin sağlam ve uzun süreli aktivasyonu hücre ölümüne sebep olabilir. ISR'yi başlatan eIF2a kinazların, yanıtın adaptif sağkalımı mı yoksa hücre ölümünü mü teşvik ettiğini belirlemede de rol oynayabileceği öne sürülmüştür. PKR esas olarak pro-apoptotik olarak belirlenmiştir. Hücre sağkalımı ve hücre ölümü mekanizmaları arasındaki dengeyi hem koruma hem de değiştirme kapasitesi nedeniyle, ISR, hücresel adaptasyonun modülasyonu ve sömürülmesi için potansiyel bir hedef olarak önemli odak noktası olmuştur. ISR aktivitesinin diğer

terapötiklerle kombinasyon halinde manipüle edilmesi, kanser tedavisinde yararlı olabilir. Ayrıca farmakolojik müdahale için çekici bir hedef haline gelmektedir (Derisbourg ve ark., 2021).

ISR, hücrelerin dışsal ve içsel stres faktörleriyle karşı karşıya kaldıklarında dinamik karşı önlem alır. Bu plastisite, genomik instabilite altında kanser hücresi sağkalımı, antikanser tedavisi ve TME'nin stresleri de dahil olumsuz koşullar altında hücre sağkalımında önemlidir. Homeostazın sürdürülmesinde ve hücre sağkalımının desteklenmesindeki bu rol nedeniyle, ISR ayrıca kanser bağlamında inhibisyon için bir hedef olarak kritik bir potansiyele sahip olabilir. Spesifik olarak ISR'nin inhibe edilmesi, onkojenik hücresel adaptasyonu bloke edebilir. Bu da tümör büyümesi bağlamında ISR aktivasyonunu iterken görülenle aynı hücre ölümüne yol açabilir. ISR'yi durdurmanın yaygın bir yöntemi olarak, genellikle bir ATP rakibi aracılığıyla eIF2a kinazlarını inhibe etmektir. Örneğin, İndirubin-3'- monoksim, SP600125 ve bir SyK (dalak tirozin kinaz) inhibitörünün tümü, UV ile tedavi edilen fare embriyonik fibroblastlarında GCN-2 kinaz aktivitesinin inhibitörleri olarak bilinmektedir (Lines ve ark., 2023).

2.4.1. Entegre Stres Tepkisi ve Hücre Sağkalımı

Kanser hücreleri, apoptozdan kaçmak, hayatta kalmayı, proliferasyonu, metastatik potansiyeli sağlamak ve hücresel homeostazı sürdürmek için dışsal ve endojen veya çevresel streslere yanıt vermek için Endoplazmik Retikulum (ER) ve mitokondri gibi organellerin aracılık ettiği Entegre Stres Yanıtı (ISR), sitozolik Isı Şoku Yanıtı (HSR) ve Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR) gibi çoklu stres yanıt yolları kullanır (O'Malley ve ark.,2020).

ISR, apoptoz gibi hücre ölüm yollarının negatif regülasyonu ile hücresel sağkalım sinyalini desteklemede yardımcıdır. Örneğin, ER stresinin bir sonucu olarak, ISR'nin PERK kaynaklı aktivasyonu, tümör ve tümör olmayan hücrelerde cIAP1 ve cIAP2'nin (apoptoz proteinlerinin hücresel inhibitörü) ekspresyonu ile sonuçlanır. Daha önce, ER stresi sırasında embriyonik fibroblastlarında cIAP1 veya cIAP2 fonksiyonunun yenilenmesinin, bu hücrelerde görülen ER stresine bağlı kaspaz aktivasyonunun ve apoptozun erken başlangıcını geciktirdiği gösterilmiştir (Hamanaka ve ark., 2009).

Mitokondriyal Sitokrom C, hem hücrel enerji metabolizmayı hem de apoptozu kontrol etmede ikili bir işlev oynar. Apoptotik proteaz aktive edici faktörler (APAF) ile etkileşime girdikten sonra, sitokrom c'nin mitokondriden sitozole Ayrıca, miR-211'in, CHOP ekspresyonunu PERK'e bağımlı bir şekilde düzenleyen bir sağıkalım yanlısı mikroRNA olduğı ve bu nedenle PERK'in, CHOP'un strese bağılı bir ekspresyonunu baskılayarak hayatta kalma yanlısı bir işleve aracılık edebileceğı ve sonuç olarak apoptozun başlamasından önce hücrel homeostazın yeniden kurulmasını sağlayabileceğı bildirilmiştir. Homeostazı yenileme rollerine ek olarak, bu ISR mekanizmaları da tümör gelişimine katkıda bulunabilir. Örneğin, PERK'e bağımlı olduğı bulunan ve insan B hücreli lenfomanın meme karsinomu ve fare modellerinde bildirilen artmış bir miR-211 ekspresyonu bildirilmiştir (Chitnis ve ark., 2012).

ISR sırasında aktive olan bir başka gen olan, ER stresi sırasında aktive olan IBTKa'dır. IBTKa, protein ubiquitinasyonu için önemli bir substrat adaptörüdür (Baird ve ark., 2014). Benzer şekilde, eIF2a aracılı translasyonel baskılama, hücreleri ER stresine karşı korumak için bir mekanizma olarak aktive edilmiş B hücresi NF-κB yolu indüksiyonunda önemlidir. Bir çalışmada, eIF2a fosforilasyonunu stresten ayırmak için PERK'in farmakolojik olarak aktive edilebilir bir versiyonu kullanılmıştır. Böylece eIF2a fosforilasyonunun hem NF-κB DNA bağlanmasını hem de bir NF-κB raportör genini aktive etmek için gerekli ve yeterli olduğı belirlenmiştir (Deng ve ark., 2004).

2.4.2. Entegre Stres Tepkisi ve Otofajinin Aktivasyonu

Otofaji; sitoplazmik katlanmamış proteinlerin, peptitlerin veya sitozolik bileşenlerin lizozomal bozunmasında ve aynı zamanda proteinler oluşturmak için tükenmiş amino asitleri yenilemek, yüksek düzeyde düzenlenmiş bir ökaryotik hücrel yoldur. Otofaji, besin veya büyüme faktörü yoksunluğu, hipoksi, reaktif oksijen türleri, DNA hasarı gibi çeşitli hücrel streslerle aktive edilebilir. Otofaji, otofajinin farklı aşamalarını koordine etmek için hem spesifik uyarana bağılı bir şekilde hem de genel olarak uyarandan bağımsız sinyal yoluyla aktive olabilir. ISR, otofajinin aktivasyonu yoluyla hücre sağıkalımını ve hücre ölüm yollarını modüle edebilir. eIF2a'nın S51'de fosforilasyonu, strese bağılı otofaji için gerekli görünmektedir. Otofajinin ve diğere stres tepkilerinin uyaralar tarafından paralel olarak uyarılması, otofajinin ve diğere stres tepkilerinin ikili olarak düzenlenmesi veya otofaji ve diğere stres tepkilerinin karşılıklı kontrolü yoluyla diğere hücrel stres

tepkileriylde ilişkilendirilebilir (Pakos-Zebrucka ve ark., 2016; Clementi ve ark., 2020; Akman ve ark., 2021).

PERK in otofajiyi düzenlemesinde, ER stresi, eIF2 α 'nın fosforilasyonunu arttırır ve bunu PERK yoluyla SQSTM1, NBR1 ve BNIP3L dahil olmak üzere belirli otofaji reseptörlerinin yukarı regülasyonunu izler. Benzer şekilde, PERK'in inhibisyonu, memeli hücrelerinde bu otofaji reseptörlerinin transkripsiyonel yukarı regülasyonunu farmakolojik olarak baskılar (Deegan ve ark., 2015). Ayrıca, PERK'in aracılık ettiği eIF2 α 'nın fosforilasyonu, otofaji oluşumu için önemli bir adım olan C2C5 hücrelerinde poliQ72 agregatlarının ekspresyonu nedeniyle ATG12 ve LC3'ün dönüşümünü arttırır (Kouroku ve ark., 2007).

GCN-2' nin otofajiyi düzenlemesinde; Benzer şekilde, kanser hücrelerindeki amino asit yoksunluğu, otofajinin aktivasyonu için gerekli olan GCN2'nin aracılık ettiği eIF2 α 'nın fosforilasyonuna yol açar. Özellikle, GCN-2 nakavt hücreleri azalmış LC3 ekspresyonu sergilerken, eIF2 α S51A mutantına sahip hücreler LC3'ün işlenmesini aktive edemedi (Ye ve ark., 2010). Benzer şekilde, amino asit açlığının neden olduğu otofajinin düzenlenmesinde, maya ve fare embriyonik fibroblastlarında (MEF'ler) S51'de eIF2 α 'nın fosforilasyonunun gerekli olduğu bulunmuştur. Bu bulgular, S51'deki eIF2 α fosforilasyonunun, farklı stresler ve otofajinin aktivasyonu arasındaki merkezi oluşturduğunu belirtmektedir.

Otofajide yer alan genlerin uyarılması yoluyla ISR, amino asit yoksunluğunun neden olduğu stresi çözmek amacıyla otofajik sürecin yukarı regülasyonuna aracılık etmektedir. Bu, sitoplazmik bileşenlerin artan geri dönüşümü ve hücrenin biyosentetik kapasitesinin ve hücresel ATP konsantrasyonlarının sürdürülmesiyle gerçekleşir. Artan otofajik fonksiyon, protein biyosentezi için gerekli olan ER'de amino asit seviyelerinin artmasına yol açmaktadır. Bununla birlikte, çeşitli otofaji genlerinin ATF4 ve CHOP sinyalizasyonuna değişen derecelerde bağımlı olabileceği düşünülmektedir (Rzymiski ve ark., 2009; Ye ve ark., 2010).

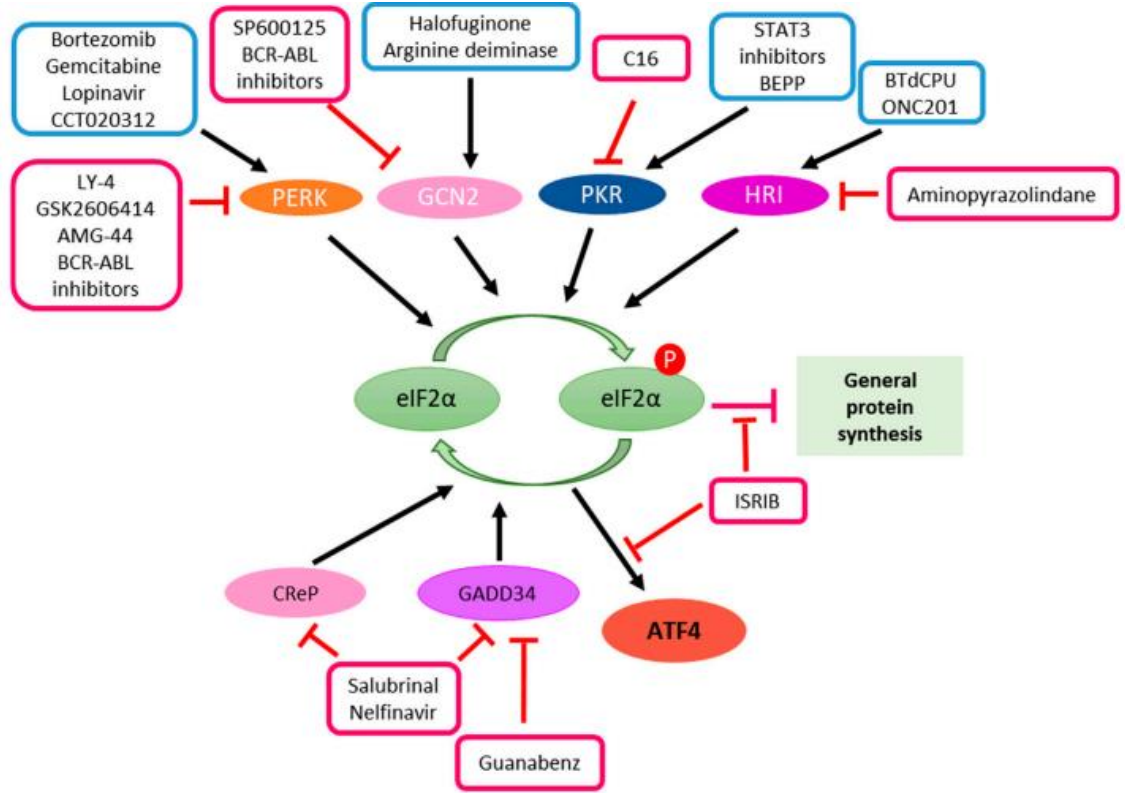
Proteazom inhibisyonunun ISR tarafından sağkalım sinyali üzerindeki etkisi incelenen çalışmalarda, proteazom fonksiyonunun farmakolojik olarak antineoplastik ajan kullanılarak baskılanmasının, protein sentezi için gerekli olan ER'deki amino asitlerin tükenmesine neden olduğunu belirlenmiştir. Böylece ISR'nin GCN2 stres sensörü

aracılığıyla aktivasyonuna yol açtığı belirlenmiştir. Proteazom inhibisyonunun bir sonucu olarak amino asit tükenmesi, amino asit homeostazını eski haline döndürmek amacıyla otofajiyi aktive eder. Tersine, proteazom fonksiyon inhibisyonu ile tükenen esansiyel amino asitlerin eksojen takviyesi, eIF2 α 'nın fosforilasyonunu zayıflatır. Böylece otofajiyi aşağı şekilde regüle eder. Proteazom inhibisyonu ile amino asitlerin tükenmesi; hücrenin hayatta kalmasını sürdürmek amacıyla ISR aktivasyonu ile otofajinin indüksiyonu arasında bir bağlantı kurar (Suraweera ve ark., 2012).

PKR’NİN otofajiyi düzenlemesinde; PKR için yaygın olarak kullanılan bir inhibitör, tipik olarak kullanılan bir guanozin ve adenosin analogu olan 2-aminopurindir (2-AP). Bunun, TGF- β sinyalini baskılayarak akciğer kanseri hücrelerinde metastazı etkilediği gözlemlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda kullanılması, diğer birkaç kinazın hedeflenme olasılığını artırmaktadır. Alternatif bir PKR inhibitörü, küçük molekül C16'dır. Öncelikle nörolojik bağlamlarda çalışılmış olmasına rağmen, C16'nın anjiyogenezi azaltarak hepatoselüler karsinom hücre hatlarında ve ksenograft fare modellerinde proliferasyonu kısmen baskıladığı gözlemlenmiştir. Bu, PKR yoluyla anjiyogenezi hedeflemenin diğer kanser alt tiplerinde de incelenebileceği fikri oluşmuştur (Weng ve ark., 2018).

2.4.3. Entegre Stres Tepkisi ve Hücre Ölümü

ISR, farklı tümör tiplerinde oluşum ve ilerleme noktasında farklı roller oynar. Hipoksi, katı tümörlerde sık görülür. Tümör hücrelerinin apoptozunu indükleyebilir veya tümör hücreleri hipoksi veya anoksik ortama uyum sağlama yeteneğini geliştirebilir. Hipoksi, transforme fare embriyonik fibroblastlarında ISR gen ekspresyonunu indükleyebilir. Böylece aktive edilmiş ER stres tepkisine direnç sağlar. Hipoksi ile indüklenen apoptoza ve böylece tümör büyümesini kolaylaştırır. Aktive edilmiş ISR, hipoksik strese adaptasyonda önemli bir rol oynar. Daha sonra stres altında tümör hücresinin hayatta kalmasına izin verir. Böylece tedaviye direnç ile ilişkilidir. Hücre dışı matriks bağlanma kaybının in vitro ISR sinyalini uyardığı belirlenmiştir. Ve ISR'nin aktivasyonu ayrıca anoikise dirençte kritik bir rol oynar ve metastaz için gereklidir (Dey ve ark., 2015; Ameri ve ark., 2004).



Şekil 2.9. Entegre stres yanıtları sinyalizasyon yolları. ER stresi, mitokondri stresi veya heme tükenmesi, amino asit eksikliği ve ds-RNA virüs enfeksiyonu PERK, HRI, GCN2 ve PKR sensör kinazlarını aktive ederek, eIF2α'nın fosforilasyonuna yol açar. eIF2α fosforilasyonu, protein sentezinin genel olarak inhibisyonuna ancak ATF4 mRNA'sının seçici olarak çevrilmesine neden olur. ATF4, hücre adaptasyonu, sağkalımı ve apoptozu teşvik eden genlerin ifadesini düzenlemek için DNA hedeflerine bağlanır. ISR'nin geri besleme düzenlemesi, eIF2α'yı defosforile eden ve ISR'yi azaltan veya sonlandıran sürekli ifraz edilen fosfatase kompleksi CReP-PP1 ve indüklenebilir fosfatase GADD34-PP1 tarafından düzenlenir (Tian ve ark.,2021).

ISR'nin tümör mikroçevresi üzerinde de etkisi vardır. ER stresine maruz kalan tümör hücreleri, ER stresini miyeloid hücrelere ileterek proinflamatuvar bir tümör mikro çevresine katkıda bulunabilir. Böylece tümör ilerlemesine katkı sağlar. ISR'nin rolü tümörlerde karmaşık olabilir. Medulloblastomda, ISR aktive edilir ve gen manipülasyonu yoluyla azalan ISR, medulloblastom oluşumunda azalttığı gözlemlenmiştir. Gen manipülasyonu ile orta derecede artmış ISR, medulloblastom insidansını artırırken, güçlü bir şekilde artmış bir ISR, in vivo medulloblastom insidansını önemli ölçüde azaltmıştır. Bu nedenle, ISR medulloblastom oluşumunda ikili rol oynar (Stone ve ark., 2016).

ISR'nin aktivasyonu, pankreas kanseri ve BRAF mutasyona uğramış melanomda kemoterapiye direnç ile ilişkilidir. Gempitabin, pankreas kanseri hücre hattındaki ISR yoluyla ve antiapoptotik pro-sağkalım faktörlerini indükleyebilir. Böylece ISR'yi inhibe eden gempitabin + ISRIB kombinasyonu in vivo olarak apoptozu ciddi şekilde

indükleyebilir. BRAF mutasyona uğramış melanomda, ISR sinyal yolunun indüksiyonuyla birlikte ER stresi, kemorezistansa katkıda bulunan otofajiyi de aktive eder. ISR'yi tetiklemek, kansere karşı terapötik bir strateji olabilir, çünkü ISR apoptozu indükleyebilir (Corazzari ve ark., 2015).

Proteazom inhibitörlerinin ISR'yi ve ISR belirteçlerinin daha düşük ekspresyonunu aktive ettiği bilinir. Böylece multipl miyelomda daha kısa progresyonsuz sağkalımı ima eder. ISR'nin immünoterapi için potansiyel hedef ifadesini teşvik ettiği belirlenmiştir. Bu nedenle, ISR kanser immünoterapisinde rol oynayabilir. Öte yandan, ISR aktivasyonunun inhibisyonu kanser hücrelerinin savunmasızlığını artırabilir. BCR-ABL inhibisyonu, kronik Miyeloid Lösemi (KML) hastasından türetilen K562 hücre hücrelerinde ISR'nin aktivasyonunu önler. Böylece tümör hücrelerini metabolik strese karşı savunmasız hale getirir (Kato ve ark., 2018; Obiedat ve ark., 2020).

eIF2 α , ISR'nin temel bir bileşenidir. eIF2 α aktivatörlerinin çoğu küçük moleküllerdir. Halofuginon, arginin ve deiminaz GCN-2 aktivatörleridir. BTdCPU ve ONC201, HRI'yi aktive eder. Bortezomib, gempitabin, lopinavir ve CCT020312 seçici olarak PERK'yi aktive ederken BEPP, PKR aktivasyonu üzerinde çalışır. Bu eIF2 α kinaz aktivatörleri kanser tedavileri sonuçlarında belirlenmiştir. Örneğin, Halofuginon, arginin ve deiminazın tek ajanlar olarak radyasyon ile kombinasyon halinde tümör büyümesini, gelişmesini ve metastazı inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Abramovitch ve ark., 2004).

ISR sinyali yoluyla tümör büyümesini baskılayan iki küçük molekül olan PG3-Oc ve ONC201 molekülleridir. Bu ilaçlar, eIF2 α kinazların aktivasyonu yoluyla ISR sinyalini arttırmakta görevlidir. Sırayla eIF2 α fosforilasyonunu artırır. eIF2 α fosforilasyonu için başka bir yol ise, eIF2 α fosfatazdan eIF2 α fosforilasyonunu önlemektir.

Salubrinal, hem GADD34 hem de CREP yoluyla eIF2 α defosforilasyonunu inhibe ettiği keşfedilen ilk küçük moleküldür. GADD34 aktivitesinin Guanabenz veya türevleri tarafından inhibisyonu, yüksek seviyelerde eIF2 α fosforilasyonu ile sonuçlanır. Guanabenz'in kombinatoryal tedavide glioblastoma kanser hücrelerini sunitinib ilacına karşı duyarlı hale getirdiği belirlenmiştir (De Gassart ve ark., 2016).

ISR sinyalinin inhibisyonu kanserde ilaç direncinin üstesinden gelebilir. Bu yollardan birisi, eIF2 α 'nın yukarı akışında eIF2 α kinazını inhibe etmektir. Bu kinaz inhibitörlerinin

çoğu, kinaz alanlarını bloke etmek için ATP ile rekabet halindedir. SP600125 ve BCRABL inhibitörleri GCN-2'yi inaktive ederken, PKR inhibitörü C16 spesifik olarak inhibe eder. LY-4, AMG-44, BCR-ABL inhibitörleri ve GSK2606414 PERK'yi inaktive eder. eIF2 α kinazına ATP rekabetçi bir şekilde bağlanırlar, kinaz aktivitesinin inhibe ederler. eIF2 α 'nın fosforilasyonunu azaltırlar. Başka bir yol ise, eIF2 α 'nın aşağı akışında eIF2 α sinyali son vermektir. Küçük moleküllu ISRIB, eIF2 α fosforilasyonunun neden olduğu stres granüllerinin oluşumunu önleyerek Transkripsiyon Faktörü 4'ün (ATF4) sentezini bozar (Tian ve ark., 2021).

2.4.4. PERK

PERK, endoplazmik retikulum stres koşulları altında aktive olan ve ER içinde yanlış katlanmış proteinlerin birikimini azaltma işlevi gören üç katlanmamış protein tepkisi (UPR) sensöründen biridir. Yanlış katlanmış proteinlerin tespiti üzerine oligomerleşir ve sitozolik alanda aktive edilir. Bu tip-I membran protein kinaz, bilinen diğer hedeflerin yanı sıra serin 51'de eIF2 α 'yı fosforilleyerek bir hücrenin translasyon mekanizmasını inhibe eder. PERK'in ayrıca kollajen, insülin salgılanmasında ve hasarla ilişkili moleküler modellerin (DAMP'ler) oluşturulmasında rol oynadığı bulunmuştur (Mandula ve ark., 2022).

Besine bağımlı ER stresi, kendi kendini fosforilasyonunu ve oligomerizasyonunu teşvik ederek PERK'yi aktive eder. Aktif PERK, sitozolik translasyonu zayıflatmak için kanonik substratı eIF2 α 'yı fosforile eder. Hücrel homeostazı sürdürmek için aktive edici transkripsiyon faktörü 4'ün (ATF4) ekspresyonunu indüklemeye de görevlidir. Bu koşullar altında, PERK-eIF2 α -ATF4 yolu, mitokondriyal solunum süper kompleksi oluşumuna neden olan ve hücre solunumunu artıran Süper Kompleks Montaj Faktörü 1 (SCAF1) ekspresyonunu indüklemektedir. Besin stresi sırasında PERK, ATF4'ten bağımsız olarak bilinmeyen mekanizmalar yoluyla cristae bolluğunu da artırır (Walter ve Ron, 2011).

PERK, ER'de yanlış katlanmış ya da katlanmamış protein yanıtı sinyal yolağını, inositol gerektiren enzim 1 (IRE1) ve ATF6 ile birlikte başlatan kinazdır. UPR, proteinlere zarar veren, protein katlanmasını ve ER işlevini bozan uyaranlara yanıt verir. EIF2AK3 ismiyle de bilinen PERK'in N-terminal alanı ER 30 lümeninde Hsp70 ailesine ait bir Şaperon olan bağlanma immünoglobulin proteini ile kompleks halinde bulunmaktadır. PERK

aktivasyonu, uyarın varlığında BiP'in kompleksten ayrılmasıyla ortaya çıkar. PERK'in sitozolde bulunan C-terminal bölgesi, kinaz alanını ve otofosforilasyon bölgeleridir. Hem eIF2 α kinazlarına hem de ER stres sensörü IRE1'e homoloji belirlenir. PERK'in bu olağan dışı işlevi aracılığıyla, ISR'nin PERK/eIF2 α sinyal ekseninin UPR ile çalıştığı belirtilmiştir. PERK'in önemi ilk olarak, resesif mutasyonlarının erken başlangıçlı diyabet ile karakterize edildiği Wolcott-Rallison Sendromu'na neden olmasıyla görülmüştür. Kanserli bireylerde, tümör ilerlemesi sırasında PERK kinaz aktivasyonunu gösteren, fosforile edilmiş eIF2 α 'nın artmış bir seviyesi belirlenmiştir.

Yakın zamanlı bir çalışmada, PERK aracılı ISR ve ateroskleroz gelişimi arasındaki ilişki bir fare modellemesinde tanımlanmıştır. ISR sinyal yolağının uzaysal aktivitesinin incelendiği fare modellemesinde, kimyasallarla indüklenmiş hepatik fibrozun PERK aktivasyonu ile ilişkisi belirtilmiştir. Bazı virüsler için PERK kaynaklı otofajinin viral replikasyonda gerekli olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte birçok durumda PERK, viral replikasyonu inhibe eden etkilere sahiptir. PERK'in bu patojenlere karşı aktivasyonunun, virüs tipine veya enfeksiyon aşamasına bağlı olarak farklılık gösterebileceği gözlemlenmiştir (Aldağ 2023).

Moleküler düzeyde, anormal proteinlerin birikmesinden dolayı ER şaperon Grp78'in salınımı UPR'yi aktive eder. PERK proteini, düzenleyici bir luminal alan, bir sitosolik kinaz alanı ve bir ER transmembran alanından oluşur. PERK, düzenleyici luminal alan ER stresini algıladığında ve oligomerizasyon ve otofosforilasyon yoluyla takip ettiğinde aktive edilir. eIF2 α 'yı fosforile ederek PERK, mRNA'nın translasyonunu 6 durdurmakta ve ATF4'ün translasyonunu sağlayarak sırasıyla apoptotik gen CHOP'yi aktive etmektedir. CHOP, şiddetli stres koşullarında zarar verirken, daha az stresli koşullar sırasında faydalı olarak kabul görülür. CHOP, fosfataz kompleksi büyümeyi durduran ve DNA hasarına neden olan protein 34'ün (GADD34) düzenleyici bir alt birimini belirlemektedir. GADD34 ayrıca p eIF2'nin protein fosfataz 1 (PP1) aracılığıyla fosforlaşmasını hedefler. Sonuç olarak protein sentezine katkıda bulunan negatif bir geri besleme döngüsüyle sonuçlanmaktadır (Harding ve ark., 2002; Li ve ark., 2014).

2.4.5. PKR

Protein kinaz R/protein kinaz dsRNA'ya bağımlı (PKR), dsRNA tarafından aktive edilir ve interferonlar tarafından antiviral yolda yer alır. PKR, hücre proliferasyonu ve stres

tepkileri gibi çeşitli hücrel süreçlerde çok önemlidir. Nörodejeneratif hastalık, kanser ve lösemi modelleri gibi çeşitli hastalık modellerinde incelendi. Viral enfeksiyona ek olarak, DNA'ya zarar veren ajanlar, sitotoksik sitokinler, endoplazmik retikulum (ER) stresi ve büyüme faktörleri PKR aktivasyonunu artırmaktadır. Ayrıca, PKR aktivasyonu, apoptoz sırasında kaspaz aktivasyonuna da bağlıdır.

Çeşitli streslere yanıt olarak, ökaryotik başlatma faktörü 2 alfa ($eIF2\alpha$) serin 51'de dört kinazdan biri tarafından fosile edilir: PKR, PKR benzeri ER kinaz (PERK), genel kontrol bastırılmaz-2 ve hem tarafından düzenlenen inhibitör $eIF2$ 'nin fosforilasyonu, küresel proteinlerin translasyonunu daha da inhibe eder, ancak transkripsiyon faktörü 4'ü (ATF4) aktive etmek gibi spesifik mRNA'lar çevrilir. Artan ATF4 ekspresyonu, stresi hafifletmek için C/EBP homolog proteini (CHOP) gibi hücrel homeostaz düzenleyici genlerin ekspresyonunu indüklemektedir. ER stresi, CHOP ekspresyonunun en iyi bilinen sebebidir. CHOP apoptoz ile ilişkilidir. Pro-apoptotik genlerin ekspresyonunu indüklemeye görevlidir (Yalçın ve ark., 2020).

Genotoksik stres sırasında PKR, p53 ve nükleer faktör-B gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri ile ilişkilidir. Birkaç çalışma, hücre büyümesi sırasında PKR ve p53 arasındaki ilişkiyi bildirmiştir. PKR, belirli DNA hasarı tiplerine yanıt olarak meydana gelen ve muhtemelen fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) yolu yoluyla p53 fosforilasyonuna yol açan hücrel sinyal iletimi ile ilişkilidir. Çekirdekteki PKR aktivitesi de incelenmiştir. Nükleer PKR, DNA hasar yanıtını ve onarımını inhibe eder ve akut miyeloid lösemide (AML) yüksek PKR ekspresyonu bildirilmiştir. Önceki çalışmalar, PKR'nin çeşitli hücrel süreçlerde önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Sol Lee ve ark., 2022).

Sitoplazmaya lokalize PKR, protein sentezinin araçlarından biri ve aynı zamanda bir ER stres sensörüdür. Şu anda, PKR inhibitörleri, pankreas beta hücreli insülin üretimini azaltmak için ER stresini baskılayabilir. PKR inhibitörlerinin SCI gibi ER stresıyla ilişkili hastalıklara katılabileceğini ve etkileyebileceğini ortaya çıkarır. Mevcut kanıtlar PKR'nin genellikle omurilik beyaz ve gri cevherinde sunulduğunu ve ağırlıklı olarak mikrogliya/makrofajlar tarafından eksprese edildiğini göstermiştir. Bu arada, PKR'nin SCI'den sonra iyi bir şekilde aktive olduğu bulunmuştur. Bu da PKR'nin SCI'ye katılımını göstermektedir (Chang ve ark., 2022).

2.4.6. GCN2

Kanserde GCN2 aktivasyonu GCN2, daha geniş bir stres faktörü yelpazesi tarafından aktive edildiği maya (Gcn2) dahil olmak üzere tüm ökaryotlarda korunan tek kinazdır. Hem GCN2 (hem de maya homologu Gcn2), amino asit kıtlığı nedeniyle hücre içi biriken deasillenmiş tRNA tarafından aktive eder. Deasillenmiş tRNA, amino asit eksikliğinin dahili bir göstergesi olarak hareket edebilir. GCN2'nin C-terminali, özellikle kinaz alanının otoinhibisyonunda da yer alan HisRS benzeri alan ile etkileşimdedir. GCN2 ayrıca ribozomal translasyonel durma ve ribozomal P-sapı ile aktive edilebilir, ancak bu mekanik izmlerin deasillenmiş tRNA ile uyum içinde çalışıp çalışmadığı veya maya ile daha yüksek ökaryotik organizmalar arasında aktivasyon mekanizmalarında bir farklılık olup olmadığı net değildir (Gold ve Masson, 2022).

GCN2 otofosforile edildiğinde en az iki kalıntı (T899 ve T904) ve bu, eIF2 α fosforilasyonunun yanı sıra GCN2 aktivasyon durumunu belirlemek için kanser örneklerinde yararlı bir biyobelirteç görevi özelliğindedir. Ye ve ark. (2010), kolon, akciğer, meme ve karaciğer kanseri doku örneklerinde sağlıklı doku ile karşılaştırıldığında hem toplam GCN2 hem de fosforile GCN2 miktarında artış gözlemlenmiştir. Wang ve ark. (2014), insan oral skuamöz hücreli karsinomunda benzer obser vasyonlar yaptı ve son olarak Furnish ve ark. bir prostat kanseri çalışmasında benzer sonuçlar gözlemledi. Buna ek olarak, sistematik bir nicel çalışma, insan papiller renal hücreli karsinomunda artan GCN2 ekspresyon seviyelerinin kötü hasta sonuçlarının güçlü bir göstergedir.

Daha büyük bir multiomik çalışmanın parçası olarak Saavedra-Garcia ve ark., hangi kanserlerin GCN-2 hedeflemesine karşı en savunmasız olabileceğini belirlemek için Kanser Bağlımlılık Haritası (DepMap) ve Kanser Genom Atlası (TCGA) gibi mevcut kanser biyoinformat havuzlarını derinlemesine araştırılmıştır. Kanser hücre hatlarının %13'ünün GCN-2'ye bağımlı görüldüğünü belirlediler. Multipl miyelom (MM) ve glioblastomlara odaklanarak, GCN-2'ye bağımlı olduğu tahmin edilen tümörleri olan hastaların (bu tahmin, TCGA'da mevcut olan hasta örneklerinin transkripsiyonel profiline bakılarak yapıldı), hem farmakolojik olarak hem de radyoterapi kullanarak daha erken ve sürekli tedavi gerektiren daha agresif kanserlere sahip olduklarını belirlediler. Tahmin edilen GCN-2'ye bağımlı kanserlerde gözlenen önemli bir ortaklık, GCN-2'ye bağımlı

tümörleri hedeflemek için fonksiyonel bir biyo belirteçte işaret edebilen büyüme faktörü β (TGF- β) sinyal genlerinin dönüştürülmesinde artan fonksiyonuydu.

Belirsiz olan, kanserli hücrelerde sürekli GCN-2 aktivasyonunu kolaylaştıran altta yatan sistemdir. GCN-2, kısa bir yarı ömre sahip bir proteindir. GCN2 aşağı regülasyonuna büyük olasılıkla, bir NEDD4L (nöral öncü hücre eksprese edilen, gelişimsel olarak aşağı regüle edilmiş 4 benzeri) oluşumu yoluyla kolaylaştırılan ubiquitinasyon ve proteazomal bozunma aracılık eder. Otofosforile edilmiş, aktive edilmiş GCN-2, bu proteazomal bozunma yolundan korunuyor gibi görünür. Fosforile GCN2'nin zaman içinde kademeli olarak birikmesinin, hücreleri nihai CHOP aracılı apoptoza yönlendirebileceği düşünülmektedir. GCN-2 çeviri seviyelerinin artmasından ziyade, bu devir yolunun bozulmasının, GCN-2 seviyelerinin artmasının nedeni olduğu öne sürülmüştür. Bu, GCN-2'nin fosforillenmesinden sorumlu fosfatazların, yolun negatif geri besleme mekanizmasında çok önemli bir rol oynayacağını düşündürür (Wang ve ark., 2014).

2.5. Theranekron

Tarantula cubensis ayrıca bir diğer ismiyle *Mygale cubensis*, Küba tarantulası, tüylü örümcek veya kahverengi örümcek olarak da tanımlanır. *Tarantula cubensis* D6 (TC) (Theranekron®D6, Richter Pharma Ag, 1 mg / ml), *tarantula cubensis* adlı örümceğin tamamının % 60 alkol çözeltisi ile muamele edilmesi ve toksinin alkolik ekstraktının oluşturulmasıyla üretilen, veteriner hekimlikte kullanılan bir ajandır. *Tarantula cubensis* zehrinden alkol ekstraksiyonu ile hazırlanan ve hayvanlarda ülseratif, nekrotik, inflamatuvar ve proliferatif vakalar için veteriner hekimlikte kullanılan homeopatik bir ajandır. Theranekron'un her mililitresi, Avrupa Homeopatik Farmakopesi'nin 4b yöntemine göre hazırlanan *tarantula cubensis*'in alkollü ekstraktını içerir. Etki mekanizması tam olarak belli olmamakla birlikte, herhangi bir proliferatif lezyonda vücudun savunma mekanizmasını uyardığı ve kendiliğinden iltihabı baskıladığı düşünülmektedir. Örümcek ısırığından sonra zehirin kontrolsüz ve yüksek dozlarda memelilere geçmesiyle ödem, iltihaplanma, ağır alerjik reaksiyon, enjeksiyon yerinde nekroz ve doku kaybı görülebilir. İlaç formunda kullanıldığında iltihabi süreçlerde sınır çizgisinin oluşumunu sağlarken epitelizasyon oranını artırır, vücut sıvılarının emilimini artırarak ödemin gerilemesine katkı sağlar. Ayrıca anti-inflamatuvar, immünomodülatör, antitümör ve neovaskülarizasyonu arttırıcı etkilere sahiptir. Sınır çizgisi oluşturma

etkisinin, katabolik enzimlerin mevcut nekrotik dokudan çevre dokuya yayılmasının önlenmesi ve anti-inflamatuar etkisi ile elde edildiği varsayılmaktadır (Sencar ve ark., 2021).



Şekil 2.10. Tarantula örümceği.

<https://stock.adobe.com> (Erişim tarihi: 26 Ağustos 2025).

"Sağlıklı insanlarda bir hastalığın semptomlarına neden olmak, hasta insanlarda benzer semptomları tedavi edecektir" diyen bu ilaç ticari unvanıyla veteriner hekimlikte üstün bir başarı ile hizmet veren bir farmasötik ilaçtır. T. cubensis zehrinin etki mekanizması tam olarak açık olmasa da, herhangi bir proliferatif lezyonun herhangi bir enflamatuarının spontan remisyonuna yardımcı olmak için vücudun savunma mekanizmalarını uyardığı düşünülmektedir. İlacın, köpeklerde meme bezi tümörlerinin, sığırlarda paronişi ve birçok ülser ve apse türünün emilimini ve sınırını uyardığı ve ayrıca hayvanlarda nekrotik, flojistik veya proliferatif vakaların tedavi edildiği gözlemlenmiştir. Theranekron'un sınırlayıcı etkisi, hastalıklı ve sağlıklı yapıları hücresel düzeyde ayırır, bu da patolojik dokuların vücuttan atılmasını sağlar; Yenileyici etkisi ayrıca hızlı iyileşme sağlar (Torun Karadere ve ark., 2023).

Örümcek zehirleri, iyi bilinen nörotoksik etkilerinin yanı sıra antiaritmik, antimikrobiyal, analjezik, antiparazitik, sitolitik, hemolitik ve enzim inhibe edici aktivitelere sahip peptitlere sahiptir. Örümcekler zehirlerini öncelikle avlarını felç etmek için kullandıklarından, bu zehirler nöronal iyon kanallarının ve reseptörlerinin aktivitesini

düzenleyen birçok peptit içerir. Karakterize edilen örümcek zehiri peptitlerinin çoğu, voltaj kapılı potasyum, kalsiyum veya sodyum kanallarını yönelir. Cerrahi onarımdan hemen sonra nekrotik doku etrafında bir sınır çizgisi sağladığı, enflamatuvar süreçleri ve katabolik enzimlerin nekrotik dokudan çevre bölgelere hareketini önlediği gözlemlenmiştir (Akdağ ve ark., 2022).

Bir çalışmada, Theranekron'un® antiproliferatif aktivitesini karşılaştırmalı olarak inceledik ve androjenik sinyalizasyon ve hücre döngüsü ile ilişkili siklin proteinleri üzerindeki biyokimyasal etkisini immüno blotlama ile araştırılmıştır. Ek olarak, Theranekron'un bir 3D hücre kültürü modeli kullanarak androjene bağımlı PCa hücrelerinin ankrajdan bağımsız hücre büyümesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bulgularımız, Theranekron'un® androjene bağımlı PCa hücrelerine karşı güçlü terapötik etkinlik sunabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, kemoterapötiklere karşı kazanılmış direnci önlemek için güçlü bir bileşen olabilir (Erzurumlu ve ark., 2023).

Bir çalışmada theranekron ile endometriozis tedavisinde yaygın olarak kullanılan MPA (Medroksiprogesteron Asetat) ve LA (Leuprolid Asetat) karşılaştırıldı. Her ikisi de (sırasıyla $p = 0.04$ ve $p = 0.05$) endometriotik odakların hacmini azaltmasına rağmen, daha önceki araştırmalarla tutarlı olarak, tedavi durdurulduktan sonra hızlı nüksü önleyememişlerdir. Karşılaştırıldığında, theranekron endometriotik odakların hacmini ve mimarisini daha etkili bir şekilde azaltmıştır. Diğer iki ajandan farklı olarak, theranekron tedavisi kesildikten 3 hafta sonra yapılan son operasyonda artmış nüks saptanmamıştır. Theranekron'un endometriozisteki iyileşmeyi önemli ölçüde hızlandırdığını ve nakillerin atrofisine neden olduğu belirlenmiştir. Endometrioziste theranekron'un iyileştirici etkisi MPA ve LA'nınkinden daha yüksektir. Ayrıca, theranekron ile tedavi edilen sıçanlar daha düşük bir nüks oranı sergilemiştir (Dolapcıoğlu ve ark., 2013).

Bir çalışmada, Theranekron'un bir sıçan modelinde kırık iyileşmesi üzerine radyolojik, biyomekanik, histopatolojik ve immünohistokimyasal etkileri titizlikle araştırılmıştır. Bu çalışmanın bulguları, Theranekron'un siyatik sinir yaralanması sonrası aksonal ve miyelin hasarını azalttığını ve nöroprotektif etkiyi artırdığını belirlenmiştir. Sonuç olarak, çalışma sonuçlarımız Theranekron'un akut inflamatuvar süreci azalttığını ve kırık kuvvetini artırdığını, sıçanlarda özellikle kırık kaynamasının erken evrelerinde anjiyogenez,

osteoblast proliferasyonu ve kemik oluşumu üzerine etkili olduğu belirlenmiştir (Güven ve ark., 2022).

Çalışmamıza benzer şekilde nöroblastom hücre hattıyla yapılan bir çalışmada, theranekronun tek başına ve sisplatin ile birlikte nöroblastom hücre hattı SH-SY5Y üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada Theranekron (Trn) ve sisplatinin (Cis) hücre canlılığı ve hücre ölümü üzerine etkileri araştırıldı. Başlangıçta sadece Trn uygulandı, ancak SH-SY5Y'ye uygulanan konsantrasyonlarda sitotoksik etki gözlemlenmemiştir. SH-SY5Y hücreleri üzerinde yapılan MTT analizlerinde herhangi bir toksik etki belirlenmiştir. Bu bulgulara göre, Trn'deki etanolün de hücre canlılığını azaltan toksisiteye neden olduğunu söylemek doğru değildir. Nöroblastom SH-SY5Y hücre hattında apoptozun indüklendiği belirtilmiştir. Bu, özellikle geç apoptozdan ziyade erken apoptozun orantılı fazlalığı ile belirlenmiştir. Bu bulgular daha ayrıntılı moleküler hedeflerle destek görmedi. Bununla birlikte, reçete edilen dozlarda sisplatin ile birlikte uygulandığında, Trn iki yönlü bir etki mekanizması göstermiştir. Sadece hücreler içinde erken apoptoza neden olmakla kalmamıştır. Aynı zamanda mitokondriyal membran potansiyelinde önemli bir düşüşle eş zamanlı olarak hücre canlılığında kayda değer bir azalmaya sebep olmuştur. Ayrıca, SHSY5Y hücrelerinin hacim alanında önemli bir azalma gözlemlenmiştir. Bu bulgular, Trn ve sisplatin arasındaki sinerjik etkileşimler potansiyelini açık şekilde göstermektedir (Taspınar 2023).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul

Deneyimiz için gerekli olan etik kurulu onayı için Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Müdahale Olmayan Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulundan 19.04.2024 tarihli, 2024/40 sayılı, 2024/2 toplantı numarasına sahip Etik Kurul onayı alındı.

3.2. Deney Grupları

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji laboratuvarında olan ve -156 °C'deki saklanan SHSY-5Y Nöroblastoma hücreleri (ATCC HTB-11) ve L929 fibroblast hücreleri (ATCC hücre hattı, NCTC klonu 929) hücreleri kullanıldı.

Deney gruplarımız:

İlaçlı: SHSY-5Y hücre hattı+theranekron

İlaçlı: L929 hücre hattı + theranekron

Kontrol: SHSY-5Y hücre hattı

Kontrol: L929 hücre hattı olacaktır.

Kontrol ve ilaçlı olarak deneyde iki grubumuz vardır. İki farklı hücre hattı için bu gruplar belirlenmiş ve deney buna uygun olarak yapılmıştır. İmmünohistokimya ve Tunel işlemleri de bu iki grup ve iki hücre grubunda yapılmıştır. Farklı hücre hatları iki grup açısından da değerlendirilmiştir.

3.3. Kimyasallar

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium Mix with ,L-glutamine,
Capricorn Scientific, New York, ABD

Dulbecco's Modification of Eagle's Medium/Ham's F-12 50/50 Mix with L-glutamine,
Capricorn Scientific, New York, ABD

Fötal sığır serumu (Fetal Bovine Serum, FBS), Capricorn Scientific, New York, ABD

Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (100X), Capricorn Scientific, New York, ABD

% 0,25 Tripsin-Etilendiamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Wisent, St. Louis,

ABD

Tripan mavisi (%0,5), Biological Industries, İsrail

Dimetil sülfoksit (DMSO), Santa Cruz, Solon, ABD

Dulbecco's PBS (1x), w/o Ca & Mg, w/o Phenol Red 500ml PBS-1A Capricorn Scientific, New York, ABD

L-Glutamine (200 mM) 100ml GLN-B, Capricorn Scientific, New York, ABD

Gentamicin Solution, 10 mg/ml 100ml GEN-10B, Capricorn Scientific, New York, ABD

Amphotericin B Solution (100x) 100ml AMP-B Capricorn Scientific, New York, ABD

DMEM High Glucose (4.5 g/l), with L-Glutamine 500ml DMEM-HA Capricorn Scientific, New York, ABD

MEM with Earle's Salts, with L-Glutamine 500ml MEM-A Capricorn Scientific, New York, ABD

Theranekron D6: Richter Pharma, Avusturya

Hidrojen Peroksit (%35): Merck Millipore, Almanya

Hidrofobik PAP PEN: Japonya

Fosfat Büferli Salin (PBS): Sigma (USA)

TUNEL Kit: ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Millipore, S7101, ABD, Burlington MA

3.4. İn Vitro Çalışmalar

3.4.1. Hücre Üretilmesi

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji laboratuvarında -156 °C'deki saklanan SHSY-5Y Nöroblastoma hücreleri (ATCC, CRL-2266) ve L929 fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Hücre kültürü laboratuvarında bulunan %5 CO₂ , 37° C ve nemli ortamda inkübatör içerisinde; SHSY-5Y nöroblastoma hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS) %1 penisilin streptomisin, %1 L-Glutamin ve DMEM-F12 içeren ortamda 25 cm² hücre kültürü flasklarında çoğaltılırken, L929 fibroblast hücreleri (ATCC hücre hattı, NCTC klonu 929) %10 fetal sığır serumu (FBS) %1 penisilin–streptomisin, %1 L-Glutamin ve MEM içeren ortamda 25 cm² hücre kültürü flasklarında üretildi. Gerekli hücre sayısına ulaşıldığında bir kısmı diğer çalışmalar için donduruldu. Kalan kısmı ise MTT testi, immünohistokimya ve tunel için çoğaltıldı.

3.4.2. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

SHSY-5Y nöroblastoma hücreleri, Dulbecco's Modification of Eagle's Medium/Ham's F-12 50/50 Mix with L-glutamine (DMEM-F12) (Capricorn Scientific, ABD) içine %10 fetal sığır serumu (FBS) (Capricorn Scientific, ABD), %1 Penisilin-Streptomisin (P/S) solüsyonu (Capricorn Scientific, ABD) ve %1 L-Glutamine (Capricorn Scientific, ABD) eklenerek hazırlandı. L929 fibroblast hücreleri ise, MEM with Earle's Salts, with L-Glutamine MEM-A (MEM) (Capricorn Scientific, ABD) %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin (P/S) solüsyonu %1 L-Glutamine konsantrasyonda olacak şekilde, eklenerek besiyeri içerisinde kültüre edildi.

3.4.3. Hücrelerin Stoktan Çıkartılması

Donmuş SHSY-5Y nöroblastoma hücreleri ve L929 fibroblast hücreleri hücreleri çoğaltmak için, cryovial tüpler içerisinde bulunan hücre stokları, -156°C'deki buzdolabından alınarak, hızlı bir şekilde sıcak su banyosunda çözülür. Çözülen hücre süspansiyonları; 5 ml olacak şekilde %10 FBS, %1 P/S içeren ve %1 L-Glutamine ile uygun besiyerlerle 15 ml'lik santrifüj tüpüne alındı. Santrifüj tüpü 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücrelerden süpernatant kısmı alındı. Hücre peleti, 1 ml besiyeri ile sulandırılma yapılarak hücrelerin süspanse hale geldi. Hücre süspansiyonu, içerisinde 5

ml besiyeri bulunan 25 cm²'lik hücre kültürü flaskı (Thermo Scientific, USA) içerisine konularak, 37 °C'ye ayarlı, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi.

3.4.4. Hücrelerin Pasajlanması

Hücre pasajı, hücreler ortalama %70-80 yoğunluğa ulaştıklarında gerçekleştirildi. Öncelikle, flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından, hücre artıkları ve besiyeri içeriğinde bulunan serumun uzaklaştırılması amacıyla 25 cm²'lik flask'ın içerisine 1 ml besiyeri eklenerek flask yüzeyi yıkandı. Daha sonra besiyeri, flask içerisinden uzaklaştırıldı. Ardından hücreleri yapışıkları yüzeyden kaldırmak amacıyla, %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonundan 2 ml flask içerisine eklendi. Hücreler yaklaşık 5 dakika inkübatör içerisinde bekletildi. Flask yüzeyinden ayrıldıkları Inverted mikroskop ile belirlenen hücreler, tripsinin hücre membranına zarar vermesini engellemek amacıyla, 3 ml besiyeriyle tripsin yıkanarak 15 ml'lik falkonlara aktarıldı. 1000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Hücre peleti, hücre yoğunluğuna ve hücrelerin büyüme hızına göre uygun miktarda besiyeri ile sulandırıldı. Yeni bir 25 cm²'lik flask içerisine aktarıldı. Hücreler istenilen yoğunluğa (sayıya) ulaşınca kadar 37 °C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı.

3.4.5. Hücre Stoklanması

İstenilen yoğunluğa ulaşan hücreler flask yüzeyinden %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu yardımıyla kaldırıldıktan sonra santrifüj edildi. Santrifüj edilen hücrelerin üzerindeki süpernatant kısmı alınarak, pelet üzerine hücre yoğunluğuna göre hücre dondurma besiyeri (900µl DMSO + 100µl FBS) eklendi ve pipetaj yapılarak hücrelerin tek tek dağılması sağlandı. Işığa hassas olan hücre dondurma besiyeri ile süspanseli hücreler, her bir cryovial başına 1-1,5 ml olacak şekilde paylaştırıldı. Cryovialler -156 °C'ye kaldırıldı. Kaldırma işlemi sırasında hücre pasajı, hücre ismi, yapılan tarih ve kimin işlemi gerçekleştirdiği cryovial üzerine yazıldı.

3.5. MTT Testi

Hücre proliferasyonu ve madde sitotoksitesi belirlenmesi için 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide MTT uygulaması yapıldı. SHSY-5Y ve L929 hücreleri; 96 gözlü platelere her gözde 15000-20000 hücre olacak şekilde ekim işlemi

yapılacak. 24 saat sonra Theranekron (Richter-Pharma AG, Wels, Austria) 1/10, 1/25, 1/50, 1/75, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, 1/1000 oranlarında her madde ve her oranından 4 adet kuyucuk olacak şekilde etken madde eklemesi yapıldı. Kontrol grubu için etken madde içermeyen hücreler kullanıldı. 24 saat sonra her kuyucuğa 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide MTT uygulaması her kuyucuk için Reagent A'dan 10 µL eklenip 4 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra Reagent B 100 µL eklendi. Daha sonra tekrar 2 saat inkübe edildi. Allsheng AMR-100 mikropate reader spektrofotometer cihazında 570 nm dalga boyunda okutma işlemleri yapıldı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. Ve IC50 1/10 istatistiksel olarak uygun görüldü (Kumar ve ark, 2018).

3.6. İmmünohistokimya

SHSY-5Y nöroblastom ve L929 fibroblast hücreleri 12 gözlü hücre kültürü lamalarına ekim işlemi yapıldı.

Semikonfluent aşamaya gelindiğinde MTT testi ile belirlenen 1/10 ilaç uygulaması hücrelere uygulandı ve kontrol grubuna ilaç uygulaması yapılmadı. Hücreler 24 saat inkübe edildi. Daha sonrasında;

%4 Paraformaldehit ile fiksasyon aşaması 30 dk

3 kere PSB ile yıkama 5 dk

Triton 100x uygulaması (buz üzerinde) 15 dk

3 kere PSB ile yıkama 5 dk

Hidrojen peroksit uygulaması 5 dk

3 kere PSB ile yıkama 5 dk

Blocking solution uygulaması 1 saat

PERK, PKR ve GCN-2 antikor uygulaması +4°C 24 saat

3 kere PSB ile yıkama 5 dk

Avidin solution uygulaması. 30dk

3 kere PSB ile yıkama 5 dk

Biotin solution uygulaması 30dk

3 kere PSB ile yıkama 5 dk

DAB uygulaması 3dk

3 kere PBS ile yıkama 5 dk

Mayers Hematoksilen uygulaması 1 dk

3 kere PBS ile yıkama 5 dk

3 kere distile su ile yıkama 5 dk

Su bazlı kapatma medyumunu ile lamalar kapatıldı. Bu işlem iki grup içinde üç kez tekrar edildi (Becer ve ark., 2019).

Kullanılan Antikorlar:

PERK (PKR benzeri endoplazmik retikulum kinaz): Sc-377400 (Santa Cruz)

PKR (protein kinaz R): Sc-6282 (Santa Cruz)

GCN-2 (genel kontrol baskılanmayan): Sc-374609 (Santa Cruz)

3.7. Tunel Yöntemi

Apoptozu saptamak için; in situ apoptoz saptama kitini (ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Millipore, S7101, ABD, Burlington MA) kullanıldı. 24 saat 12 gözlü hücre lamında ilaçlı ve kontrol olarak bekletilen hücreler; 30 dk %4'lük paraformaldehitte hücreler fikse edildi. 3 kere 5'er dk pbs ile yıkama yapıldı. Proteinaz K oda sıcaklığında olup 1/500 dilatölasyon edilip 15 dk bekletildi. 3 kere 5'er dk pbs ile yıkama yapıldı. Daha sonra Hidrojen Peroksitte 5 dk bekletildi. Tekrar 3 kere 5'er dk pbs ile yıkama yapıldı. Ecuiliprotion bufferı oda sıcaklığında kullanılarak 5 dk bekletildi. 77 ml reaction buffer , 33 ml Tdt hazırlandı. Lamaların üzerine damlatıldı ve 50 µL damlatıldı.

Parafilm ile 12 gözlü hücre kültürü lamı sıkıca kapatılıp 37 °C etüvde 1 saat bekletildi. Stop wash buffer solüsyonunu 1 ml stop wash , 34 ml distile ile hazırlandı. Toplam 35 ml solüsyon elde edildi. Etüvden çıkan lamdaki hücrelere uygulandı. 3 kere 5'er dk pbs ile yıkama yapıldı. Antidioksigenin conjugate 'ı damlatılarak 30 dk bekletildi. 3 kere 5'er dk pbs ile yıkama yapıldı. DAB işlemi gerçekleştirildi. 3 kere 2'şer dk pbs ile yıkama yapıldı. 5 dk distile suda bekletildi. Maye rs hematoksilen de 1 dk tutuldu. 3 kere 5'er dk distile su ile yıkama yapıldı. Su bazlı medium ile kapatma yapıldı (Gündüz ve ark; 2006).

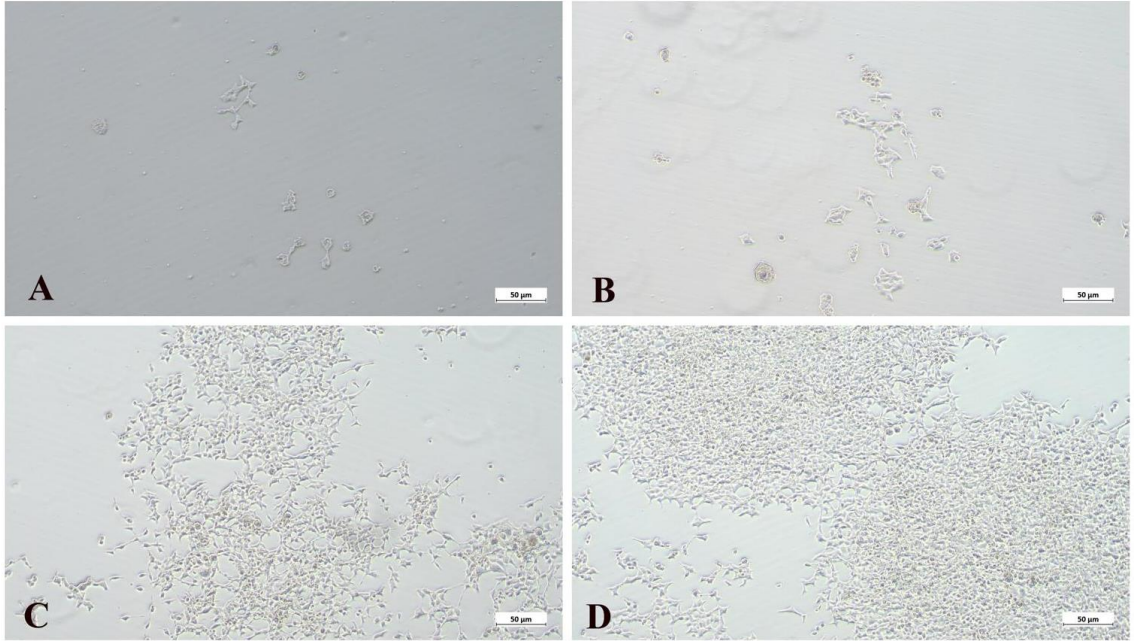
3.8. İstatiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler Mac için GraphPad Prism sürüm 7.00 (GraphPad Yazılımı, La Jolla, CA) kullanıldı. Verilerin normal dağılımını belirlemek için D'Agostino Pearson omnibus testi kullanıldı. Normal dağılım durumunda, nicel değişkenler tek yönlü varyans analizi ve Tukey'nin posthoc testi kullanılarak karşılaştırıldı. Veriler, normalleştirilmiş verilerin ortalaması $\pm$ ortalama standart sapması olarak ifade edildi. $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü Değerlendirmesi

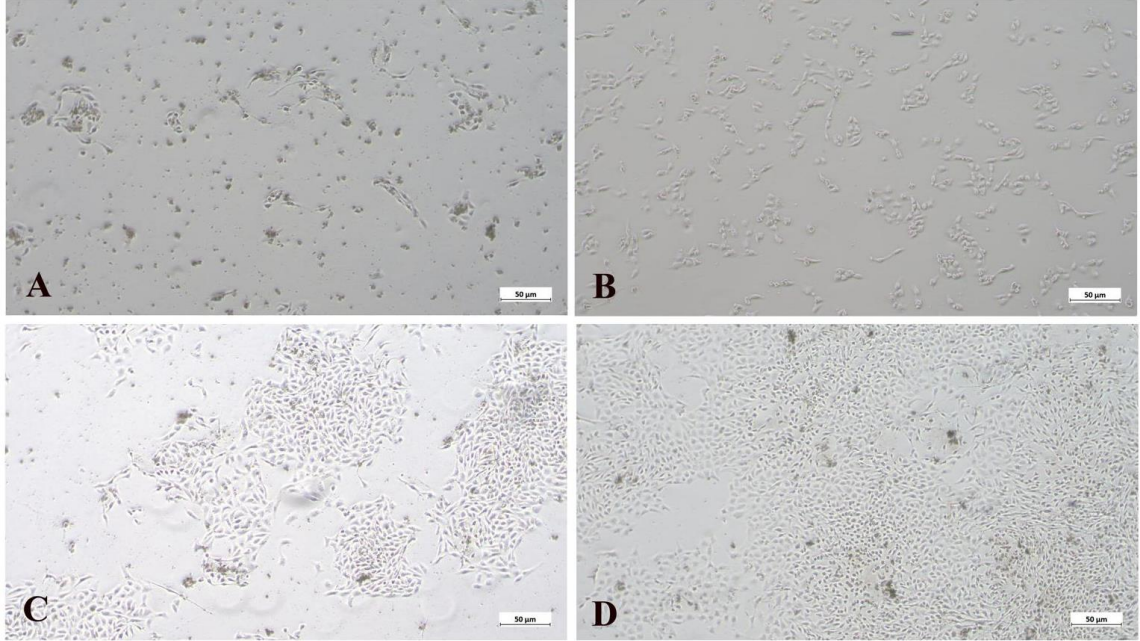
Shsy-5y nöroblastoma hücreleri çözündürüldükten sonra flasklara yayıldığında 1.gün yuvarlak şekilli, parlak görünümlü yüzen hücre veya hücre grupları olarak görüldü (Şekil A). İnkübasyonun 4.gününde hücrelerin yapıştığı uzantılar verdiği ve yer yer kültür kabını doldurmaya çalıştığı izlendi (Şekil B). Kültürün 7.gününde ise hücrelerin uzantılarının nörit benzeri olduğu ve flaskın %40 'ını doldurduğu görüldü (Şekil C). Kültürün 12. Gününde ise semi konfluent aşamaya geçildiği ve hücrelerin nörit uzantıları uzattıkları, yuvarlak şekilli canlı ve birbirine yakın hücreler olarak izlendi. Bazı hücrelerin yan yana olduklarında epiteloid karakterde olduğu ve %85 hücre yoğunluğuna ulaştıkları görüldü (Şekil D).



Şekil 4.1. SHSY-5Y hücre kültüründeki görüntüsü.

L929 insan fibroblast hücreleri çözündürüldükten sonra flasklara ekildiklerinde 1.gün parlak yüzen hücreler olarak izlendi ve gün sonunda birkaç tanesinin yapıştığı görüldü (Şekil A). İnkübasyonun 4. gününde hücrelerin yapışmaya başladığı fibroblastik karaktere büründükleri izlendi (Şekil B). Bir sonraki 7. gün kültüründe ise hücrelerin fibroblastik karakterlerle beraber adasal bir yapılanmaya gittiği ve kültür kabını yavaş yavaş

doldurmaya başladığı izlendi (Şekil C). Son olarak 12. gün kültüründe ise fibroblastik karakterdeki hücrelerin adacıkların arasını doldurdıklarını ve semi konfluent aşamayı geçtikleri %85 hücre yoğunluğuna ulaştıkları görüldü (Şekil D)



Şekil 4.2. L929 hücre kültüründeki görüntüsü.

4.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

4.2.1. PERK İmmünoreaktivitesi

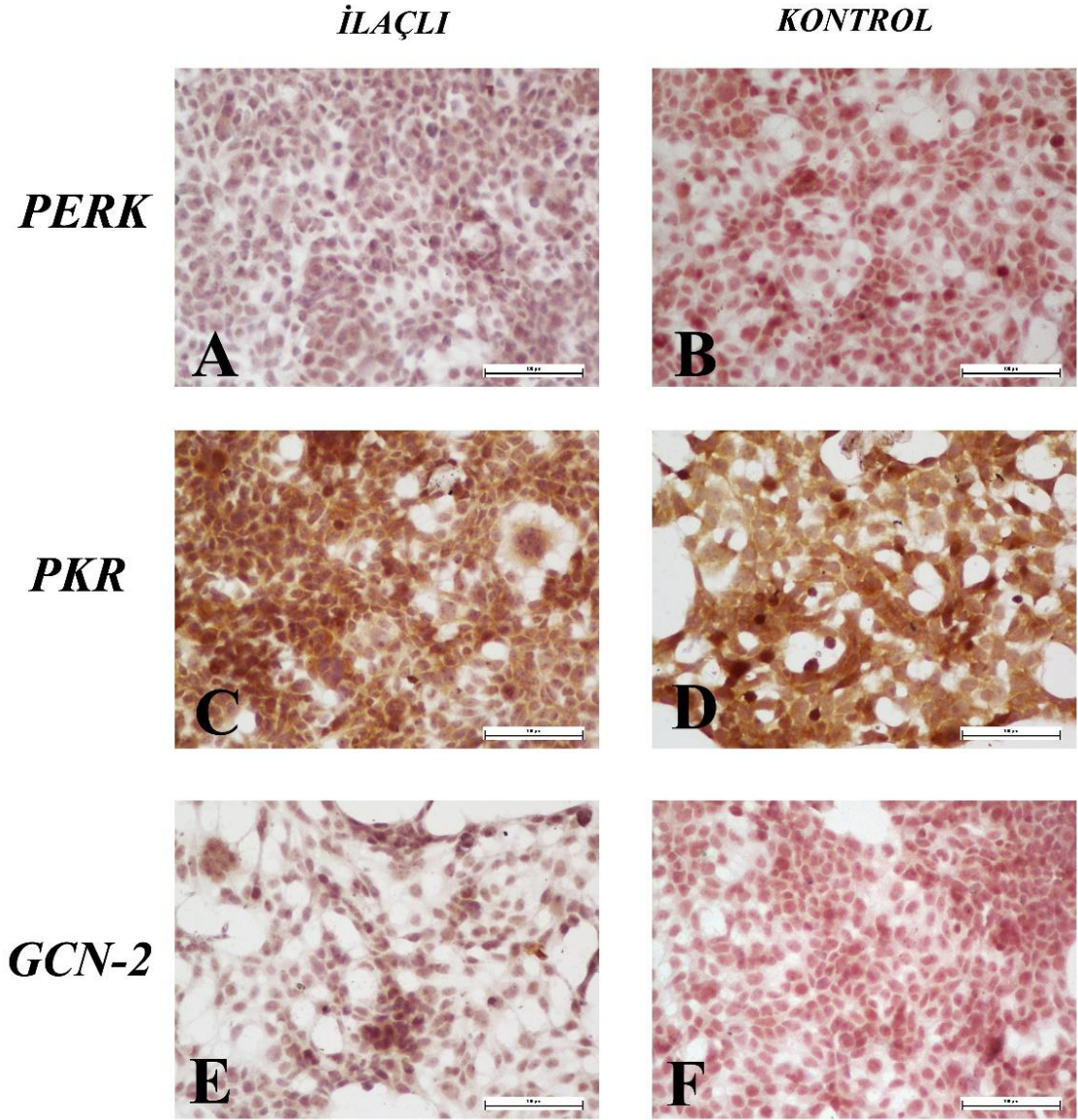
L929 insan fibroblast hücre hattında kontrol grubu için PERK immünoreaktivitesinin yüksek olduğu sitoplazmada izlendi, buna rağmen aynı hücrenin ilaçlı grubunda ise sitoplazmada azaldığı görüldü (Şekil B). SHSY-5Y nöroblastoma hücre hattı için ilaçlı grupta anlamlı bir artış görülürken kontrol grubunda ise bir azalma izlendi (Şekil C). L929 hücre hattı için ilaçlı gruptaki azalma özellikle hücrelerin sağ kalım oranını arttırdığını izlendi (Şekil A). Buna rağmen kanser hücre hattı için ilaçlı grupta immünoreaktivitenin artması Theranekron ilacının kanser hücrelerindeki Entegre Stresi arttırdığı ve buna bağlı olarak da hücreleri ölüme götürdüğü görüldü. Fakat L929 fibroblast hücre hattında ilaçlı grup dahi hücrelerin immünoreaktiviteye bağlı Entegre Streslerinde azalma görüldü. Buna bağlı olarak da Theranekron normal hücrelerde stresi azaltıp kanser hücrelerinde stresi artırarak PERK immünoreaktivitesi üzerinden hücre sağkalımına etki ettiği izlendi.

4.2.2. PKR İmmünoreaktivitesi

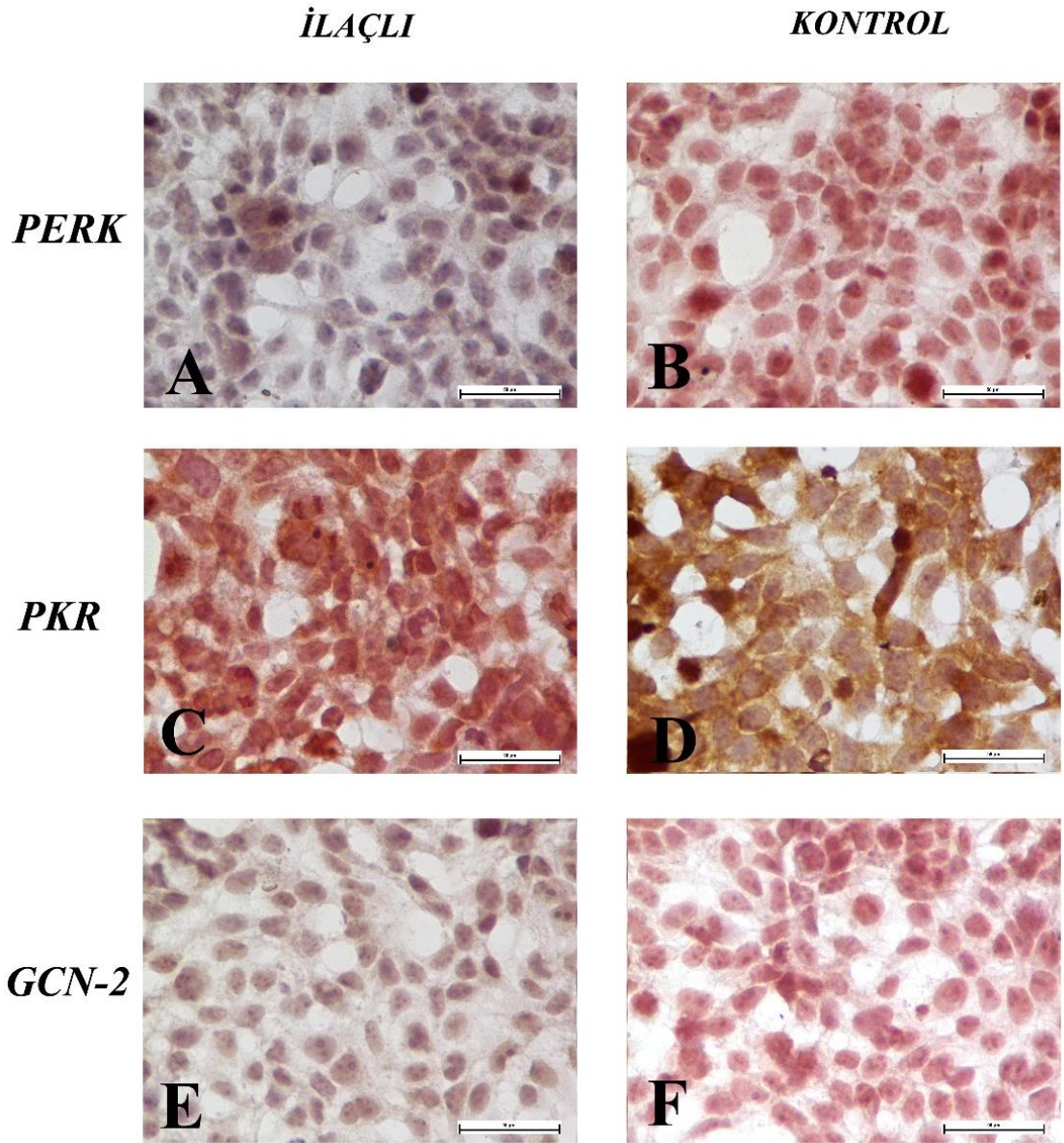
L929 fibroblast hücre hattında PKR immünoreaktivitesi kontrol grubu hücrelerin çekirdek ve sitoplazmalarında oldukça yüksek olduğu görüldü (Şekil D). İlaçlı grupta ise bu ifadeden biraz daha az bir reaktivite gözlemlendi (Şekil C). Entegre Stresin normal hücrelerde varlığı görüldü. Buna bağlı olarak da Theranekronun bunu inhibe edebileceğini bize düşündürdü. SHSY-5Y nöroblastoma hücreleri kanser hattı için kontrol grubunda PKR immünoreaktivitesi orta şiddette izlenirken ilaçlı grup yani Theranekron verilen hücrelerde sitoplazma ve çekirdekte oldukça yoğun bir şekilde olduğu görüldü (Şekil D). PKR immünoreaktivitesinin SHSY-5Y nöroblastoma kanser hücre hattındaki ilaçlı hücrelerde arttığı normal L929 fibroblast hücrelerinin ilaçlı grubunda azaldığı anlamlı bir şekilde ifade edildi. PKR immünoreaktivitesi hem çekirdek hem sitoplazmada desteklediği için PERK 'le beraber ortak bir yola sahip olduğu görüldü.

4.2.3. GCN-2 İmmünoreaktivitesi

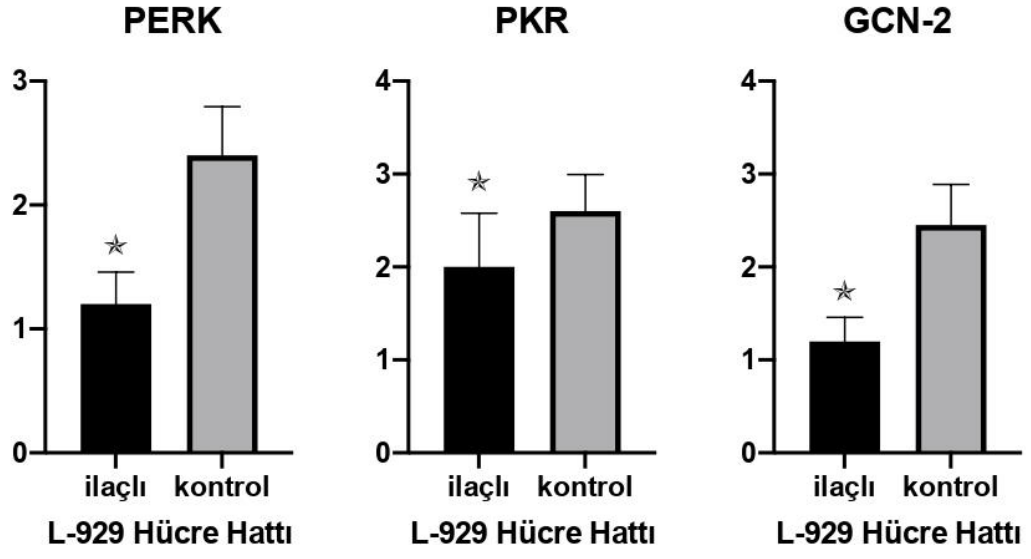
L929 fibroblast hücre hattında GCN-2 immünoreaktivitesi sitoplazmadaki varlığı orta şiddette izlendi. İlaçlı grup için aynı hücre hattında azaldığı görüldü (Şekil E). SHSY-5Y nöroblastom hücre hattında GCN-2 immünoreaktivitesi kontrol grubunda orta şiddette görüldü (Şekil F). İlaçlı grupta ise bu reaktivitenin orta şiddetten biraz daha fazla olarak izlendi (Şekil E). L929 fibroblast hücre hattında ilaçlı gruptaki GCN-2 immünoreaktivitesinin azalması buna rağmen kanser hücre hattındaki ilaçlı grup hücrelerde bu reaktivitenin tam tersine artması yine Entegre Stresin Theranekron tarafından normal hücrelerde azaldığını kanser hücrelerinde arttığını anlamlı bir şekilde gösterdi.



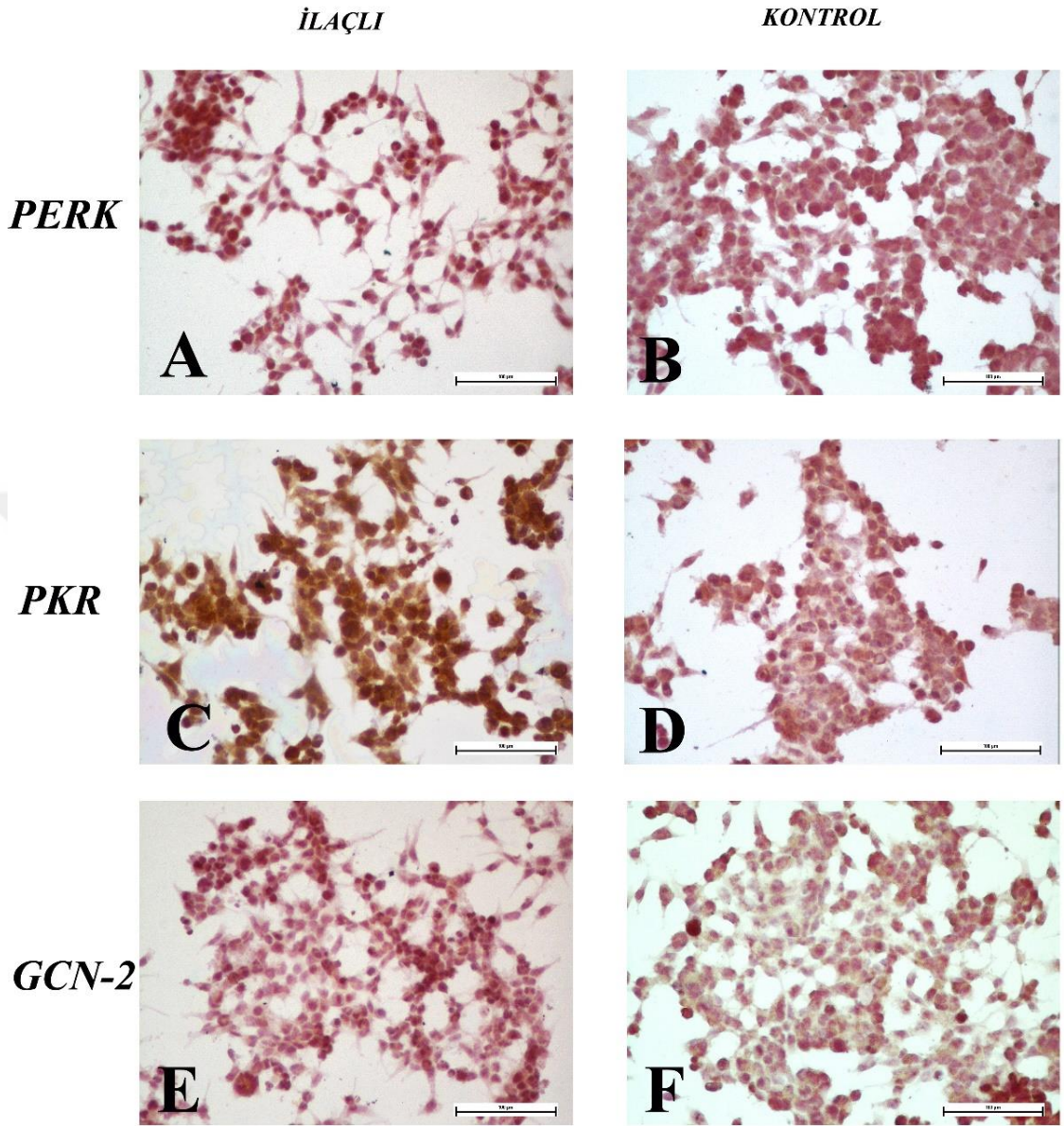
Şekil 4.3. L929 hücre hattında ilaçlı ve kontrol ⇒ grupları için PERK, PKR, GCN-2 antikorlarının İmmünohistokimyasal reaktivitesi. “ ” ile gösterilenler ilaçlı gruptaki pozitif boyanma gösteren hücrelerdir. “ ” ile gösterilenler kontrol grubunun pozitif boyanma gösteren hücreleridir (20x).



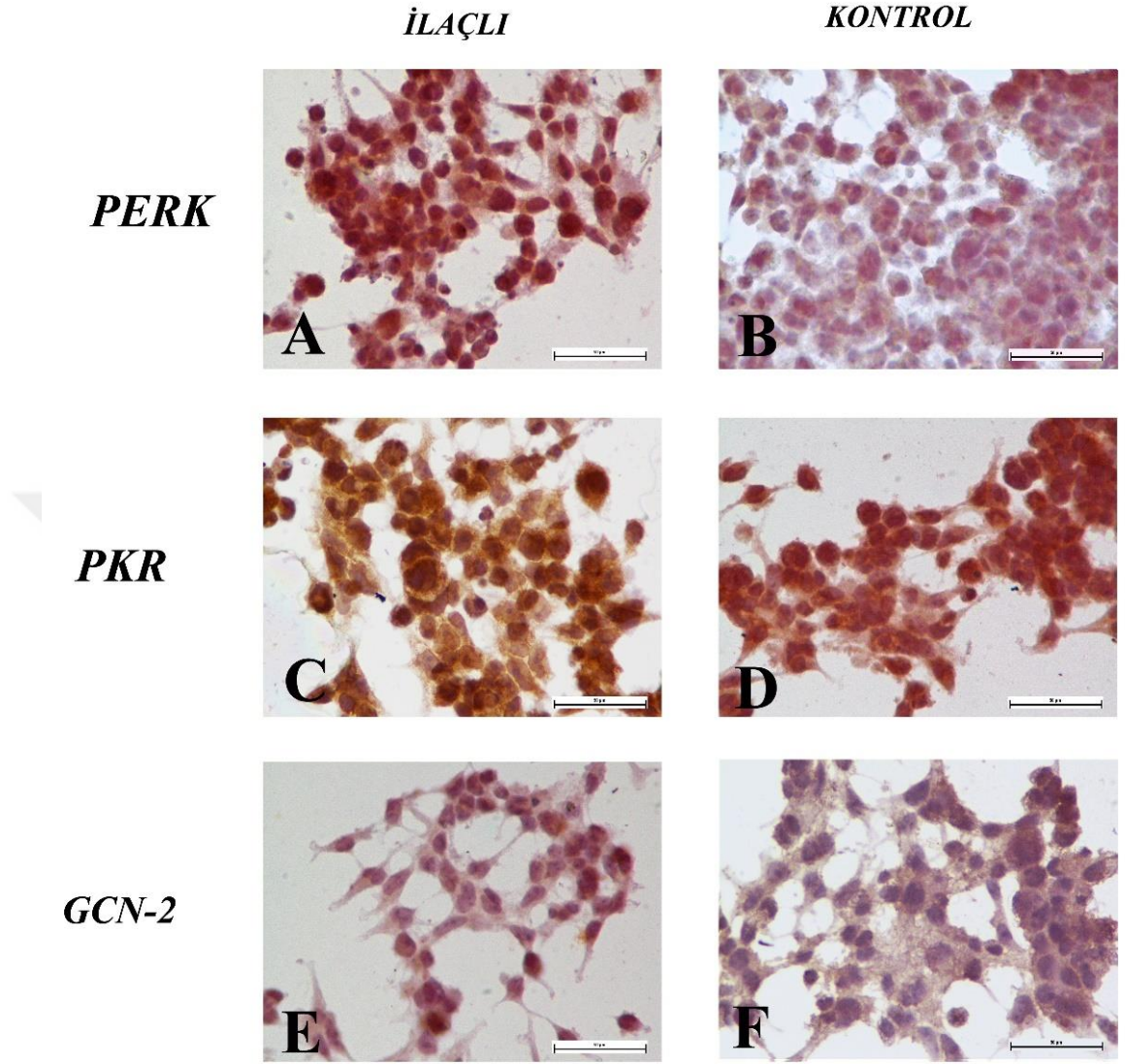
Şekil 4.4. L929 fibroblast hücre hattında ilaçlı ve kontrol grupları için PERK, PKR, GCN-2 antikorlarının İmmünohistokimyasal reaktivitesi. “” ile gösterilenler ilaçlı gruptaki pozitif boyanma gösteren hücrelerdir. “” ile gösterilenler kontrol grubunun pozitif boyanma gösteren hücreleridir (40x).



Şekil 4.5. L929; PERK, PKR, GCN-2 İmmünohistokimyasal boyama sonuçları istatistiksel analizi (p<0.05).

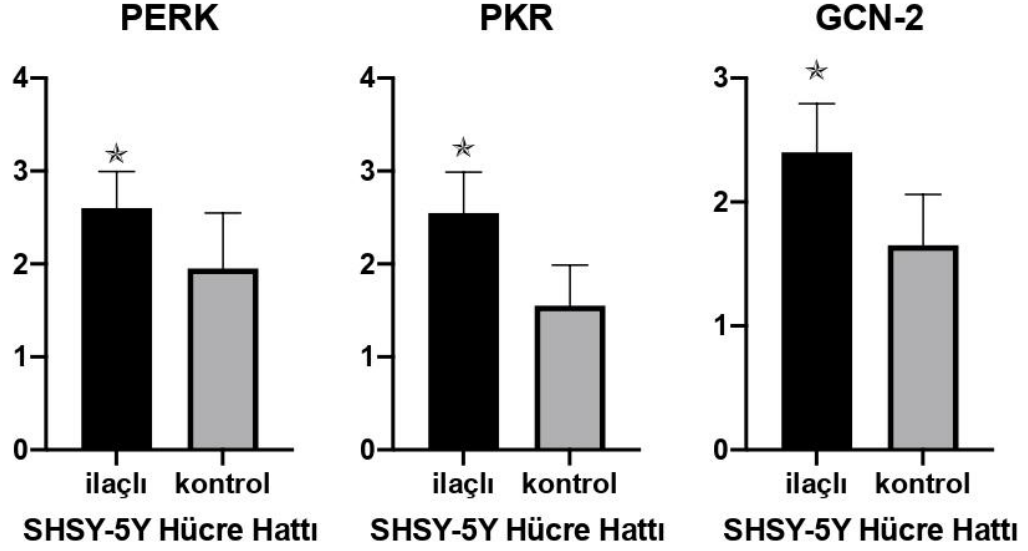


Şekil 4.6. SHSY-5Y nöroblastoma hücre hattında ilaçlı ve kontrol grupları için PERK, PKR, GCN-2 antikorlarının İmmünohistokimyasal reaktivitesi. “” ile gösterilenler ilaçlı gruptaki pozitif boyanma gösteren hücrelerdir.”  “ile gösterilenler kontrol grubunun pozitif boyanma gösteren hücreleridir (20x).



Şekil 4.7. SHSY-5Y nöroblastoma hücre hattında ilaçlı antikorlarının İmmünohistokimyasal reaktivitesi. “☆” ile gösterilenler ilaçlı gruptaki pozitif boyanma gösteren hücrelerdir. “⇒” ile gösterilenler kontrol grubunun pozitif boyanma gösteren hücreleridir (40x).

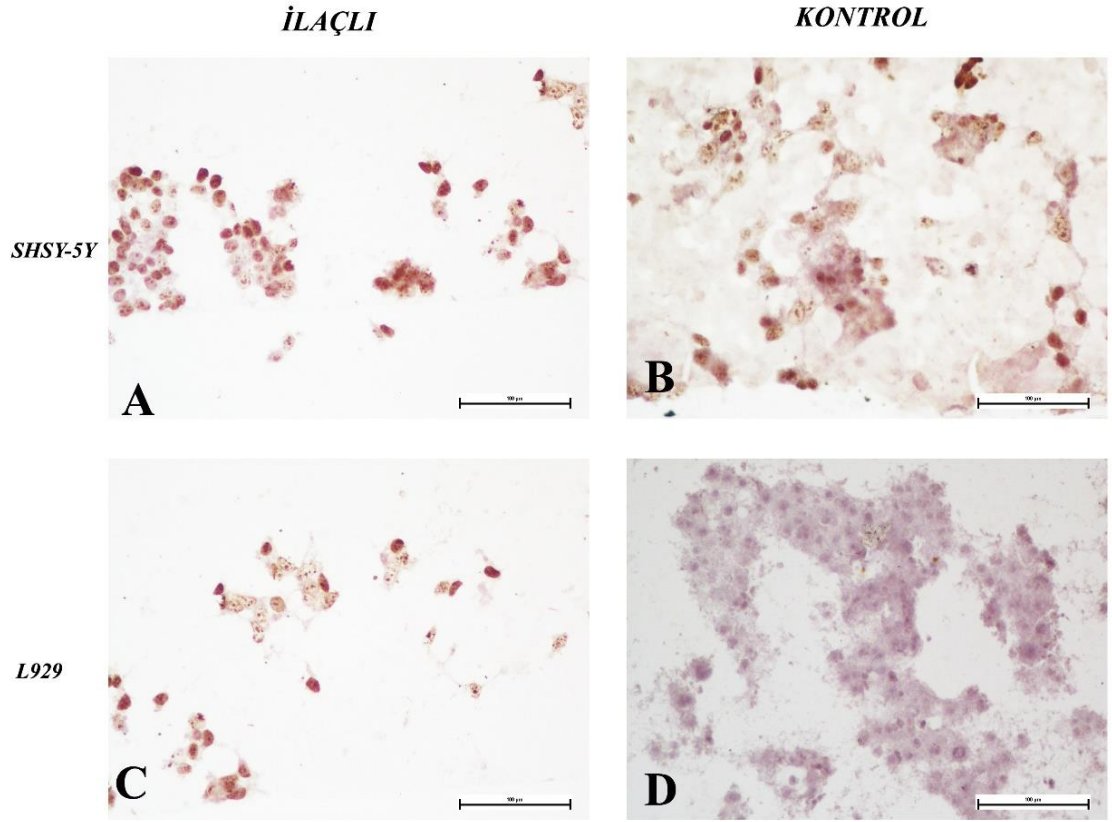
ve kontrol grupları için PERK, PKR, GCN-2 “⇒” ile gösterilenler ilaçlı gruptaki pozitif “☆” ile gösterilenler kontrol grubunun pozitif



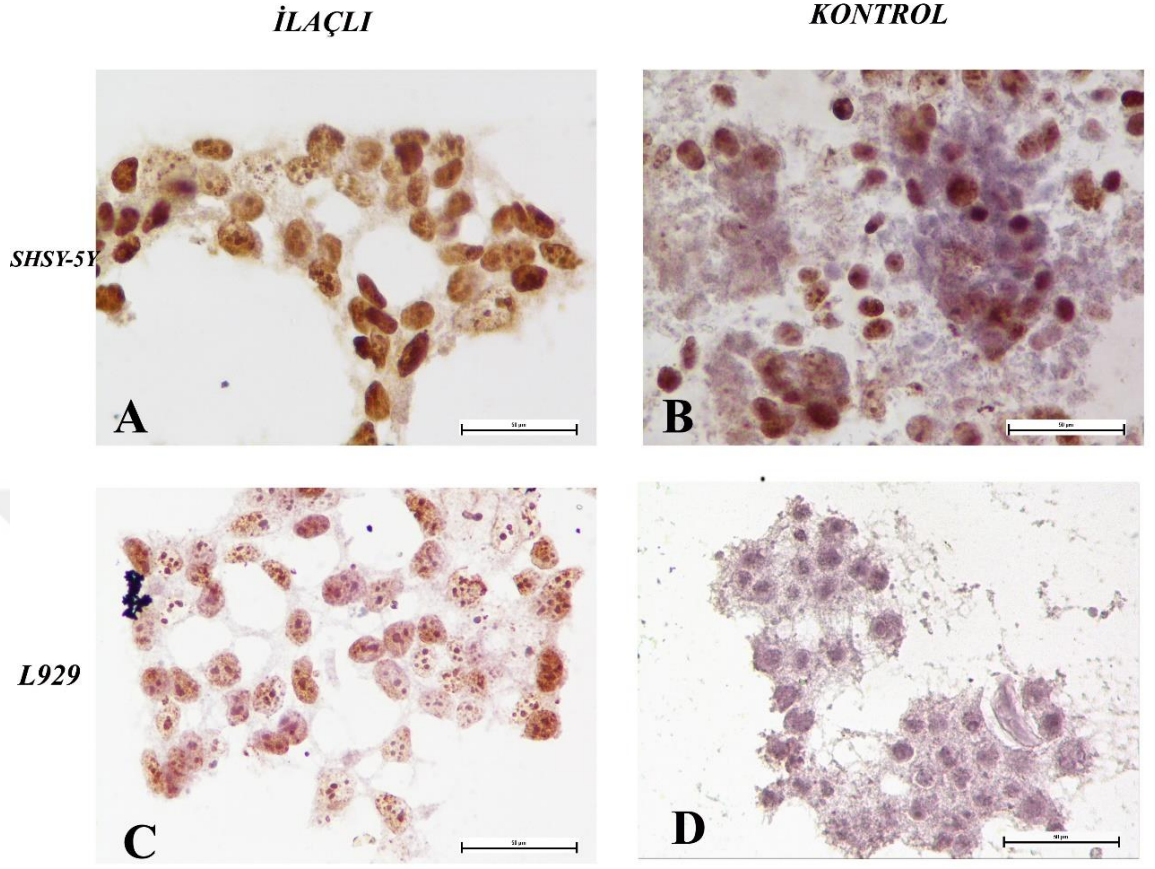
Şekil 4.8. SHSY-5Y; PERK, PKR, GCN-2 immünohistokimyasal boyama sonuçları istatistiksel analizi ($p<0.05$).

4.3. Tunel sonuçları

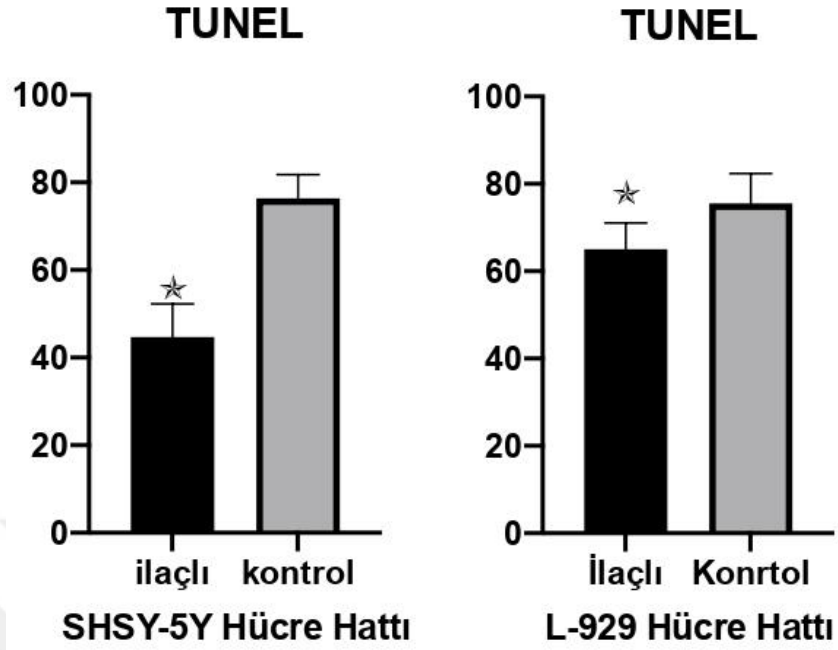
SHSY-5Y nöroblastom hücre hattı için kontrol grubunda hücrelerin canlılıkları korudukları izlendi (Şekil B). Fakat ilaç grubunda ciddi bir hücre ölümünün olduğu bunun Theranekron tarafında tetiklendiği fikri oluştu (Şekil A). Bunun anlamlı bir şekilde hücrelerde ifadesinin olduğu görüldü. L929 fibroblast hücre hattında kontrol grubunda hücrelerin canlılığını koruduğu izlendi (Şekil D). İlaç grubunda ise biraz hücre ölümünün yaşandığı görüldü (Şekil C). Burada ki hücre ölümlerinin göz ardı edilebileceği ve ilacın fibroblast hücrelerde ölümü tetikleme yolunda bir eylem gerçekleştirmediği anlamlı bir şekilde görüldü. Normal hücrelerde Theranekron'un hücreleri öldürmediği kanserli hücrelerde ölüme götürdüğünün anlamlı ifadesi bize Entegre stresi tetikleyerek yaptığını düşündürdü.



Şekil 4.9. SHSY-5Y ve L929 hücre hatlarının ilaçlı ve kontrol gruplarında görülen hücre nükleusundaki pozitif boyanma gösteren TUNEL görüntüsü. ” ⇒ “ ile gösterilenler pozitif boyanmanın yoğun görüldüğü alanlardır.” ☆ “ ile gösterilenler negatif boyanma alanlarıdır (20x).



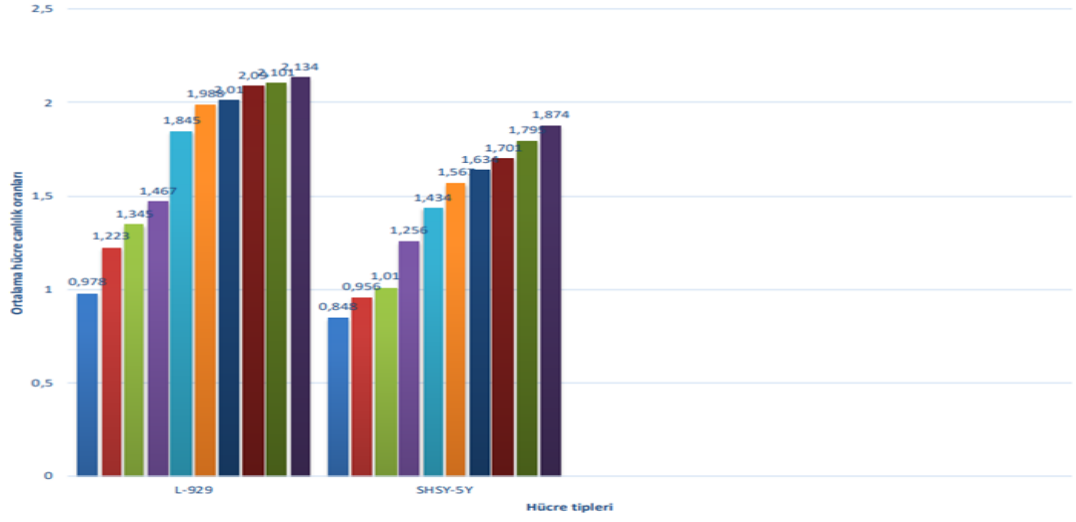
Şekil 4.10. SHSY-5Y ve L929 hücre hatlarının ilaçlı ve kontrol gruplarında görülen hücre nükleusundaki pozitif boyanma gösteren TUNEL görüntüsü.” $\Rightarrow$ “ ile gösterilenler pozitif boyanmanın yoğun görüldüğü alanlardır.” ☆ “ ile gösterilenler negatif boyanma alanlarıdır (40x).



Şekil 4.11. Shsy-5y ve L929 tunel boyamanın istatistiksel sonuçlarının grafiği ($p < 0.05$).

4.4. MTT Sonucu

L929 hücre hattı ve SHSY-5Y hücre hattı için 1/10, 1/25, 1/50, 1/75, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, 1/1000 oranlarda MTT analizi yapıldı. Bu analiz sonucunda 1/10 theranekron uygun değer olduğu istatistiksel olarak ortaya çıktı. Bu analizle birlikte % 50 hücreyi öldüren doz yani IC50 değeri 1/10 olarak bulundu. Tüm işlemlerde ilaçlı grup için bu doz kullanıldı.



Şekil 4.12. MTT Sonuç Grafiği.

(Kontrol SHSY-5Y için kuyucuk ortalama; 1,968 Kontrol L929 için kuyucuk ortalaması; 2,184).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, Theranekronun uygulanmasının kanser ve normal hücreler üzerindeki entegre stres molekülleri üzerinden apoptozun tetiklendiği ve kanser hücrelerinde stres moleküllerine bağlı olarak hücre ölümünün arttığı görüldü. PERK, PKR, GCN-2 üzerinden theranekron kanser hücreleri için entegre stresi arttırarak özellikle sitoplazma ve çekirdek etrafında boyanma yoğunluğu artmıştır. Buna bağlı olarak hücre azalması ve apoptozun tetiklenmesi kanser hücrelerinin ilaca bağlı streslerindeki aşırı artışa bağlı olarak apoptoza gittiği düşünüldü. Normal hücrelerdeki entegre stres varlığı hücre bazen koruyucu etkiler verdiği bizim çalışmamızda da kontrol grubu fibroblast hücrelerinin PERK, PKR, GCN-2 ilaca bağlı azalması bunu göstermektedir. Theranekronun inflamasyon üstünden gerçekleştirdiği tedavi ve rejenerasyon sürecine ek olarak burda kanser hücrelerinin entegre stres moleküllerini arttırarak onların ölümlerine neden olduğu görüldü. Bu ilacın bizde doku ve kültür uygulamalarında iki farklı yolağı kullanabileceğini gösterdi.

Taşpınar yaptığı bir çalışmada, nöroblastomda theranekron ve sisplatinin kombine antitümör potansiyelini değerlendirilmiştir. 100 µM Trn'nin sisplatin ile birlikte uygulanmasında yaklaşık hücre hacminde %38'e varan bir azalmaya yol açtığı görülmüş. Bizim çalışmamızda da theranekronun nöroblastoma hücre hattında korele şekilde entegre stres moleküllerini arttırarak hücreyi yakın bir yüzdede ölüme götürmüştür. Bu da bize theranekronun, sisplatinle beraber kullanımında da entegre stres yolağını da tetikleyerek daha büyük bir etki gösterebileceğini düşündürdü. Bu L929 hücre hattında theranekronun hücreleri öldürmediği ve stres moleküllerini baskılayarak sağkalımı arttırdığına da önemli bir işarettir (Taşpınar 2023).

Erzurumlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, theranekron'un antiproliferatif aktivitesini Prostat kanser hücreleri üzerindeki sinyalizasyon ve hücre döngüsü proteinlerini incelenmiştir. Theranekron tedavisinin Prostat kanser hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azalttığını ve protein sentezi baskılandığı gösterilmiştir. Özellikle AR, siklin A2, siklin B1 ve siklin E1'in protein seviyelerini azalttığı görüldü. Bunu da ER üzerinden gerçekleştiği açıklanmıştır. Bizim çalışmamızda da protein sentezini baskılayan ve bunu ER üzerinden yapan, PERK immünoreaktivitesi SHSY-5Y kanser hücrelerinde özellikle theranekron grubundaki ciddi artışı hücre döngüsündeki

siklin moleküllerinde etkileyebileceğini bize düşündürdü. Entegre stresin önemli moleküllerinden biri olan PERK'in hücre döngüsündede etkin bir molekül olabileceğini bize gösterdi (Erzurumlu ve ark., 2023).

Femur kırığı üzerinde yapılan bir çalışmada, Theranekron'un femur kırığı iyileşmesi üzerine radyolojik, biyomekanik, histopatolojik ve immünohistokimyasal etkilerini deneysel bir sıçan modelinde araştırılmıştır. Theranekron grubunun anjiyogenez, osteoblast proliferasyonu ve kemik oluşum değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti. Böylece anjiyogenez, fibrozis, osteoblast proliferasyonu, kırıkta ve kemik oluşumu gibi kemik iyileşmesiyle ilgili diğer bulguların Theranekron grubunda daha belirgin olduğu görülmüştür. Bu durum inflamasyon sürecinin Theranekron grubunda daha erken tamamlandığını ve daha hızlı kemik iyileşmesine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda ise theranekronun kanser hücresinde yani bizim ilaçlı gruplarımızda hücre ölümünü ciddi bir şekilde arttırdığını gösterdik. Tam tersi olarak L929 insan fibroblast hücrelerinde ilaçlı gruplarımızda hücre proliferasyonuna ciddi bir etki yapmadığı görüldü. Çalışmamız her ne kadar hücre kültürü çalışması dahi olsa theranekronun normal hücreler açısından kullanımında çok büyük bir yan etki olmadığı ön görülmektedir. Femur kırığı çalışmasındaki theranekronun kullanımının iyileşmeye yaptığı olumlu etki ve hücre rejenerasyonu için gerekli olduğu kanısına varılmıştır ve bizim çalışmamızdaki normal hücre sağ kalımıyla bu daha da kanıtlayıcı bir durum göstermektedir. Theranekronun inflamasyon üzerinden yaptığı bu kadar büyük etkiyle bizim çalışmamızdaki entegre stres yolağına yaptığı olumlu etkiler çok önemlidir. Bu da bize theranekronun hücredeki çeşitli yollarda da etkili olabileceğini düşündürdü (Güven 2022).

İn vivo olarak yapılan bir çalışmada ise, İnterstisyel sistitin sıçan modelinde theranekron tedavi amaçlı incelenmiş ve inflamasyonun baskılandığı fibroblast proliferasyonun arttığı ve doku iyileşmesini hızlandırdığı gözlemlendi. IL-6 ve TNF-alfa azaldığının buna bağlı olarak Üretelyal dejenerasyon, nekroz, kanama, ödemin azaldığı görüldü. Çalışmamızdaki PKR molekülü viral enfeksiyonlarda ve inflamtuarda etken bir molekül olarak görülmektedir. Özellikle ilaçlı grup yani theranekron varlığında etkisinin arttığı izlenmiştir. Bu çalışmadaki theranekronun inflamasyonu ciddi baskılması göz önüne alındığında bizdeki PKR'inde inflamasyon markırları üzerindeki etkileri önemli olarak düşünülmektedir. Kanser hücreleri ilaçlı grubundaki ciddi artışı entegre stres ve

inflamasyonun acaba ters yönlü bir çalışmasının olabileceğini bize düşündürdü. Bunu düşündürmesindeki en önemli etken inflamasyona bağlı hücre rejenerasyonunun artması entegre strese bağlı olarak hücre rejenerasyonun azalmasıdır. Tabiki PKR hem inflamatik hemde stres molekülü olarak önem arz etmektedir. Ayrıca fibroblast proliferasyonunu artırarak doku iyileşmesinin hızlanması çalışmamızdaki L929 hücre hattında olduğu gibi PKR'nin azalması hücre canlılığını theranekron üzerinden koruduğu görülmüştür (Akdağ 2023).

Saini ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, PERK'in kolorektal kanserde ferroptozisi indüklemeye önemli olduğu hatta PERK'in ferroptozis için negatif bir düzenleyicisi olduğu ve PERK'teki azalmanın kolorektal kanser hücrelerinde ferroptozise duyarlılığı arttırdığı gösterilmiştir. Çalışmamızdaki PERK'in artışı nöroblastoma kanser hücrelerinde apoptozu özellikle ilaçlı grupta arttırdığı gösterilmiştir. PERK'in azaldığı kontrol hücrelerinde az miktar apoptoz varlığı acaba buradaki hücrelerin ferroptozisi mi kullandığını bize düşündürdü ve PERK azlığına bağlı olarak hücre demir kullanımının da azaldığı söylenebilir. Entegre stres molekülü olan PERK'in ferroptozis aracılı apoptozdaki rolü hücresel stresin azaltılması yani theranekronun kullanımına bağlı olduğu düşünülmektedir (Saini ve ark., 2023).

Qiao ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, insan orofaringeal ksnser hücre hattında PERK aşırı ekspresyonu propliferasyonu aşırı şekilde arttırarak hücrelerin hızlı şekilde metastazına etki ettiği gösterilmiştir. Kanser hücrelerindeki PERK'in susturulması, radyosensitiviteyi artırdığı ve hücreleri G2/M fazında beklettiği burdan apoptoza götürdüğü anlaşıldı. PERK'in ortamdaki varlığı özellikle kanser hücreleri açısından tedaviden hücreyi kaçırmak olarak da algılanabilir. Kanser hücresi dahi olsa hücre yaşamaya kendini adapte etmek zorundadır. Bunuda en iyi entegre stres üzerinden yaptığı görülmektedir. PERK'in hem koruyucu hem de hücreyi apoptoza götürücü etkisinin olduğu görülmektedir. Bizim çalışmamızda entegre stres üzerinden theranekrona bağlı olarak koruyucu etkisi gösterilmiştir. Tabi bu demek değildir ki doza bağlı olarak bir koruyucu etki göstermesin. Normal hücrelerde ilaca bağlı sağkalımı normal etkilediği izlendi. Fakat radyasyona verdiği tepki ilaca verdiği tepkiden daha farklı olduğu görülmüştür. Belki tedavilerde radyasyon öncesi inhibe edilmesi belli bir oranda gerekirken belli bir oranada da hücre içinde kalması gerektiği bize düşündürdü. Tabi ilaç tedavisi ve radyoterapi iki farklı işlem olması dolayısıyla karşılaştırması farklı

olabilmekte fakat hücre canlılığı açısından ikisinin PERKe bağlı olması ve bizce bunun entegre strese de bağlı olduğu görülmektedir (Qiao ve ark., 2017).

Prostat kanseri dahil bir çok kanser türünde entegre stres yolağı üstünde yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde de bu yolağın özellikle prostat kanserinde aktif olduğu görülmüştür. Çalışmada Elf2α kinazın alt dallarından olan GCN-2 nin özellikle yokluğunda amino asit salınımı ve seviyelerini azaltarak hücrenin ölüme gittiği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da GCN-2' nin artmasın bağlı kanser hücrelerinin apoptoza gittiği fakat bunu theranekrona bağlı olduğu düşünmekteyiz. GCN-2 yokluğunda ortdan kalkan amino asitlerin ilaçla beraber başka bir yolla aktive olup sentezlenebileceğini GCN-2 nin artmasına bağlı olarak düşünmekteyiz. L929 normal hücrelerde stabil bir varlığı söz konusudur. Fakat ilaca bağlı olarak azalarak hücre sağkalımının sabit kalması yine ilacın ilgili amino asitleri sentezlemede yardımcı bir rol aldığı düşünülmektedir. İlaça bağlı Elf2α kinazın GCN-2 üzerinden yaptığı apoptoz entegre stresin önemli bir göstergesi olarak karşımıza özellikle kanserli hücre hattında çıkmıştır (Cordova ve ark., 2022).

Bir çalışmada, metiyonin eksikliğinin, GCN2 ve/veya PERK bağımlı bir mekanizma ile negatif meme kanseri (TNBC) hücrelerinde entegre stres yanıtını aktive ettiğini ve bu kinazlardan birinin veya her ikisinin seçici bozulmasının metiyonin kısıtlamasının terapötik etkisini artıracakını öne sürüldü. Burada, metiyonin kısıtlamasının eIF2α fosforilasyonunu artırdığını, negatif meme kanseri hücrelerinde geliştirdiğini gösterildi. Ayrıca, GCN2'nin, PERK'in veya her ikisinin yıkıcısı, metiyonin kısıtlaması ile TNBC hücrelerinin büyümesini veya apoptozunu etkilememiştir. Sonuç olarak, metiyonin kısıtlamasının TNBC hücrelerinde entegre stres yanıtını aktive ettiği GCN2- ve PERK bağımsız mekanizmalara işaret etmiştir. Ancak çalışmamızda, SHSY-5Y hücre hattında negatif meme kanseri (TNBC) hücrelerine göre yaptığımız tunel testine göre hücre ölümü izlendi. Dahası, söz konusu her iki antikorunda anlamlı şekilde ilaçlı grupta arttığı görüldü. Bu çalışmadan yola çıkarak metiyonin eksikliğinin nöroblastoma hücre hattında stres etkisine bakılabileceği ön görülmüştür (Rajanala ve ark., 2019).

Bu çalışmada, aktivin A'nın fibroblastların yapışma ve migrasyonunu nasıl düzenleyici etkilerle gösterdiğini araştırmak amaçlanmıştır. Aktivin A'nın fibroblast hücre hattı L929 hücrelerinin transwell odasında ve mikroakışkan cihazda migrasyonunu teşvik ettiğini belirlenmiştir. Aktivin A, L929 hücrelerinin yapışmasını da artırdı, ancak L929 hücrelerinin canlılığını veya proliferasyonunu etkilememiştir. Ayrıca, aktivin A SMA ifadesini ve TGF-1 salınımını indükledi; bu faktörler doku fibrozisi ile yakından ilişkilidir. Ancak IL-6 üretimi, pro-inflamatuvar bir sitokin üzerinde etkisi yoktur. Sonuç olarak, bu veriler, aktivin A'nın yeni bir kemokin olarak L929 hücrelerinin kemotaktik migrasyonunu indüklediğini ve pro-fibrosis rolü taşıdığını göstermektedir. Bizim çalışmamızda da, MTT testi hücre canlılığında L929 hücre hattında ilacın göz ardı edilebilir bir etkisi olduğu görüldü. İlacın anti-proliferatif özelliği L929 fibroblast hücre hattında bir etki göstermemiştir. Buda bize ilacın sağlıklı hücrelerde pek toksik etki bırakmayacağı görüşünü destekledi (Jiang ve ark., 2021).

Kalıtsal pulmoner venöz obstrüktif hastalık (hPVOD), otozomal resesif pulmoner hipertansiyonun şiddetli bir formudur ve GCN-2 işlev kaybına bağlıdır. GCN-2 mutasyonu taşıyan üç sıçan hattı oluşturulmuştur. Bu sıçanları, akciğerlerin moleküler ve hücresel yanıtını belgeleme ve PVOD patofizyolojisinde yer alabilecek fenotipik değişiklikleri tanımlama amacıyla amino asit yoksunluğuna tabi tutulmuştur. Tedavisi sonrasında GCN-2 / sıçan akciğerlerinde ISR aktive olmadı ve apoptoz arttı. Çalışmamızda da bizim L929 hattında GCN-2 seviyesi ilaçlı grupta azalırken, kontrol grubunda artmıştır. Yani ISR bizde töröpatik yönde çalışmamıştır. Bu yüzden L929'un tunel testinde yok denecek kadar az ölüm söz konusudur (Bignard ve ark., 2023).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, Theranekron'un nöroblastoma (SHSY-5Y) ve fibroblast (L929) hücre hatlarında Entegre Stres Yanıtı (ISR) yolağı üzerinden oluşturduğu etkileri inceleyen ilk araştırmalardan biridir. Sonuçlar, Theranekron'un özellikle kanser hücrelerinde PERK, PKR ve GCN-2 aracılı ISR sensörlerini belirgin biçimde aktive ederek immünoreaktiviteyi artırdığını göstermiştir. Bu artış, Tunel boyamaları ile de desteklenmiş olup, nöroblastoma hücrelerinde apoptoz oranlarının anlamlı derecede yükseldiği belirlenmiştir. Buna karşılık, normal fibroblast hücrelerinde immünoreaktivitenin azaldığı ve apoptozun yalnızca düşük düzeyde gözlemlendiği saptanmıştır. Bu durum, Theranekron'un tümör hücrelerine karşı seçici sitotoksik etki gösterebildiğini ve normal hücrelerde sınırlı toksisiteye yol açtığını düşündürmektedir.

Çalışmanın en önemli bulgusu, Theranekron'un kanser hücrelerinde Entegre Stres Yanıtını kuvvetle aktive ederek apoptozu tetiklemesidir. Normal hücrelerdeki minimal etki, Theranekron'un belirli dozlarda potansiyel bir antikanser ajan olabileceğini desteklemektedir. Ayrıca *Tarantula cubensis* kaynaklı yapısının, hücresel stres yolları üzerinde seçici biyolojik yanıt oluşturabilmesi, ilaç geliştirme çalışmaları için önemli bir ipucu sağlamaktadır. Bununla birlikte çalışmanın sınırlılıkları da vardır. Sadece iki hücre hattı incelenmiş olup, daha geniş hücre panellerinde doğrulayıcı deneyler yapılmalıdır. Ayrıca Western blot, qPCR ve proteomik analiz gibi ileri tekniklerle ISR aktivasyonunun ayrıntılı olarak değerlendirilmesi, Theranekron'un etki mekanizmasını daha net ortaya koyacaktır. Sonuç olarak, Theranekron nöroblastoma hücrelerinde ISR aracılı apoptozu artırırken normal fibroblastlarda belirgin toksisite göstermemiştir. Bu bulgular, Theranekron'un gelecekte kanser tedavisinde değerlendirilebilecek seçici ve özgün ajanlardan biri olabileceğini düşündürmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Abramovitch D., Cross J.V., Sacks D.B., Der C.J. (2004) 'Activation of the Rac1 GTPase by the Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase MEKK1'. *J. Biol. Chem.*, 279(37), 39173-39181.
- Akdağ, Abdullah, et al. "Effect of Intravesical Tarantula Cubensis Extract (Theranekron) on Inflammation in an Interstitial Cystitis Rat Model." *LUTS: Lower Urinary Tract Symptoms*, vol. 15, no. 2, 2023, pp. 63–67.
- Aldağ C. (2023). Deneyisel Multiple Sclerosis (MS) Modelinde Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine 4-Fenil Butirik Asitin Rejeneratif Etkinliğinin PERK Yolağı Üzerinden Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Angelin, A. et al. (2018) 'Metabolic symbiosis and immunomodulation: how tumor cell-derived lactate may disturb innate and adaptive immune responses'. *Front Immunol*, 9, 1–15.
- Artandi, S.E. & DePinho, R.A. (2009) 'Telomerase and the maintenance of telomeres in cancer'. *Nat Rev Cancer*, 9(11), 120–128.
- Bignard, Juliette, et al. "T-cell Dysregulation and Inflammatory Process in Gcn2 (Eif2ak4^{-/-})-Deficient Rats in Basal and Stress Conditions." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 324, no. 5, 2023, pp. L609–L624
- Boveri, T. (1914) 'Zur Frage der Entstehung Maligner Tumoren'. Gustav Fischer.
- Brodeur, G.M. (2003) 'Neuroblastoma: Biological insights into a clinical enigma'. *Nat Rev Cancer*, 3(3), 203–216.
- Bronner, M.E. & Simoes-Costa, M. (2016) 'The neural crest migrating into the twenty-first century'. *Curr Top Dev Biol*, 116, 115–134.
- Bussiere, Luke D., ve Cathy L. Miller. "Reovirus and the Host Integrated Stress Response: On the Frontlines of the Battle to Survive." *Viruses*, cilt. 13, sayı. 2, 2021, makale 200.
- Cari, Evelyn Llerena, et al. "Integrated Stress Response Control of Granulosa Cell Translation and Proliferation During Normal Ovarian Follicle Development." *Molecular Human Reproduction*, vol. 27, no. 8, 2021, article gaab050. Oxford University Press.
- Castro Sant'Anna, C., et al. (2018) 'Molecular biology as a tool for the treatment of cancer'. *Clin Exp Med*, 18(4), 457–464. <https://doi.org/10.1007/s10238-018-0518-1>
- Chang Y., Li X., Zhao Z., Wang J., Chen Q. (2022) 'The role of integrated stress response in lung diseases'. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 67(5), 555-565.
- Chauhan, V.P. & Jain, R.K. (2020) 'Nano-drug delivery: Is the enhanced permeability and retention (EPR) effect sufficient for curing cancer?' *Front Pharmacol*, 11, 1–9.
- Chen, J. et al. (2021) 'Lactate in the tumor microenvironment: from immune modulation to therapy'. *Front Immunol*, 12, 1–15.

- Colegio, O.R. et al. (2014) 'Functional polarization of tumor-associated macrophages by tumor-derived lactate'. *Nature*, 513(7519), 559–563.
- Corazzari M, Rapino F, Ciccocanti F, Giglio P, Antonioli M, Conti B, et al. Oncogenic BRAF induces chronic ER stress condition resulting in increased basal autophagy and apoptotic resistance of cutaneous melanoma. *Cell Death Differ* (2015) 22 (6):946–58.
- Cordova RA, Misra J, Amin PH, Klunk AJ, Damayanti NP, Carlson KR, et al. GCN2 eIF2 kinase promotes prostate cancer by maintaining amino acid homeostasis. *Elife* (2022) 11:e81083.
- Costa-Mattioli, M. & Walter, P. (2020) 'The integrated stress response: From mechanism to disease'. *Science*, 368(6489), eaat5314.
- Coşkuntan, İ. (2021). PERK ve HRI aracılı entegre stres yanıtının Behçet hastalığındaki rolü. Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Enstitüsü, İstanbul.
- Daré, Regina G., et al. "Abilities of Protocatechuic Acid and Its Alkyl Esters, Ethyl and Heptyl Protocatechuates, to Counteract UVB-Induced Oxidative Injuries and Photoaging in Fibroblasts L929 Cell Line." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 203, 2020, article 111771.
- De Gassart A., Bujisic B., Zaffalon L., Decosterd L.A., Di Micco A., Frera G., Tallant R., Martinon F. (2016) 'An inhibitor of HIV-1 protease modulates constitutive eIF2 α dephosphorylation to trigger a specific integrated stress response'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 113(2), E117–E126.
- Decock, A. et al. (2011) 'Genome-wide association study identifies variants in LMO1 associated with neuroblastoma'. *Nat Genet*, 43(6), 538–541.
- Deegan, S., Koryga, I., Glynn, S.A., Gupta, S., Gorman, A.M., ve Samali, A. (2015). 'A close connection between the PERK and IRE arms of the UPR and the transcriptional regulation of autophagy'. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 456(1), 305–311.
- Derisbourg MJ, Hartman MD, Denzel MS. Perspective: Modulating the integrated stress response to slow aging and ameliorate age-related pathology. *Nat Aging* (2021) 1(9):760–8.
- Dey, S., Sayers, C. M., Verginadis, I. I., Lehman, S. L., Cheng, Y., Cerniglia, G. J., Tuttle, S. W., Feldman, M. D., Zhang, P. J., Fuchs, S. Y., Diehl, J. A., ve Koumenis, C. (2015) 'ATF4-dependent induction of heme oxygenase 1 prevents anoikis and promotes metastasis', *Journal of Clinical Investigation*, cilt 125, sayı 7, ss. 2592–2608.
- Dolapcıoğlu, K., et al. *Theranekron for Treatment of Endometriosis in a Rat Model Compared with Medroxyprogesterone Acetate and Leuprolide Acetate. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, vol. 170, no. 1, 2013, pp. 206–210.
- Erzurumlu, Yalçın, Hatice Kübra Doğan, ve Deniz Çataklı. "Anticancer Effect of Theranekron® on Androgen-Dependent Prostate Cancer." *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 20, no. 6, 2023, pp. 368–373.

- Fetahu, I.S. & Taschner-Mandl, C. (2021) 'Genetic and epigenetic alterations in neuroblastoma'. *Mol Cancer*, 20(1), Article 4.
- Gerdes, J., et al. (1983) 'Production of a monoclonal antibody to the human proliferation-associated antigen Ki-67'. *J Immunol*, 131(4), 1778–1785.
- Gold L.T., Masson G.R. (2022) 'GCN2: roles in tumour development and progression'. *Biochem. Soc. Trans.*, 50(2), 737–745. Ye J., Kumanova M., Hart L.S., Sloane K., Zhang H., De Panis D.N., et al. (2010) 'The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation'. *EMBO J.*, 29(12), 2082–2096.
- Gupta, G.P. (2005) Neural crest-derived tumors: biology and clinical implications.
- Güven, Necip. "The Effect of Theranekron on Femur Fracture Healing in an Experimental Rat Model." *Joint Diseases and Related Surgery*, vol. 33, no. 2, 2022, pp. 374–384.
- Harding H.P., Zhang Y., Zeng H., Novoa I., Lu P.D., Calton M., Sadri N., Yun C., Popko B., Paules R., Stojdl D.F., Bell J.C., Hettmann T., Leiden J.M., Ron D. (2002) 'An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress'. *Mol. Cell*, 11(3), 619–633.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I. & Lu, P. D. (2019) 'The ribosomal P-stalk couples amino acid starvation to GCN2 activation in mammalian cells'. *eLife*, 8, e50149.
- Harley, B.A. & Kornblum, H.I. (2015) 'CD15 expression does not identify a phenotypically or genetically distinct glioblastoma population'. *Neuro Oncol*, 17(6), 830–839.
- <http://scholarworks.moreheadstate.edu> (Erişim tarihi: 26 Ağustos 2025).
- <https://bilimblogum.wordpress.com> (Erişim tarihi: 26 Ağustos 2025).
- <https://biocare.net> (Erişim tarihi: 26 Ağustos 2025).
- <https://evrimagaci.org> (Erişim tarihi: 26 Ağustos 2025).
- <https://norosirurji.dergisi.org> (Erişim tarihi: 26 Ağustos 2025).
- <https://stock.adobe.com> (Erişim tarihi: 26 Ağustos 2025).
- Jansky, S. et al. (2021) 'Single-cell transcriptomic analyses provide insights into the developmental origins of neuroblastoma'. *Nat Genet*, 53(5), 683–693.
- Jiang, Lingling, et al. "Activin A as a Novel Chemokine Induces Migration of L929 Fibroblasts by ERK Signaling in Microfluidic Devices." *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 9, article 660316, 2021.
- Kanser İstatistikleri 2017. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı.
- Kanser İstatistikleri 2017. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı.
- Kato N., Bouam I., Koshida C., Baba Y. (2018) 'Biodiversity and yield under different land-use types in orchard/vineyard landscapes: A meta-analysis'. *Biol. Conserv.*, 229, 125–133.
- Kontomanolis, E. et al. (2021) 'Genetic mutations in BRCA1 and BRCA2 genes and their role in hereditary breast and ovarian cancer'. *J Clin Oncol*, 39(15), 1679–1687.

- Kostopoulou, M. & Katsouyanni, K. (2006) 'Behavioral changes in cancer patients following diagnosis and the impact of awareness on preventive measures'. *Eur J Cancer Prev*, 15(2), 154–160.
- Lambert, A.W., Pattabiraman, D.R. & Weinberg, R.A. (2017) 'Emerging biological principles of metastasis'. *Cell*, 168(4), 670–691.
- Lee S., Park J., Kim H., Choi Y., Jung S., Lee J., et al. (2022) 'Integrated stress response remodels the microtubule-organizing center to clear unfolded proteins under proteotoxic stress'. *eLife*, 11, e77780.
- Li S., Guo L., Qian P., Zhao Y., Liu A., Ji F., Chen L., Wu X., Qian G. (2014) 'The integrated stress response in lung disease'. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 51(4), 451–457.
- Lines, Caleb L., et al. *The Integrated Stress Response in Cancer Progression: A Force for Plasticity and Resistance. Frontiers in Oncology*, vol. 13, 2023, article no.
- Lopez, A.D. et al. (2007) 'Global cancer incidence and mortality patterns in 2012 and projections to 2030: A global analysis'. *Lancet Oncol*, 12(11), 1062–1072.
- Lu, Hao-Jun, et al. "Mammalian Integrated Stress Responses in Stressed Organelles and Their Functions." *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 45, no. 1, 2024, pp. 1–13. Springer Nature.
- MacCallum, D.E. & Hall, D.P. (2000) 'Proliferation antigen Ki-67 in human tumors: Its role in cancer prognosis'. *J Pathol*, 190(2), 169–174.
- Manchester, K.L. (1995) 'Theodor Boveri and the origin of malignant tumours'. *Trends Cell Biol*, 5(10), 384–387.
- Mandula J., Dér A., Pálffy M., Kónya J., Szabó A., Szabó Z., Varga A., Varga S., Borsos B., Hegedűs B., Pálfi Z., Tóth J., Szabó I., Varga M., Varga Z., Varga G. (2022) 'The integrated stress response in ischemic diseases'. *Cell Death Differ.*, 29, 750–757.
- Manolio, T.A. et al. (2009) 'Finding the missing heritability of complex diseases'. *Nature*, 461(7265), 747–753.
- Maris, J.M. (2010) 'Recent advances in neuroblastoma'. *N Engl J Med*, 362(23), 2202–2211.
- Massagué, J. & Ganesh, K. (2021) 'Metastasis-initiating cells and ecosystems'. *Cancer Discov*, 11(4), 971–994.
- Matthay, K.K. et al. (2016) 'Neuroblastoma'. *Nat Rev Dis Primers*, 2(1), Article 16078.
- Miari, I. et al. (2023) 'The pathogenesis of cancer metastasis: The “seed and soil” hypothesis revisited'. *Haodf Online*.
- Monteiro, Lauar de Brito, et al. "M-CSF- and L929-Derived Macrophages Present Distinct Metabolic Profiles with Similar Inflammatory Outcomes." *Immunobiology*, vol. 225, no. 3, 2020, article 151935.
- Motohashi, T. & Kunisada, T. (2015) 'Neural crest-derived stem cells in adult tissues and their potential roles in tumorigenesis'. *Stem Cells Int*, 2015, Article ID 282417.
- Nair, M., Sandhu, S.S. & Sharma, A.K. (2018) 'Cancer molecular markers: A guide to cancer detection and management'. *Semin Cancer Biol*, 52, 1–8.

- Newman, S. et al. (2018) 'ALK in neuroblastoma: Biological and therapeutic implications'. *Cancers*, 10(12), Article 484.
- Nieman, K.M. et al. (2011) 'Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth'. *Nat Med*, 17(11), 1498–1503.
- Nikiforova, M.N. & Hamilton, R.L. (2011) 'Effects of epidermal growth factor receptor and phosphatase and tensin homologue gene expression on the inhibition of U87MG glioblastoma cell proliferation induced by protein kinase inhibitors'. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 39(11), 775–782.
- Özbayer, C. (2022) 'Karsinogenez' in Değirmenci, İ. (Ed.). *Kanser genetiği ve moleküler biyolojisi*. Bölüm 2. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık, ss. 29–50.
- Padovan-Merhar, O. et al. (2016) 'Single-cell analysis of human development reveals a role for Bcl11a in regulating hematopoietic stem cell fate'. *Cell*, 167(5), 1383–1396.e14.
- Pakos-Zebrücka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljubic, M., Samali, A. & Gorman, A.M. (2016) 'The integrated stress response'. *EMBO Rep*, 17(10), 1374–1395.
- Palam LR, Gore J, Craven KE, Wilson JL, Korc M. Integrated stress response is critical for gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Death Dis* (2015) 6(10):e1913.
- Ponzoni, M. et al. (2022) 'Recent advances in the developmental origin of neuroblastoma: an overview'. *J Exp Clin Cancer Res*, 41(1), 92.
- Qiao, Qiao, et al. "Endoplasmic Reticulum Stress Pathway PERK-eIF2 α Confers Radioresistance in Oropharyngeal Carcinoma by Activating NF- κ B." *Cancer Science*, vol. 108, no. 7, 2017, pp. 1421–1431. Wiley Online Library, doi:10.1111/cas.13260.
- Qiu, B. et al. (2022) 'Long-term neurological outcomes of children with neuroblastoma with opsoclonus-myoclonus syndrome'. *Transl Pediatr*, 11(3), 368–374.
- Rajanala, Sai Harisha, Rachel Ringquist, ve Vincent L. Cryns. "Methionine Restriction Activates the Integrated Stress Response in Triple-Negative Breast Cancer Cells by a GCN2- and PERK-Independent Mechanism." *American Journal of Cancer Research*, cilt. 9, sayı. 8, 2019, ss. 1766–1775. PMC.
- Sağlam Uçar, Ö. (2022) 'Tümör mikroçevresi' in Değirmenci, İ. (Ed.). *Kanser genetiği ve moleküler biyolojisi*. Bölüm 15. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık, ss. 349–360.
- Saini, Krishan Kumar, et al. "Loss of PERK Function Promotes Ferroptosis by Downregulating SLC7A11 (System Xc⁻) in Colorectal Cancer." *Cell Death & Disease*, vol. 14, no. 8, 2023, article no. 482. PMC.
- Sencar, Leman, et al. "Effects of Theranekron and Alpha-Lipoic Acid Combined Treatment on GAP-43 and Krox-20 Gene Expressions and Inflammation Markers in Peripheral Nerve Injury." *[Dergi Adı]*, vol. [cilt no.], no. [sayı no.], 2021, pp. [sayfa aralığı]. Çukurova University, Adana, Turkey.
- Shimada, H. et al. (2001) 'The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada System)'. *Cancer*, 86(2), 364–372.

- Sidrauski, C., McGeachy, A. M., Ingolia, N. T. & Walter, P. (2015) 'The small molecule ISRIB reverses the effects of eIF2 α phosphorylation on translation and stress granule assembly'. *eLife*, 4, e05033.
- Sobecki, M. et al. (2016) 'The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin'. *eLife*, 5, e13722.
- Sousa, C.M. et al. (2016) 'Pancreatic cancer cells induce adipocyte-like features in stromal cells to support tumor growth'. *Science*, 355(6332), 167–172.
- Stoica, G.E. et al. (2002) 'Anaplastic lymphoma kinase is activated through the pleiotrophin/receptor protein-tyrosine phosphatase β/ζ signaling pathway'. *J Biol Chem*, 277(7), 258–264.
- Stone, S., Ho, Y., Li, X., Jamison, S., Harding, H. P., Ron, D., ve Lin, W. (2016) 'Dual Role of the Integrated Stress Response in Medulloblastoma Tumorigenesis', *Oncotarget*, cilt 7, sayı 39, ss. 64124–64135.
- Suraweera, A., Münch, C., Hanssum, A., ve Bertolotti, A. (2012) 'Failure of amino acid homeostasis causes cell death following proteasome inhibition', *Molecular Cell*, cilt 48, sayı 2, ss. 242–253.
- Takita, J. (2021) 'PHOX2B mutations and their role in familial and sporadic neuroblastoma'. *Int J Mol Sci*, 22(5), Article 2442.
- Talmadge, J.E. & Fidler, I.J. (2010) 'AACR Centennial Series: The biology of cancer metastasis: historical perspective'. *Cancer Res*, 70(14), 5649–5669.
- Taspınar, Numan. "The Synergistic Effect of Theranekron and Cisplatin on the Neuroblastoma (SH-SY5Y) Cell Line." *Turkish Neurosurgery*, vol. 33, no. 6, 2023, pp. 1113–1119.
- Theerakittayakorn K., Bunprasert T. (2011) 'Differentiation capacity of mouse L929 fibroblastic cell line compare with human dermal fibroblast'. *Int. J. Med. Health Biomed. Bioeng. Pharm. Eng.*, 5(2), 177–184
- Thevenneau, E. & Mayor, R. (2012) 'Neural crest development and cancer: Shared regulatory mechanisms'. *Development*, 139(17), 2869–2887.
- Thonemann B., Schmalz G., Hiller K.A., Schweikl H. (2002) 'Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components'. *Dent. Mater.*, 18(4), 318–323.
- Tian X, Zhang S, Zhou L, Seyhan AA, Hernandez Borrero L, Zhang Y, et al. Targeting the integrated stress response in cancer therapy. *Front Pharmacol* (2021) 12:747837.
- Torun Karadere, Merve, et al. "The Effect of Tarantula cubensis D6 on Zone of Stasis in a Rat Burn Model." *Burns*, vol. 49, no. 2, 2023, pp. 444–454.
- Türkiye Sağlık Raporu 2012. Halk Sağlığı Uzmanları Derneği 2012; ss 1-527.
- Türkiye Sağlık Raporu 2012. Halk Sağlığı Uzmanları Derneği, ss. 1–527.
- Van Limpt, V. et al. (2005) 'Phox2B mutations and the Delta-Notch pathway in neuroblastoma'. *Cancer Lett*, 228(1-2), 59–63.
- Visser, M. & Joyce, J.A. (2023) 'Targeting stromal cell sialylation reverses T cell-mediated immunosuppression in the tumor microenvironment'. *Cell Rep*, 43(6),

111207.

- Vitale, I. et al. (2019) 'The interactions between tumor cells and the tumor microenvironment: implications for cancer therapy'. *Nat Rev Clin Oncol*, 16(12), 757–774.
- Walter P., Ron D. (2011) 'The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation'. *Science*, 334(6059), 1081–1086.
- Wang, Z. et al. (2014) 'Two co-existing germline mutations p53 V157D and PMS2 R20Q promote tumorigenesis in a familial cancer syndrome'. *Cancer Genet*, 207(1), 1–8.
- Weng D, Chen JX, Li HH, Liu F, Zhou LD, Liu HP, et al. 2-aminopurine suppresses the TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition and attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Cell Death Discov* (2018) 4:17.
- Wu, T. & Dai, Y. (2017) 'Tumor microenvironment and therapeutic response'. *Cancer Lett*, 387, 61–68.
- Yalçın G., Sarı A. (2020) 'Kainik asit tedavisi sonrası nöroblastoma hücrelerinde endoplazmik retikulum stresi belirteçleri ATF5 ve fosforile eIF2 α 'nın incelenmesi'. *Çukurova Med. J.*, 45(1), 96-101.
- Yenidünya, E. (2014). Farklı olarak kolon, karaciğer, kemik ve meme kanseri hücre hatlarında anti- kanser etkilerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.).
- Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Zeybek, Ü. (2013) 'Kanser Araştırmaları ve Deneysel Modeller'. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 3(5).
- Zhang, Y. et al. (2018) 'Adipocyte-mediated lipid metabolism reprogramming in cancer cells'. *Nat Rev Cancer*, 18(9), 563–577.

8. EKLER

8.1. İntihal Raporu

SHSY-5Y(NÖROBLASTOMA) VE L929 (FİBROBLAST) HÜCRE
HATLARINDA THERANEKRONUN ENTEGRE STRES YANITI
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İN VİTRO OLARAK İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 12	% 11	% 8	% 5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 5
2	www.frontiersin.org İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% 1
4	toad.halileksi.net İnternet Kaynağı	<% 1
5	katalog.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
7	Submitted to Istanbul Medipol Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
8	repositorio.unesp.br İnternet Kaynağı	<% 1
9	www.yyu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
10	knowledge.uchicago.edu İnternet Kaynağı	<% 1
11	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<% 1

docplayer.biz.tr

12	İnternet Kaynağı	<% 1
13	Submitted to Nevşehir Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
14	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
15	Submitted to Pace University Öğrenci Ödevi	<% 1
16	Tuna, Burçin. "Perflorododekanoik Asidin Testiste Oluşturduğu Hasara Karşı Resveratrolün Koruyucu Etkisinin Araştırılması", Dokuz Eylül Üniversitesi (Turkey), 2024 Yayın	<% 1
17	avesis.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
18	avesis.lokmanhekim.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
19	search.trdizin.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
20	Keke Yang, Jingdong Xue, Chao Feng, Wen Li. "Testicular macrophages: Sculpting male fertility through immune regulation and tissue interactions", Journal of Reproductive Immunology, 2025 Yayın	<% 1
21	accounts.public.ce.basespace.illumina.com İnternet Kaynağı	<% 1
22	avesis.usak.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
23	avesis.yyu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

24	www.repositorio.unicamp.br İnternet Kaynağı	<% 1
25	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
26	www.hindawi.com İnternet Kaynağı	<% 1
27	www.coursehero.com İnternet Kaynağı	<% 1
28	academic.oup.com İnternet Kaynağı	<% 1
29	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	<% 1
30	www.reddit.com İnternet Kaynağı	<% 1
31	Karakuyu NF, M.N. Kaya, Usta Sofu G, Sarman E. "“Healing Effect of Homeopathic Drug Theranekron in an Alkaline-induced Corneal Injury Model in Rats”", Experimental Eye Research, 2025 Yayın	<% 1
32	patents.justia.com İnternet Kaynağı	<% 1
33	Evin, Hande. "İn Vivo Nöroblastom Tümör Modelinde Sisplatin ve Lipoplatinin Sitotoksik, Nefrotoksik ve Ototoksik Etkilerinin Karşılaştırılması", Dokuz Eylul Üniversitesi (Turkey), 2024 Yayın	<% 1
34	www.adlitipbulteni.com İnternet Kaynağı	<% 1
35	www.eurasianbiochem.org İnternet Kaynağı	<% 1

36	www.atlasbiyo.net İnternet Kaynağı	<% 1
37	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<% 1
38	Submitted to Izmir Katip Äelebi Äniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
39	www.tfd.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
40	Şen, Aysel. "Glikoz ve aspartam metabolizmasının SHSY5Y nöroblastoma hücresinde karşılaştırmalı analizi", İstanbul Sabahattin Zaim University (Turkey) Yayın	<% 1
41	Submitted to Akdeniz University Öğrenci Ödevi	<% 1
42	Submitted to İstanbul Medeniyet Äniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
43	Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi	<% 1
44	Tepe, Gülpınar. "Ratlarda ortam ses ve ışık şiddetinin nörokognitif fonksiyonlar üzerine etkisi", Bezmialem Vakif University (Turkey) Yayın	<% 1
45	Submitted to University of KwaZulu-Natal Öğrenci Ödevi	<% 1
46	docs.neu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
47	pdffox.com İnternet Kaynağı	<% 1
48	abakus.inonu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

49	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
50	pure-test.amc.nl İnternet Kaynağı	<%1
51	Submitted to Kirikkale University Öğrenci Ödevi	<%1
52	Oral, Göksu. "Activation of Survival Pathways in Nutrient Restricted Colorectal Cancer Cells", Middle East Technical University (Turkey), 2024 Yayın	<%1
53	Submitted to Yakın Doğu Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
54	damassets.autodesk.net İnternet Kaynağı	<%1
55	journal.kci.go.kr İnternet Kaynağı	<%1
56	ouci.dntb.gov.ua İnternet Kaynağı	<%1
57	tr.byvdev.com İnternet Kaynağı	<%1
58	www.nature.com İnternet Kaynağı	<%1
59	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<%1
60	David T Harris, Calvin H Jan. "CRISPuRe-seq: pooled screening of barcoded ribonucleoprotein reporters reveals regulation of RNA polymerase III transcription by the integrated stress response via mTOR", Nucleic Acids Research, 2025 Yayın	<%1

61	actaoncologicturcica.com İnternet Kaynağı	<% 1
62	www.halkhemder2025.org İnternet Kaynağı	<% 1
63	www.mediasphera.ru İnternet Kaynağı	<% 1
64	Leman Sencar, Gülfidan Coşkun, Dilek Şaker, Tuğçe Sapmaz et al. "Effects of Theranekron and alpha-lipoic acid combined treatment on GAP-43 and Krox-20 gene expressions and inflammation markers in peripheral nerve injury", Ultrastructural Pathology, 2021 Yayın	<% 1
65	Robert E. Scott. "Differentiation, differentiation/gene therapy and cancer", Pharmacology & Therapeutics, 1997 Yayın	<% 1
66	static1.squarespace.com İnternet Kaynağı	<% 1
67	www.phcogres.com İnternet Kaynağı	<% 1
68	www.scilit.net İnternet Kaynağı	<% 1
69	pbs.bozok.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

Alıntıları çıkart

Kapat

Eşleşmeleri çıkar

Kapat

Bibliyografyayı Çıkart

Kapat

8.2. Akademik Özgeçmiş



8.3. Etik Kurul



