



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**TEMOZOLOMİD ve RESVERATROLÜN GLİOMA
HÜCRELERİNDEKİ STRES PROTEİNLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Elif MERTOĞLU

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Evren ÖNAY UÇAR**

Haziran, 2019

İSTANBUL

Bu çalışma, 25.06.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Evren ÖNAY UÇAR(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. A. Süha YALÇIN
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Hesna YİĞİT
Adıyaman Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 25989 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Öyle bir süreç düşünün ki, bu süreç hayatınızın bütün dönüm noktalarını yaşadığınız, olgunlaştığınız, kaybettiklerinizle ama aynı zamanda kazandıklarınızla dolu, hayatınızın belki de bu nedenlerle hiç unutamayacağınız yılları olsun. Hayatım için oldukça önem teşkil eden doktora yıllarında; bilim, benim en büyük sığınağım oldu ve bu süreç sonunda ortaya çıkan tezimin, bilime yapacağı katkılar beni mutlu edecektir.

Bende yeri apayrı olan ve bu yola baş koyduğumdan bu yana önce fahri danışmanım ve sonra doktora tez danışmanım olan Doç. Dr. Evren ÖNAY UÇAR'a, her zaman yanımda olduğu için, bana hem hoca hem abla hem arkadaş nasıl olunabiliri gösterdiği için, çıkmazda kaldığım anlarda verdiği tavsiyeleri ve yol göstericiliği için, en içten dileklerle teşekkür ederim. Lisanstaki ve doktoramın başındaki danışmanım ve uzun yıllar bölüm başkanım olarak bana her konuda destek olan, sevincimde ve üzüntümde hep yanımda olan, aynı zamanda doktora tez izleme komitemdeki değerli hocam Prof. Dr. Nazlı ARDA'ya tüm kalbimle teşekkür ederim. Doktora tez izleme komitemdeki değerli hocam Prof. Dr. A. Süha YALÇIN'a, yol göstericiliği ve sunduğu önerileri için çok teşekkür ederim.

Yoğun deney süreçlerimde, teknik sıkıntıları farkedip ortadan kaldırmaya çalışan, bana yüksek enerjisiyle moral veren bölüm başkanımız Prof. Dr. Ercan ARICAN'a çok teşekkür ederim. Doktora tezim sırasında, projesinde görev aldığım ve çalışma azmine hayran kaldığım sevgili hocam Doç. Dr. Hesna YİĞİT'e, verdiği motivasyon ve canayakınlığı için çok teşekkür ederim. Bu yolda, yardımını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ'e; bu zorlayıcı süreçte motivasyonumun düşmesine asla izin vermeyen, yaşadığım her olaya farklı bir bakış açısı kazandıran, hem ağabeyim hem hocam Tıbbi Biyolog Levent DALYAN'a çok teşekkür ederim. İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde bulunan laboratuvarının kapılarını bana açan Prof. Dr. Füsün ÖZTAY'a; deney tecrübelerini benimle paylaşan Dr. Yasemin YILDIZHAN'a; bu aşamalarda arkadaşlıklarını ve desteklerini benden esirgemeyen Arş. Gör. Merve ERÇİN'e, Ezgi KIYGA'ya; doktora sürecinde, yardımını ve güler yüzünü eksik etmeyen laboratuvar ekibimizdeki Arş. Gör. Özlem KAPLAN'a, Aslıhan ŞENGELEN'e, Elçin GÜNGÖR'e, Özge ANAÇ'a ve Alper ÇALIŞKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Yaklaşık on dört yıl önce adım attığım İstanbul Üniversitesi'nde, lisans hayatımın başlangıcından itibaren bu yolda bana destek veren, hayatıma dokunan tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Manevi desteğini hayatımın her aşamasında hissettiğim ve hissedeceğim, Sağlık Bakanlığı Müfettişi Emrah KAMALI'ya sonsuz teşekkür ederim.

En derin sevgi ve teşekkürlerim hayattaki en büyük hazinem aileme... Bu mesleği seçişimin ve bu aşamaya gelişimin asıl sebebi, eğitim hayatımın başlangıcından itibaren en büyük gayreti gösteren ve bu uğurda büyük çabalar sarfeden, doktoramın bitişini sabırsızlıkla bekleyen ama zamansız kaybettiğim babam Enver MERTOĞLU'na; babamın bıraktığı koca boşluğu hissetmemem için büyük çaba gösteren canım annem Zekiye MERTOĞLU'na, hayatımın en

vazgeçilmezleri ablam Emel MERTOĞLU'na, kardeşlerim Emre MERTOĞLU ve Esma MERTOĞLU'na bana her daim güç verdikleri ve gösterdikleri sabır için çok teşekkür ederim.

Tezimi babam Enver MERTOĞLU'nun anısına ithaf ediyorum.

Haziran, 2019

Elif MERTOĞLU



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ.....	xii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xiii
ÖZET	xvii
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	6
2.1. KANSER	6
2.2. BEYİN TÜMÖRLERİ.....	8
2.2.1. Gliomalar	8
2.2.2. Gliomalarda Görülen Mutasyonlar	11
2.2.3. U-87 MG İnsan Glioma Hücreleri.....	14
2.3. BEYİN TÜMÖRLERİNİN TEDAVİSİ	15
2.4. TEMOZOLOMİD.....	20
2.5. RESVERATROL.....	23
2.6. STRES PROTEİNLERİ VE KANSER	25
2.6.1. Stres Proteinlerinin Sınıflandırması.....	26
2.6.2. Hsp27	27
2.6.3. Hsp70.....	28
2.7. APOPTOZ VE KANSER	29
2.8. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ VE KANSER	31
2.9. GLUTATYON VE KANSER	32
2.10. DNA HASARI VE KANSER	33
2.11. PROTEİN HASARI VE KANSER	35
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	37
3.1. MALZEME VE CİHAZLAR	37
3.2. HÜCRELER VE KÜLTÜRLEME KOŞULLARI	40

3.3. U-87 MG VE HEK 293 HÜCRELERİNE AİT ÇOĞALMA EĞRİLERİNİN OLUŞTURULMASI.....	40
3.4. SİTOTOKSİSİTE ANALİZLERİ	42
3.5. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI.....	43
3.6. HÜCRELERE MADDE UYGULANMASI VE HÜCRELERİN TOPLANMASI.....	44
3.7. PROTEİN ANALİZLERİ.....	44
3.7.1. Protein İzolasyonu	44
3.7.2. Proteinlerin Konsantre Hale Getirilmesi	45
3.7.3. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	45
3.7.4. Elektroforetik Analizler	46
3.7.5. Coomassie Boyama Yöntemi	47
3.8. İMMÜNOLOJİK ANALİZLER.....	47
3.9. KASPAZ 3 AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ.....	49
3.10. HÜCRE İÇİ REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN BELİRLENMESİ	49
3.11. İNDİRGENMİŞ GLUTATYON (GSH) İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ.....	50
3.12. COMET ANALİZİ İLE DNA HASARININ BELİRLENMESİ	50
3.13. PROTEİN KARBONİLLERİNİN BELİRLENMESİ.....	52
3.14. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	53
4. BULGULAR.....	54
4.1. U-87 MG VE HEK 293 HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA EĞRİLERİ	54
4.2. SİTOTOKSİSİTE ANALİZLERİ	55
4.2.1. Farklı Maddelerin U-87 MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkileri.....	55
4.2.2. Farklı Maddelerin HEK 293 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkileri	58
4.2.3. Kombine Madde Uygulamalarının U-87 MG ve HEK 293 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkileri	59
4.3. PROTEİN ÖRNEKLERİNİN KONSANTRASYONLARI.....	60
4.4. ELEKTROFORETİK ANALİZ SONUÇLARI	61
4.5. İMMÜNOLOJİK ANALİZ SONUÇLARI	62
4.5.1. Temozolomid ve Resveratrol Uygulamasına Ait İmmünolojik Analiz Sonuçları.....	62
4.5.2. Kombine Terapi Uygulamasına Ait İmmünolojik Analiz Sonuçları.....	64
4.6. KASPAZ 3 AKTİVİTESİ SONUÇLARI.....	67
4.7. HÜCRE İÇİ REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ	68
4.8. İNDİRGENMİŞ GLUTATYON İÇERİĞİ.....	69
4.9. DNA HASARI.....	71

4.10. PROTEİN KARBONİLLERİ	73
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	76
KAYNAKLAR.....	83
ÖZGEÇMİŞ.....	98



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Malignant primer beyin ve merkezi sinir sistemi tümörlerinin dağılımı	9
Şekil 2.2: A. Glioma kök hücre kaynaklı; B. Epigenetik kaynaklı primer ve sekonder GBM gelişimi	13
Şekil 2.3: Glioblastomada tümör direncinin üstesinden gelebilmek amacıyla uygulanan farklı tedavi stratejileri	17
Şekil 2.4: Temozolomidin kimyasal yapısı	21
Şekil 2.5: İnsan glioma hücrelerinde temozolomidle indüklenen DNA onarım sistemlerinde Hsp27'nin rolü	22
Şekil 2.6: Resveratrolün kimyasal yapısı	23
Şekil 2.7: Resveratrolün biyolojik etkileri	24
Şekil 2.8: HSP'lerin düzenleyici fonksiyonu ve apoptozla ilişkisi	30
Şekil 2.9: Prooksidanlar ile antioksidanlar arasındaki denge.....	31
Şekil 2.10: ROT oluşumunda rol oynayan bazı aktivatör ve inhibitörler	32
Şekil 3.1: Başlangıç hücre sayısı 1×10^5 hücre/ml olan HEK 293 (A) ile 0.5×10^5 hücre/ml olan U-87 MG (B) hücrelerine ait 2 günlük kültürlerin invert mikroskop altındaki görüntüleri (100X).....	41
Şekil 4.1: Başlangıç hücre sayıları 0.5×10^5 hücre/ml ve 1×10^5 hücre/ml olan U-87 MG insan glioma hücrelerine ait çoğalma eğrileri (n=5)	54
Şekil 4.2: Başlangıç sayıları 0.5×10^5 hücre/ml ve 1×10^5 hücre/ml olan HEK 293 insan embriyonik böbrek hücrelerine ait çoğalma eğrileri (n=4)	55
Şekil 4.3: 24, 48 ve 72 saatlik TMZ uygulamasının U-87 MG hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri (n=6) (Her bir uygulama için elde edilen R^2 değerleri sırasıyla 0.923, 0.915 ve 0.922'dir)	56
Şekil 4.4: 24, 48 ve 72 saatlik RSV uygulamasının U-87 MG hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri (n=6) (Her bir uygulama için elde edilen R^2 değerleri sırasıyla 0.947, 0.951 ve 0.958'dir)	57
Şekil 4.5: 48 saatlik TMZ uygulamasının HEK 293 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi (n=5)	58

Şekil 4.6: 48 saatlik RSV uygulamasının HEK 293 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi ($R^2=0.975$) (n=5).....	59
Şekil 4.7: Farklı konsantrasyonda TMZ ve RSV'nin birlikte ve ayrı ayrı U-87 MG hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$) (n=3) (TMZ ve RSV dozları μM olarak uygulanmıştır).....	60
Şekil 4.8: Sığır serum albumini (BSA) standartları (25, 125, 250, 500, 100, 1500, 2000 $\mu\text{g/ml}$) kullanılarak oluşturulan standart grafik ($R^2=0.997$).....	61
Şekil 4.9: Coomassie boyama yöntemine göre boyanmış örnek bir jel görüntüsü	62
Şekil 4.10: Farklı konsantrasyonda TMZ uygulanan U-87 MG hücrelerindeki Hsp27 ve GAPDH proteinlerinin anlatım seviyeleri (* $p<0.05$) (n=3) (Kontrol veya deney gruplarında Hsp70 anlatımı görülmediğinden grafikte sonuçları verilmedi) (Şekilde görülen anlatım değişimi, kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplandı).....	63
Şekil 4.11: Farklı konsantrasyonda RSV uygulanan U-87 MG hücrelerindeki Hsp27 ve GAPDH proteinlerinin anlatım seviyeleri (* $p<0.05$) (n=3) (Kontrol veya deney gruplarında Hsp70 anlatımı görülmediğinden grafikte sonuçları verilmedi) (Şekilde görülen anlatım değişimi, kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplandı).....	63
Şekil 4.12: 50 μM TMZ ve/veya 5 μM RSV'nin ısı şoku uygulanmış ve uygulanmamış U-87 MG hücrelerindeki Hsp27 ve GAPDH proteinlerinin anlatımlarına etkileri (* $p<0.05$) (n=3) (Şekilde görülen anlatım değişimi, kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplandı).....	64
Şekil 4.13: 50 μM TMZ ve/veya 5 μM RSV'nin ısı şoku uygulanan U-87 MG hücrelerindeki Hsp70 ve GAPDH proteinlerinin anlatımlarına etkileri (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$) (n=3) (Isı şoku uygulanmayan gruplarda Hsp70 anlatımı saptanmadığından grafikte sonuçları verilmedi) (Şekilde görülen anlatım değişimi, kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplandı).....	65
Şekil 4.14: 50 μM TMZ ve/veya 5 μM RSV'nin ısı şoku uygulanmış ve uygulanmamış HEK 293 hücrelerindeki Hsp27 ve GAPDH proteinlerinin anlatımlarına etkileri (* $p<0.05$, ** $p<0.01$) (n=3) (Şekilde görülen anlatım değişimi, kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplandı).....	66
Şekil 4.15: 50 μM TMZ ve/veya 5 μM RSV'nin ısı şoku uygulanmış ve uygulanmamış HEK 293 hücrelerindeki Hsp70 ve GAPDH proteinlerinin anlatımlarına etkileri (n=3) (Şekilde görülen anlatım değişimi, kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplandı).....	66
Şekil 4.16: pNA standartları (3.9, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000 μM) ile oluşturulan standart grafik ($R^2=1$).....	67
Şekil 4.17: 50 μM TMZ ve/veya 5 μM RSV uygulamasının U-87 MG hücrelerindeki kaspaz 3 enzim aktivitesine etkileri (* $p<0.05$) (n=3).....	68
Şekil 4.18: 50 μM TMZ ve/veya 5 μM RSV uygulamasının HEK 293 hücrelerindeki kaspaz 3 enzim aktivitesine etkileri (* $p<0.05$, ** $p<0.01$) (n=3).....	68

Şekil 4.19: 50 µM TMZ ve/veya 5 µM RSV uygulamasının U-87 MG hücrelerindeki reaktif oksijen türleri üzerine etkileri (**p<0.01) (n=12)	69
Şekil 4.20: 50 µM TMZ ve/veya 5 µM RSV uygulamasının HEK 293 hücrelerindeki reaktif oksijen türleri üzerine etkileri (**p<0.01) (n=12)	69
Şekil 4.21: İndirgenmiş glutatyon kullanılarak oluşturulan standart grafik (R ² =0.997).....	70
Şekil 4.22: 50 µM TMZ ve/veya 5 µM RSV uygulamasının U-87 MG hücrelerindeki indirgenmiş glutatyon seviyesi üzerine etkileri (n=12).....	70
Şekil 4.23: 50 µM TMZ ve/veya 5 µM RSV uygulamasının HEK 293 hücrelerindeki indirgenmiş glutatyon seviyesi üzerine etkileri (n=12).....	71
Şekil 4.24: Comet analizi sonucunda U-87 MG ve HEK 293 hücrelerine ait floresan mikroskop görüntüleri	72
Şekil 4.25: 50 µM TMZ ve/veya 5 µM RSV uygulamasının U-87 MG hücrelerinde DNA kırığı oluşumuna etkileri (****p<0.0001) (n>100)	73
Şekil 4.26: 50 µM TMZ ve/veya 5 µM RSV uygulamasının HEK 293 hücrelerinde DNA kırığı oluşumuna etkileri (****p<0.0001) (n>100).....	73
Şekil 4.27: 50 µM TMZ ve/veya 5 µM RSV uygulamasının U-87 MG hücrelerinde protein karbonil oluşumu üzerindeki etkileri (*p<0.05, **p<0.01) (n=9) (Şekilde görülen anlatım değişimi, kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplandı).....	74
Şekil 4.28: 50 µM TMZ ve/veya 5 µM RSV uygulamasının HEK 293 hücrelerinde protein karbonil oluşumu üzerindeki etkileri (n=9) (Şekilde görülen anlatım değişimi, kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplandı).....	75

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: 2019 Kanseri istatistiklerine göre, erkeklerde ve kadınlarda en çok görülen kanser vakaları ve kanser ölümlerine ait veriler	7
Tablo 2.2: Gliomaların Dünya Sağlık Örgütü'ne göre sınıflandırılması	11
Tablo 2.3: Beyin tümöründe kullanılan (A) FDA onaylı ilaçlar ve (B) ilaç kombinasyonları	18
Tablo 2.4: Isı şoku proteinlerinin fonksiyonları ve hücre içi lokasyonları	27
Tablo 2.5: DNA hasarlarının onarımında iş gören farklı DNA onarım sistemleri	34
Tablo 3.1: Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve ticari kitler	37
Tablo 3.2: Tez çalışmasında kullanılan cihazlar	39
Tablo 3.3: Oluşturulan deney grupları ve kodları	44
Tablo 3.4: SDS-PAGE için kullanılan solüsyonlar ve içerikleri	46
Tablo 3.5: SDS-PAGE yöntemine göre 4 adet mini jel hazırlamak için kullanılan solüsyonlar ve miktarları	47
Tablo 3.6: Coomassie boyama yönteminde kullanılan çözeltiler ve içerikleri	47
Tablo 3.7: İmmünojenik analizlerde kullanılan tamponlar ve içerikleri	48
Tablo 3.8: İmmünojenik analizlerde kullanılan antikorlar ve özellikleri	49
Tablo 3.9: İndirgenmiş glutatyon içeriğinin belirlenmesinde kullanılan solüsyonlar	50
Tablo 3.10: Comet analizi için oluşturulan deney grupları ve kodları	51
Tablo 3.11: Comet analizinde kullanılan tamponlar ve içerikleri	51
Tablo 4.1: U-87 MG insan glioma hücrelerine farklı sürelerde uygulanan madde/ajanların IC ₅₀ değerleri	58

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

°C	: Derece Santigrat
%	: Yüzde
>	: Büyük
<	: Küçük
β	: Beta
γ	: Gama
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
g	: Gram
kDa	: Kilo Dalton
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
V	: Volt

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

ALDH	: Aldehit Dehidrogenaz (“Aldehyde dehydrogenase”)
AMPK	: 5' Adenozin Monofosfat - Aktive Edici Protein Kinaz (“5' Adenosine Monophosphate - Activated Protein Kinase”)
APS	: Amonyum persülfat (“Ammonium persulfate”)
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Eden Faktör 1 (“Apoptotic Protease Activating Factor 1”)
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (“American Type Culture Collection”)
BCA	: Bikinkoninik Asit (“Bicinchoninic Acid”)
BER	: Baz Kesip Çıkarma Onarımı (“Base Excision Repair”)
BiCNU	: 1,3-Bis(2-Kloroetil)-1-Nitrozüre, Karmustin (“Carmustine”)
BSA	: Sığır Serum Albumini (“Bovine Serum Albumin”)
CCNU	: 1-(2-Kloroetil)-3-Sikloheksil-1-Nitrozüre, Lomustin (“Lomustine”)

CM-H₂DCFDA	: 5-(-6)-klorometil-2',7'-diklorodihidro-floresin diasetat ("5-(-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate")
DCFDA	: 2',7'-Diklorofloresin Diasetat ("2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate")
DMEM	: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri ("Dulbecco's Modified Eagle's Medium")
DMSO	: Dimetil Sülfoksit ("Dimethyl Sulfoxide")
DNPH	: 2,4-Dinitrofenilhidrazin ("2,4-dinitrophenylhydrazine")
DTNB	: 5-5'-Ditiobis-(2-Nitrobenzoik Asit) ("5-5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic acid)")
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit ("Ethylenediaminetetraacetic acid")
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü ("Epidermal Growth Factor Receptor")
EMS	: Etil Metansülfonat ("Ethyl Methansulfonate")
ER	: Endoplazmik Retikulum
FBS	: Fetal Sığır Serumı ("Fetal Bovine Serum")
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi ("U.S. Food and Drug Administration")
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü ("Fibroblast Growth Factor")
GAPDH	: Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz ("Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase")
GBM	: Glioblastoma Multiforme
GSH	: İndirgenmiş Glutatyon ("Reduced Glutathione")
GSSG	: Oksitlenmiş Glutatyon ("Oxidized Glutathione")
GIC	: Glioma Başlatıcı Hücreler ("Glioma Initiating Cells")
GSC	: Glioma Kök Hücreleri ("Glioma Stem Cells")
GTR	: Brüt Total Rezeksiyon ("Gross Total Resection")
HBSS	: Dengelenmiş Tuz Solüsyonu ("Hank's balanced salt solution")
HEK 293	: İnsan Embriyonik Böbrek Hücresi ("Human Embryonic Kidney Cell")
HPLC	: Yüksek Performanlı Sıvı Kromatografisi ("High Pressure Liquid Chromatography")
HR	: Homolog Rekombinasyon ("Homologous Recombination")
HRP	: Yaban Turpu Peroksidazı ("Horseradish Peroxidase")
HSE	: Isı Şoku Elementi ("Heat Shock Elements")
HSF	: Isı Şoku Faktörü ("Heat Shock Factors")
HSP	: Isı Şoku Proteini ("Heat Shock Protein")
HSR	: Isı Şoku Cevabı ("Heat Shock"Response)
IC₅₀	: %50 İnhibisyona Neden Olan Konsantrasyon ("The Half Maximal Inhibitory Concentration")

ICL	: Zincirler Arası Çapraz Bağ Onarımı (“Interstand Cross-Link Repair”)
IDH	: İzositrat Dehidrojenaz (“Isocitrate dehydrogenase”)
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (“Insulin-Like Growth Factor”)
MGMT	: O ⁶ -Metilguanin DNA Metiltransferaz (“O ⁶ -Methylguanine DNA methyltransferase”)
MMR	: Yanlış Eşleşme Onarımı (“Mismatch Repair”)
mTOR	: Rapamisin’in memeli hedefi (“Mammalian target of rapamycin”)
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür (“3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide”)
Na₂EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit Disodyum Tuzu (“Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate”)
NaCl	: Sodyum Klorür (“Sodium Chloride”)
NaOH	: Sodyum Hidroksit (“Sodium Hydroxide”)
NEAA	: Esansiyel Olmayan Amino Asitler (“Non-Essential Amino Acids”)
NER	: Nükleotid Kesip Çıkarma Onarımı (“Nucleotide Excision Repair”)
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B (“Nuclear Factor Kappa B”)
NIH	: Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (“National Institutes of Health”)
NHEJ	: Homolog Olmayan Uç Birleştirme (“Non-Homologous End Joining”)
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz (“Nitric Oxide Synthase”)
OS	: Ortalama Sağkalım (“Overall Survival”)
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (“Polyacrylamide Gel Electrophoresis”)
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (“Phosphate Buffered Saline”)
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (“Platelet-Derived Growth Factor”)
PFS	: Progresyonsuz Sağkalım (“Progression-Free Survival”)
PMSF	: Fenilmetilsülfonil Florür (“Phenylmethylsulfonyl Fluoride”)
PPAR	: Peroksizom Proliferatör-Aktive Edici Reseptörü (“Peroxisome Proliferator-Activated Receptor”)
pTEN	: Fosfataz ve Tensin Homoloğu (“Phosphatase and tensin homolog”)
PVDF	: Poliviniliden Diflorür (“Polyvinylidene Difluoride”)
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri (“Reactive Oxygen Species”)
RSV	: Resveratrol
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat (“Sodium Dodecyl Sulfate”)
SLS	: Sodyum Lauril Sarkozinat (“N-Lauryl Sarcosine Sodium Salt”)
sHSP	: Küçük Isı Şoku Proteinleri (“Small Heat Shock Proteins”)
SSBR	: Tek Zincir Kırığı Onarımı (“Single Strand Break Repair”)
TAA	: Tümör-İlişkili Antijenler (“Tumor-Associated Antigens”)

TBST	: Tween 20 içeren Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi (“Tris Buffered Saline with Tween 20”)
TCGA	: Kanser Genom Atlası (“The Cancer Genome Atlas”)
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (“Tetramethylethylenediamine”)
TMZ	: Temozolomid (“Temozolomide”)
TP53	: Tümör Protein 53
TSC	: Tüberoskleroz Kompleksi (“Tuberous Sclerosis Complex”)
U-87 MG	: Uppsala 87 Malignant Glioma
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (“Vascular Endothelial Growth Factor”)
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (“World Health Organization”)

ÖZET

DOKTORA TEZİ

TEMOZOLOMİD ve RESVERATROLÜN GLİOMA HÜCRELERİNDEKİ STRES PROTEİNLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Elif MERTOĞLU

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Evren ÖNAY UÇAR

Kanser, insan ölümlerine yol açan hastalıklar arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Kanser araştırmalarında tümörlerin oluşumuna ait moleküler mekanizmaların anlaşılması açısından *in vitro* çalışmalar oldukça önemlidir. Beyin kanserleri toplumda az görülen tümörler arasında olmasına rağmen, glioblastoma en sık görülen ve agresif malignant bir beyin tümörüdür. Bu tümör tipleri kemoterapiye karşı oldukça dirençlidir ve hastaların ortalama yaşam süresi, tanıdan sonra en fazla 16 aydır.

Stres proteinlerinin (Isı Şoku Proteinleri, HSP) birçok kanser türünde anlatımının arttığı ve kanser tedavisinde kullanılabilecek uygun biyobelirteçler olduğu bilinmektedir. HSP'ler, kanserli hücrenin çoğalması, farklılaşması, yayılması ve ölümü ile yakından ilişkilidir. Ayrıca son yıllarda yayınlanan makalelerde, ısı şoku proteinlerinin kanserde kullanılan bazı ilaçlara karşı oluşan direnç mekanizmasında da rol aldığı saptanmıştır. Bu proteinlerin beyin tümörlerinde de aşırı anlatım yapması, onları önemli hedefler haline getirmiştir. Bu amaçla, kanser tedavisinde kullanılabilecek HSP inhibitörlerinin geliştirilmesi önemli hale gelmiştir.

Alkilleyici bir ajan olan temozolomid, glioblastoma tedavisinde kullanılan bir kemoterapi ilacıdır. Beyin tümörü hastalarında yaygın olarak kullanılmasına rağmen, glioblastomanın bu ilaca karşı direnci nedeniyle terapötik etkisi çok sınırlıdır. Doğal bir polifenolik molekül olan resveratrol, antikarsinojenik potansiyele sahiptir ve kanseri önlemede etkili bir bileşiktir. Son

yıllarda, doğal bileşikler ile kimyasal ilaçların birlikte kullanıldığı kombine tedavi yöntemlerinin ilaç etkinliğine yönelik olumlu sonuçlar verdiği çalışmalar bulunmaktadır.

Bu tez kapsamında, resveratrolün temozolomid ile birlikte kullanımı sonucunda glioblastoma hücrelerinin tedaviye duyarlılığının arttırabileceği hipotezi öne sürülerek, U-87 MG insan glioma hücrelerine uygulanan temozolomid ve resveratrolün moleküler etki mekanizmalarının araştırılması amaçlandı. Yapılan kombine uygulamaların etkinliğini değerlendirmek amacıyla hücre, protein ve DNA düzeyinde *in vitro* deneyler (sitotoksik, immünolojik, apoptotik ve Comet analizleri ile birlikte hücre içi reaktif oksijen türü, indirgenmiş glutatyon ve protein karbonil düzeyi belirleme çalışmaları) gerçekleştirildi. Bu kapsamlı deneyler sonunda, resveratrolün temozolomid ile kombine şekilde uygulanmasının glioma hücrelerinde HSP'leri baskıladığı ve apoptozu indüklediği gösterildi. Aynı kombinasyon, oksidatif stresin bir göstergesi olarak hücre içi reaktif oksijen türlerinde ve DNA kırıklarında anlamlı bir artışa neden oldu, ancak protein karbonillerinde ve glutatyon düzeylerinde kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmadı. Sonuç olarak temozolomid ile birlikte uygulanan resveratrol glioma hücrelerinde ilaç etkinliğini arttırdı. Kontrol hücresi olarak kullanılan HEK 293 hücrelerinde ise olumsuz bir etkiyle karşılaşılmadı. Tez kapsamında elde edilen bulgular, TMZ ve RSV kombine tedavi stratejisinin glioma hastalarında daha etkili olabileceğini gösterdi.

Haziran 2019, 119 sayfa.

Anahtar kelimeler: Temozolomid, resveratrol, glioma, stres proteinleri, kombine terapi

SUMMARY

Ph.D. THESIS

THE EFFECTS OF TEMOZOLOMIDE AND RESVERATROL ON STRESS PROTEINS IN GLIOMA CELLS

Elif MERTOĞLU

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR

Cancer is one of the leading diseases that cause human death. *In vitro* studies are very important to understand the molecular mechanisms of tumor formation in cancer research. Even though brain tumor is a quite rare in the population, glioblastoma is the most common and aggressive malignant brain tumor. These types of tumors are highly resistant to chemotherapy and the average life expectancy is up to 16 months after diagnosis.

Expression of stress proteins (Heat Shock Proteins, HSP) are known to increase in many types of cancer and they are suitable biomarkers for the treatment of cancer. Heat shock proteins are closely associated with cancer cell proliferation, differentiation, metastasis and death. In addition, in recent articles, it was found that heat shock proteins play a role in the mechanism of resistance to certain drugs used in cancer. Overexpression of these proteins in brain tumors has made them major anticancer targets. For this purpose, the development of HSP inhibitors that can be used in cancer treatment has become important.

Temozolomide, an alkylating agent, is a chemotherapy drug used to treat glioblastoma. Although it is widely used in patients with brain tumor, because of the resistance of glioblastoma to this drug, its therapeutic effect is very limited. Resveratrol, a natural

polyphenolic molecule, has anticarcinogenic potential and is a potent compound to prevent cancer. In recent years, there have been studies that combined treatment methods using natural compounds and chemical drugs show significantly improved results for drug efficacy.

In this thesis, it was aimed to investigate the molecular mechanisms of temozolomide and resveratrol applied to U-87 MG human glioma cells by suggesting hypothesis that resveratrol may increase the sensitivity of glioblastoma cells to treatment with temozolomide. In order to evaluate the effectiveness of the combined applications, *in vitro* experiments were performed at the cell, protein and DNA levels (cytotoxic, immunological apoptotic and Comet analyzes, as well as the determination studies of intracellular reactive oxygen species, reduced glutathione and protein carbonyl levels). At the end of these comprehensive experiments, it was shown that the combined therapy of resveratrol with temozolomide suppressed HSPs and induced apoptosis in glioma cells. The same combination caused a significant increase in DNA breaks and intracellular reactive oxygen species as an indicator of oxidative stress, but no statistically significant change in protein carbonyls and glutathione levels compared to control. In conclusion, resveratrol combined with temozolomide increased drug efficacy in glioma cells. There was no negative effects in HEK 293 cells used as control cells. The findings of the thesis showed that TMZ and RSV combined treatment strategy for glioma patients may be more effective.

June 2019, 119 pages.

Keywords: Temozolomide, resveratrol, glioma, stress proteins, combined therapy

1. GİRİŞ

Ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alan kanser tüm dünyada oldukça önemli bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir. Kontrolsüz hücre bölünmesi olarak bilinen kanser, farklı organ ve dokularda görülmektedir. Bulunduğu organ veya dokuya spesifik olarak isimlendirilmiş çok sayıda kanser tipi benign veya malign olarak literatürde yer almaktadır. Beyin ve diğer sinir sistemi tümörleri, diğer kanser türleri kadar fazla görülmemekle birlikte; ölüm oranları sıralamasında, özellikle çocuklarda ve gençlerde ilk sıralarda yer almaktadır. Beyin tümörlerinin yaklaşık %27'sini oluşturan gliomaların bir çeşidi olan glioblastoma multiforme (GBM), yüksek oranda proliferasyon gösteren en yayılımcı solid kanserlerden ve en sık görülen primer beyin tümörlerinden biridir. Bu tümörler kemoterapiye büyük ölçüde direnç göstermekte ve ortalama yaşam süresi teşhisi takiben 16 ayı geçmemektedir. Tedaviye karşı gelişen direnç sebebiyle oldukça invaziv ve ölümcüldürler. Beyin kanseri hastalarında cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve kemoterapi gibi standart tedavi yöntemleri hastalığın ilerlemesini ertelleyerek sağkalım avantajı sağlamakta, ancak kısa bir süre sonra hastalığın tekrar nüks etmesi nedeni ile ölümle sonuçlanmaktadır (Stupp ve diğ., 2005). GBM normal beyin parankimasına sızma yeteneğinden dolayı, kötü prognozlarla da ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle birçok tedavi yaklaşımı denenmesine rağmen, hayatta kalma açısından büyük bir ilerleme kaydedilememiştir (Louis ve diğ., 2001).

Beyin tümörü tedavisinde kullanılan önemli kemoterapötik ilaçlardan biri olan temozolomid (TMZ), alkilleyici bir ajandır ve bazı miyelotoksik etkileriyle birlikte kan-beyin bariyerini etkin bir şekilde geçebilmektedir (Uzzaman ve diğ., 2007). Bununla birlikte, TMZ'ye karşı hücrede gelişen tümör direnci yaygın görülen bir olaydır. Özellikle TMZ'nin O⁶-metilguanin DNA metiltransferaz (MGMT) enzim seviyesini arttırması ve yanlış eşleşme onarımındaki eksiklikler, kanser hastalarındaki klinik yanıt oranını güçlü bir şekilde etkilemektedir (Yuan ve diğ., 2012). TMZ'nin etkinliğini arttırmak ve hücrede ilaca karşı oluşan direnci azaltmak için, diğer ajanlarla birlikte kullanımını içeren farklı stratejiler araştırmacılar tarafından uygulanmaktadır (Huang ve diğ., 2012; Jakubowicz-Gil ve diğ., 2013; Chen ve diğ., 2015). Bu bağlamda kanser tedavisinde yardımcı olarak kullanılan doğal bileşikler, GBM tedavisinde TMZ ile birlikte kullanılmaya uygun önemli adaylar arasında kabul edilmektedir.

TMZ uygulaması, glioma hücrelerinin DNA'ları üzerinde O⁶-metilguaninin lezyonlarının oluşumuna ve buna bağlı olarak hücre siklusunun G2\M fazında tutuklanmasına neden olmaktadır. Bu durum hücre ölümünü indüklemektedir. MGMT gen promotöründeki metilasyonunun ve MGMT anlatım seviyesinin temozolomide karşı kemosensivitede rol oynadığı düşünülmektedir. Onarım enzimi olan MGMT'nin inaktivasyonu kanser tedavisini yönlendirmek amacıyla kullanılmaktadır. MGMT anlatım düzeyinin glioma hücrelerinde yaş, cinsiyet ve tümör büyüklüğünden bağımsız olarak arttığı ve bu enzimin inaktivasyonunun tedavide kullanılan alkilleyici ajanların etkili olmasında rol oynadığı gösterilmiştir (Esteller ve diğ., 2000; Riemenschneider ve diğ., 2010). TMZ gibi metilasyon ajanlarının kullanımı sonrasında hücre DNA'sında oluşan metillenme, MGMT tarafından onarılır. Hücrelerdeki MGMT eksikliğinde, O⁶-metilguanin tamir edilemez ve bir sonraki replikasyonda tamamlayıcı olarak timin bazını karşısına alır. Bu durumda yanlış eşleşme onarım mekanizmasına ("Mismatch Repair", MMR) sahip tümör hücreleri timin bazını kaldırarak onarımı gerçekleştirmeye çalışır, ancak daha sonra bir timin bakiyesi tekrar bu bölgeye yerleşir. Onarımın yapılamadığı durumlarda, hücrede çift zincir DNA kırıkları oluşabilir ve böylece apoptoz yolağı tetiklenebilir. Tümör hücrelerinin etkin tedavisinde, önce işlevsel bir MMR sistemi ve ikinci olarak fonksiyonel bir p53 proteini gerekmektedir. Bu bileşenlerden herhangi birinden yoksun olan hücreler, alkilleyici ilaçlara karşı azalmakta olan bir duyarlılık göstererek bölünmeye devam ederler (Günther ve diğ., 2003). Bununla birlikte tümör hücreleri ilaç tedavisi ile başa çıkabilecek farklı mekanizmalara sahiptir. Örneğin, aldehid dehidrogenaz (ALDH) enzimi ile TMZ direnci arasındaki ilişkiler araştırılmaktadır. Antikanser tedaviye karşı direnci olumsuz yönde etkileyen diğer moleküler mekanizmaların tanımlanması, farklı tedavi stratejilerine (kişisel tedavi, kombine tedavi, gen tedavi uygulamaları vs.) yönelik bir adım olarak gerekli görülmektedir (Castro ve diğ., 2015).

Doğal bir polifenolik bileşik olan ve birçok gıdanın içeriğinde yer alan resveratrol, özellikle üzümde, fıstıkta ve kırmızı şarapta fazla miktarda bulunmaktadır (Gagliano ve diğ., 2005). Düşük toksisiteye sahip olması, insanlarda yan etkileri olmaksızın nispeten yüksek dozlarda kullanılmasını mümkün kılmaktadır. Bununla birlikte resveratrolün antioksidan ve antimutajen olarak rol oynayabildiği, antiinflamatuvar etkilere aracılık ettiği, siklooksijenaz ve hidroperoksidadı inhibe ettiği ve hücre farklılaşmasını indüklediği de bilinmektedir (Jang ve diğ., 1997; Yuan ve diğ., 2012). Resveratrol uygulaması, p53-duyarlı genlerde, p300, Apaf-1, NF-κB/p50, p65, PPAR gen anlatımlarında değişikliklere sebep olmaktadır. Ayrıca çoklu sinyal

yolaklarının, tümör hücreleri üzerindeki büyümeyi önleyici etkisinden sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (Narayanan ve diğ., 2002). Vinkristin, adriamisin, doksorubisin, paklitaksel ve gemsitabin gibi çeşitli ajanlarla uygulanan resveratrolün, çeşitli tümör hücrelerinin kemoterapötiklere karşı duyarlılıklarını arttırdığı ortaya konulmuştur (Kubota ve diğ., 2003; Quan ve diğ., 2008; Kweon ve diğ., 2010; Harikumar ve diğ., 2010). Resveratrolün, oksidatif stresin zararlı etkilerini azalttığı da bilinmektedir. Kaspaz-3 ile kaspaz-9 aktivasyonunu sağlamakta ve mitokondriden sitoplazmaya sitokrom-c salınımını indüklemektedir (Fremont, 2000; Jiang ve diğ., 2005). Resveratrol de temozolomid gibi kan beyin-bariyerini geçebilmektedir (Wang ve diğ., 2002). Yapılan bir çalışmada resveratrolün, ROT-bağımlı AMPK-TSC-mTOR sinyal yolağı aracılığıyla GBM’de *in vitro* ve *in vivo* olarak TMZ-aracılı antitümör etkileri artırdığı gösterilmiştir (Yuan ve diğ., 2012). Sonuç olarak yapılan araştırmalar, resveratrolün kanser tedavisinde kullanılabilecek önemli bir aday olduğunu vurgulamaktadır. Ancak beyin tümörleri üzerinde temozolomid ve resveratrol etkileşimlerinin, hücre içi hangi mekanizmaları etkilediği halen tam olarak aydınlatılamamıştır.

Isı şoku cevabı (“Heat Shock Response”, HSR), ısı şoku, oksidatif stres, ağır metaller, toksinler gibi çevresel etkilere karşı evrimsel açıdan korunmuş önemli bir hücresel savunma mekanizmasıdır. Strese maruz kalan hücrelerde ortaya çıkan HSR neticesinde **stres proteinleri** olarak da bilinen **ısı şoku proteinlerinin** (“Heat shock protein”, Hsp) ekspresyonları artmaktadır. Bu proteinler moleküler ağırlıklarına göre HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 ve küçük ısı şoku proteinleri (sHSP) olarak altı aile altında sınıflandırılmıştır. Normal hücrelerde anlatımı belli seviyelerde kalan bu proteinlerin, kanser hücrelerinde farklı tiplerinin (Hsp105, Hsp90, Hsp70, Hsp27 vb.) anlatımlarının arttığı bilinmektedir. Özellikle Hsp27 ve Hsp70 anlatımının glioma hücrelerinde arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Önay Uçar ve diğ., 2012; Castro ve diğ., 2015). Normal hücrelerin aksine, kanser hücrelerinde *hsp70* ve diğer *hsp* genlerinin anlatımını düzenleyen bir transkripsiyon faktörünün (“Heat shock factor 1”, HSF1) aşırı anlatımının yapılması, tümör hücrelerinin hayatta kalmasına, göçüne, yayılımına ve anjiyogenezine katkıda bulunmaktadır. Yüksek HSF1 ve Hsp70 düzeyleri kötü prognoz, metastaz ve özellikle kanser tedavisi için uygulanan kemoterapi ve radyoterapi direnci ile ilişkilendirilmektedir (Schilling ve diğ., 2015).

Temozolomid ve resveratrole karşı oluşan tümör cevabını öngörmek ve glioma tedavisini iyileştirmek için ilave moleküler hedeflerin araştırılması gerekmektedir. Bu bağlamda,

uygulanen TMZ ve resveratrole karşı hücredeki stres proteinlerinin verdiği yanıt önemlidir. Jakubowicz-Gil ve diğ.'nin (2010) MOGGCCM (astrositoma GIII) insan glioma hücre hattında yaptığı bir çalışmada, tek başına veya kersetin ile kombine olarak TMZ uygulanmasının Hsp27 ve Hsp70 anlatımını baskıladığı gösterilmiştir. Bu çalışma, TMZ'nin farklı glioma hücrelerinde farklı yanıtlara sebep olduğunu göstermekte, moleküler heterojenliğin mevcut terapötik tedavilerin glioblastoma tümör hücrelerini hedef alamamasının anlaşılmasında önemli olabileceğini ortaya koymaktadır. İnsan glioma hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada, Hsp27 (HSPB1) ve Hsp70'in (HSPA) yüksek dereceli astrositomalarla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Castro ve diğ. 2012). Castro ve diğ. (2015) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise TMZ uygulaması yapılan üç çeşit insan glioma hücresinde (U-87 MG, Gli36 ve DBTRG) Hsp73 (HSPA8) ve Hsp72 (HSPA1A) stres proteinleri ile DNA onarımında işlev gören MGMT, MLH1 ve MSH2 proteinlerinin anlatım seviyeleri analiz edilmiş, DBTRG ve Gli36 hücre hatlarında Hsp27 anlatımının arttığı ve hücelere uygulanan TMZ'nin Hsp70 anlatımını değiştirdiği saptanmıştır. Yapılan farklı bir çalışmada, Hsp27'nin inhibe edildiği glioma hücrelerinde TMZ'ye karşı kemosenzitivitenin arttığı belirlenmiştir (Schultz ve diğ., 2012). Ayrıca Hsp27 inhibitörü ve doğal bir flavonoid olan kersetinin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) glioblastoma hücrelerini TMZ'ye karşı Hsp27 inhibisyonu yoluyla duyarlı hale getirdiği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Sang ve diğ., 2014).

Bu tez kapsamında, insan glioma hücreleri üzerinde temozolomidin tedavide daha etkin bir şekilde kullanılabilmesi için resveratrol ile kombine şekilde uygulanması ve sonuçta ilaca karşı oluşan direncin engellenmesi, TMZ'nin antikanser aktivitesinin ve diğer etkilerinin güçlendirilmesi ve ayrıca ilaç dozunun azaltılarak sağlıklı hücrelerdeki yan etkilerinin minimize edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, öncelikle TMZ ve RSV'nin insan glioma hücre hattı üzerindeki toksik etkileri MTT testi uygulanarak değerlendirilmiştir. Toksisite analizinin sonuçlarına göre hücelere uygulanacak ilaç ve doğal ajan dozu belirlenmiş olup, uygulanan TMZ ve RSV'nin glioma hücrelerindeki etkileri çeşitli parametreler üzerinden incelenmiştir. İlacın hücrede oluşturduğu oksidatif hasarlar protein karbonil oluşumu, DNA hasarı, glutasyon düzeyleri ve hücre içi oksidasyon seviyeleri belirlenerek değerlendirilmiştir. Ayrıca uygulanan ilaç ve ajanın apoptotik etkileri ve strese yanıt olarak hücrelerde anlatımı değiştiği bilinen Hsp27 ve Hsp70 proteinlerinin anlatım seviyeleri üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca glioma hücreleri ile malignant özellik göstermeyen bir hücre grubu karşılaştırılmıştır. Kontrol hücresi olarak kullanılan HEK 293 insan embriyonik böbrek

hücrelerinde, glioma hücrelerinde gerçekleştirilen tüm deneysel çalışmalar tekrar edilmiştir. Kanser hücre hattı ile normal hücre hattından elde edilen tüm bulgular bu tez kapsamında karşılaştırılmış olup, kombine terapinin etkilerine ait moleküler mekanizmalar araştırılmıştır. Özellikle resveratrolün, temozolomidin tümör hücrelerindeki etkilerine nasıl bir katkı sağladığı ve bu katkıyı hangi yollardan yaptığının aydınlatılması amaçlanmıştır.

Sonuç olarak, kombine terapi şeklinde uygulanan temozolomid ile resveratrolün, glioma ve normal hücrelerdeki etkilerinin farklı parametreler üzerinden değerlendirilmesi, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi adına literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.



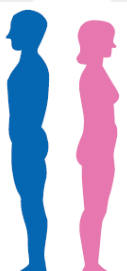
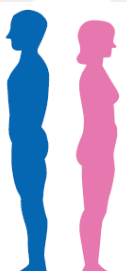
2. GENEL KISIMLAR

2.1. KANSER

Kanser, dünya çapında oldukça önemli bir halk sağlığı sorunudur ve ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır (Siegel ve diğ., 2019). 2018'deki kanser verilerine ait tahmini ölüm sayısı 9.6 milyondur ve toplam ölüm oranı göz önüne alındığında yaklaşık 6 ölümden 1'inin kanser sebebiyle olduğu bildirilmektedir. Tütün ürünlerinden kaçınarak, alkol tüketimini azaltarak, vücut ağırlığını sağlıklı bir şekilde koruyarak, düzenli egzersiz yaparak ve enfeksiyonla ilgili risk faktörlerini elimine ederek kanserden ölümün yaklaşık %30 ile %50 oranında önlenemediği bilinmektedir (World Health Organization, 2018). Kanser ölümlerinin yaklaşık %70'i düşük ve orta gelirli ülkelerde görülmektedir. Bu hastalığın ekonomik etkisi oldukça dikkate değerdir ve kanserle ilişkili ekonomik maliyet gün geçtikçe artmaktadır. 2010 yılında kanserin yıllık toplam ekonomik maliyetinin, yaklaşık 1.16 trilyon ABD doları olduğu tahmin edilmektedir (Knaul ve diğ., 2014).

2019 kanser istatistiklerine göre; prostat, kolorektal, akciğer ve bronş kanserleri erkeklerde tüm vakaların %42'sini oluşturmaktadır. Kadınlarda ise en yaygın görülen kanser türleri meme, akciğer ve kolorektum olmakla birlikte, sadece meme kanseri, kadınlardaki yeni kanser teşhislerinin %30'unu oluşturmaktadır. Kadın ve erkeklerde gözlenen en yaygın kanserlere ait 2019 istatistikleri Tablo 2.1'de verilmiştir. En sık görülen kanser vakaları ve kanser ölümlerine ait verilerde beyin ve diğer sinir sistemi tümörleri incelendiğinde, kadınlarda ve erkeklerde en sık görülen kanser tipleri arasında yer almadığı, ancak ölüm oranları dikkate alındığında hem kadınlarda hem erkeklerde sık görülenler arasına girdiği görülmektedir. Beyin ve diğer sinir sistemi tümörleri için vaka sayısı 2019 yılı için 23.820 yetişkin (10.410 kadın ve 13.410 erkek) ve ölüm sayısı 17.760 olarak bildirilmiştir. Bununla birlikte, beyin ve diğer sinir sistemi tümörlerine genç bireylerde daha sık rastlanmaktadır. Tüm çocukluk çağı (0-14 yaş) kanserlerinin %26'sını oluşturan beyin ve diğer sinir sistemi tümörleri, %28 oranındaki lösemiden sonra en sık görülen tümör tipi olarak kabul edilir. Ergenlerde (15-19 yaş) bu tümörler ile lenfoma hemen hemen eşit oranda yaygın görülmektedir (Siegel ve diğ., 2019).

Tablo 2.1: 2019 Kanser istatistiklerine göre, erkeklerde ve kadınlarda en çok görülen kanser vakaları ve kanser ölümlerine ait veriler (Siegel ve diğ., 2019).

Yeni Vakalar							
				Erkek - Kadın			
Prostat	174.650	%20		Meme	268.600	%30	
Akciğer & bronş	116.440	%13		Akciğer & bronş	111.710	%13	
Kolon & rektum	78.500	%9		Kolon & rektum	67.100	%8	
Mesane (idrar kesesi)	61.700	%7		Rahim (korpus)	61.880	%7	
Melanoma (cilt)	57.220	%7		Melanoma (cilt)	39.260	%4	
Böbrek & böbrek pelvisi	44.120	%5		Tiroid	37.810	%4	
Hodgkin dışı lenfoma	41.090	%5		Hodgkin dışı lenfoma	33.110	%4	
Ağız boşluğu ve farenks	38.140	%4		Böbrek & böbrek pelvisi	29.700	%3	
Lösemi	35.920	%5		Pankreas	26.830	%3	
Pankreas	29.940	%3		Lösemi	25.860	%3	
Tümü	870.970	%100		Tümü	891.480	%100	
Ölümler				Erkek - Kadın			
Akciğer & bronş	76.650	%24		Akciğer & bronş	66.020	%23	
Prostat	31.620	%10		Meme	41.760	%15	
Kolon & rektum	27.640	%9		Kolon & rektum	23.380	%8	
Pankreas	23.800	%7		Pankreas	21.950	%8	
Karaciğer ve safra yolu	21.600	%7		Over (yumurtalık)	13.980	%5	
Lösemi	13.150	%4		Rahim (korpus)	12.160	%4	
Özofagus	13.020	%4		Karaciğer ve safra yolu	10.180	%4	
Mesane (idrar kesesi)	12.870	%4		Lösemi	9.690	%3	
Hodgkin dışı lenfoma	11.510	%4		Hodgkin dışı lenfoma	8.460	%3	
Beyin & diğer sinir sist.	9.910	%3		Beyin & diğer sinir sist.	7.850	%3	
Tümü	321.670	%100		Tümü	285.210	%100	

Türkiye'deki verilere bakıldığında, sebebi bilinen ölümler arasında kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra 2. sırada yer almaktadır. 2015 yılındaki kanser istatistiklerine göre, kansere yakalanan kişi sayısı erkeklerde 97.830, kadınlarda ise 69.633'tür. Türkiye'deki kanser insidansı dünya ile karşılaştırıldığında; insidans erkeklerde yüksekken, kadınlarda daha düşüktür. En sık görülen kanser tipleri yetişkin erkeklerde akciğer iken, kadınlarda meme kanseridir. 15-24 yaş grubundaki genç bireylerde erkeklerde testis kanseri, kadınlarda ise tiroid kanseri ilk sıralarda yer almaktadır. 15-24 yaş grubundaki bireylerde, merkezi sinir sistemi tümörlerinin görülme sıklığı kadınlarda ve erkeklerde ilk üçte yer almaktadır. Çocuklarda en

sık görülen kanser tipi lösemidir, merkezi sinir sistemi tümörlerinin görülme sıklığı ise lösemiden sonra gelmektedir (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2018).

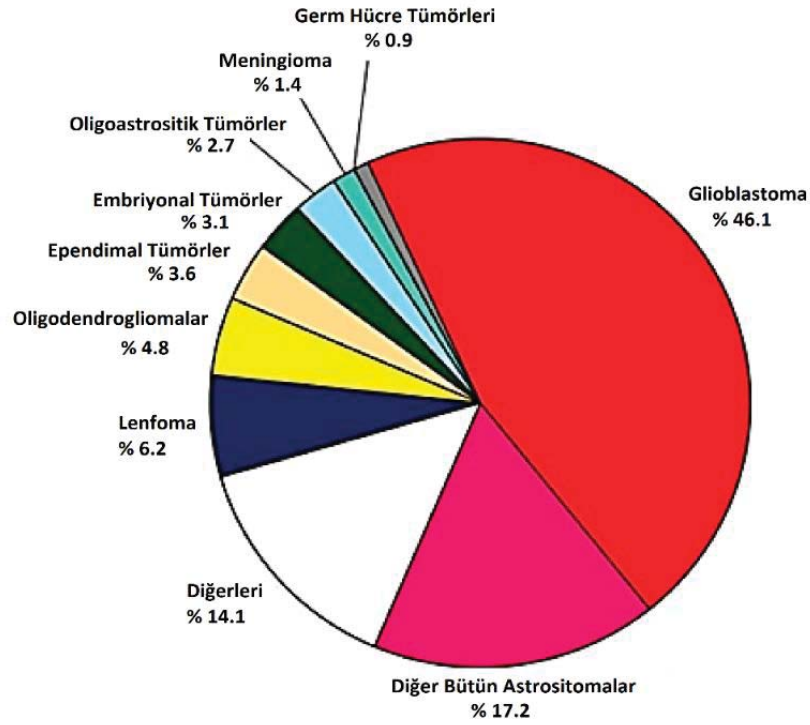
2.2. BEYİN TÜMÖRLERİ

Beyin tümörleri genel popülasyonda oldukça yaygın olarak görülen hastalıklar arasındadır. Bazı beyin tümörleri asemptomatik ve tesadüfi olarak bulunurken, focal nörolojik semptomlar, nöbetler veya baş ağrıları ile saptanan türleri de vardır. En sık görülen beyin tümörleri, sistemik kanserlerdeki intrakraniyal metastazlar, meningiomalar ve gliomalar, özellikle glioblastomalardır. Merkezi sinir sistemi metastazları, nöroaksis boyunca herhangi bir yerde meydana gelebilir ve bu durum sebebiyle hastalık tanı ve tedavisinde; nöroşirurji, radyasyon onkolojisi ve tıbbi onkolojiyle birlikte kompleks multidisipliner bir koordinasyonu gerektirir. Meningiomalar genellikle iyi huylu tümörler olup sıklıkla radyasyon terapisi ve kemoterapi ile birlikte cerrahi müdahale ile tedavi edilir. Beyin tümörlerinin %20'sini oluşturan bu tümörler gliomatöz olmayan primer beyin tümörlerinin en sık görülen tipidir. Beyin tümörlerinin yaklaşık %10'unu oluşturan Schwannomalar ise ikinci sırada yer alır. Spesifik tümör tipleri, çoğunlukla belirli yaş gruplarında karakteristik olarak gözlemlenir. Genelde çocuklarda medulloblastoma, yaşlılarda ise glioblastoma görülmektedir. Malignant gliomalar primer beyin tümörünün en yaygın ve invazif tipidir. Cinsiyet açısından yapılan istatistikler, primer beyin tümörlerinin erkeklerde (%55) daha yaygın olduğunu göstermektedir (Dolecek ve diğ., 2012; McFaline-Figueroa ve Lee, 2018).

2.2.1. Gliomalar

Gliomalar, tüm beyin tümörlerinin %27'sini, malignant beyin tümörlerinin %80'ini oluşturmaktadır (Ostrom ve diğ., 2015). Malignant beyin tümörleri ve görülme oranları Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Gliomalar astrositomalar, oligodendrogliomalar, ependimomalar ve nadir görülen karışık tip gliomaları içeren bir gruptur. Astrositomalar merkezi sinir sistemi tümörlerinin en büyük grubunu oluşturur ve daha fazla alt gruplara ayrılabilir. Dünya Sağlık Örgütü, astrositomaları hücresel farklılaşma temelinde dört dereceye ayırır: I. derece (pilositik astrositoma), II. derece (diffüz astrositoma), III. derece (anaplastik astrositoma) ve IV. derece (glioblastoma). Bu sınıflandırmaya göre, III. ve IV. derece gliomalar malign gliomalar olarak adlandırılmaktadır. Düşük dereceli glioma, kökenlendiği dokuya benzerken, yüksek dereceli gliomada bu benzerlik azalmaktadır (Louis ve diğ., 2007; Louis ve diğ., 2016).

Beyin tümörleri içinde yüksek dereceli glioblastoma multiforme (GBM), yani IV. derece astrositoma, en yaygın ve en agresif tip olarak kabul edilir. GBM kötü bir prognoz taşır ve hiperselülarite, pleomorfizm, nekroz, nekroz çevresinde yalancı ikincil yapılar (“pseudopalisading”) ile mikrovasküler proliferasyonu içeren histolojik kriterlerle tanımlanır. Bu hücreler anormal hücre proliferasyonu ve tümör anjiyogenezi sergileyen tümörler olup, radyoterapi ve kemoterapiye direnç geliştirerek, ölümcül seyir gösteren tümörler olarak kabul edilmektedir (Burger ve diğ., 1985; Hanahan ve Weinberg, 2000; Iorns ve diğ., 2007).



Şekil 2.1: Malignant primer beyin ve merkezi sinir sistemi tümörlerinin dağılımı (Ostrom ve diğ., 2015).

Malignant glioma, primer beyin kanserinin en yaygın türü ve en agresif formudur. Her yıl, Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 100.000 kişide 5 vaka teşhis edilmektedir. Dünya genelinde, GBM'ler tüm primer beyin tümörlerinin %15'ini ve malignant primer beyin tümörlerinin %45'ini oluşturur; bu oran 100.000'de 3.2 kişiye karşılık gelir. Hastaların ortalama yaşı ise 64'tür. GBM çoğunlukla 60-80 yaşlarında ortaya çıkar ve hastalığın prevalansı yaşlanan popülasyonla birlikte artar. IV. derece glioblastomalı bir hastada ortalama sağkalım süresi cerrahi, radyasyon ve konvansiyonel tedavilere rağmen yaklaşık 12-15 aydır. III. derece

gliomalar için ise ortalama sağkalım süresi 2-5 yıl arasında değişmektedir (Wen ve Kesari, 2008; Dolecek ve diğ., 2012; Ostrom ve diğ., 2015).

GBM'nin ortaya çıkmasındaki etkenlerle ilgili yapılan çalışmalar; iyonize radyasyon, elektromanyetik alanlar, sigara, cep telefonu, diyet ve sosyoekonomik durum gibi dışsal faktörlerin yanı sıra; alerji, immünolojik durum, viral enfeksiyonlar gibi tıbbi risk faktörlerinin etkileri de değerlendirmiştir. Ancak radyasyon dışında, bahsedilen diğer faktörlerin glioblastomayla ilişkisine dair kesin bulgular elde edilememiştir (Krex ve diğ., 2007).

GBM baş ağrısı, felç veya merkezi nörolojik belirtilerle ortaya çıkmakta olup agresif yapısı nedeniyle hızlıca ilerleyebilmektedir. Kontrastlı ve kontrastsız manyetik rezonans görüntüleme teknikleri hastalığın tanımlanmasında kullanılmaktadır. Tümörün görünümü değişebilir, ancak çoğu vakada merkezi nekrozla birlikte lezyonları artmış heterojen bir kitle görülür (McFaline-Figueroa ve Lee, 2018).

Tanı için, biyopsi veya cerrahi rezeksiyon sonrasında patolojik olarak doğrulama gerekmektedir. Bütünleşik bir tanıya varabilmek adına, merkezi sinir sistem tümörlerinin 2016'da revize edilmiş olan Dünya Sağlık Örgütü ("World Health Organization", WHO) sınıflandırması kullanılmaktadır. Bu sınıflandırma sadece histolojik bulgulara değil, aynı zamanda moleküler bilgilere de dayanmaktadır (Louis ve diğ., 2016). Gliomaların WHO sınıflandırması Tablo 2.2'de verilmiştir.

Glioblastomalar temelde primer veya sekonder glioblastomalar olarak sınıflandırılmaktadır (Safa ve diğ., 2015). Primer glioblastomalar klinik veya histolojik bulgu olmadan, doğrudan glial öncü hücrelerden (*de novo* olarak) hızlı bir şekilde gelişmekteyken, sekonder glioblastomalar düşük dereceli diffüz astrositoma veya anaplastik astrositomalarından gelişmektedir. Primer glioblastomalar sıklıkla yaşlı hastalarda, sekonder glioblastomalar ise daha genç hastalarda görülmektedir. Sekonder glioblastomalar primerlere göre daha iyi prognoz göstermektedir. Primer ve sekonder glioblastomalarda genetik/epigenetik farklılıklar ve farklı sinyal yolları bulunmasına rağmen, histolojik olarak ayırt edilmeleri mümkün değildir (Ohgaki ve Kleihues, 2013).

Tablo 2.2: Gliomaların Dünya Sağlık Örgütü'ne göre sınıflandırılması (Louis ve diğ., 2016).

Diffüz astrositik ve oligodendroglial tümörler	Diğer Gliomalar
Diffüz astrositoma, IDH-mutant Gemistositik astrositoma, IDH-mutant Diffüz astrositoma, IDH-mutant olmayan Diffüz astrositoma, tanımlanmamış Anaplastik astrositoma, IDH-mutant Anaplastik astrositoma, IDH-mutant olmayan Anaplastik astrositoma, tanımlanmamış Glioblastoma, IDH-mutant olmayan Dev hücreli glioblastoma Gliosarkoma Epiteloid glioblastoma Glioblastoma, IDH-mutant Glioblastoma, tanımlanmamış Diffüz orta hat glioma, H3 K27M-mutant Oligodendroglioma, IDH-mutant ve 1p/19q kodelesyonu Oligodendroglioma, tanımlanmamış Anaplastik oligodendroglioma, IDH-mutant ve 1p/19q kodelesyonu Anaplastik oligodendroglioma, tanımlanmamış Oligoastrositoma, tanımlanmamış Anaplastik oligoastrositoma, tanımlanmamış	Üçüncü ventrikül kordoid glioma Anjiyosentrik glioma Astroblastoma
	Koroid pleksus tümörler
	Koroid pleksus papilloma Atipik koroid pleksus papilloma Koroid pleksus karsinoma
	Nöronal ve karışık nöronal-gliyal tümörler
	Disembrioplastik nöroepitelyal tümör Gangliositoma Ganglioglioma Anaplastik ganglioglioma Serebellumun displastik gangliositoması (Lhermitte-Duclos hastalığı) Desmoplastik infantil astrositoma/ganglioglioma Papiller glionöronal tümör Rozet-oluşturan glionöronal tümör Diffüz leptomeningeal glionöronal tümör Merkezi nörositoma Ekstraventriküler nörositoma Serebellar liponörositoma Paraganglioma
Diğer astrositik tümörler	Pineal bölge tümörleri
Pilositik astrositoma Pilomiksoid astrositoma Subependimal dev hücreli astrositoma Pleomorfik ksantoastrositoma Anaplastik pleomorfik ksantoastrositoma	Pineositoma Orta derece diferansiyasyonlu pineal parankimal tümör Pineoblastoma Pineal bölgenin papiller tümörü
Ependimal tümörler	
Subependimoma Miksopapiller ependimoma Ependimoma Papiller ependimoma Berrak hücreli ependimoma Tanisitik ependimoma Ependimoma, RELA füzyon-pozitif Anaplastik ependimoma	

2.2.2. Gliomalarda Görülen Mutasyonlar

Glioblastoma için en önemli moleküler biyobelirteçler, izositrat dehidrojenaz (IDH) mutasyonları ve MGMT promotörünün metilasyonudur. IDH mutasyonları gliomaların tekrar sınıflandırılmasını sağlamıştır ve WHO sınıflandırmasında glioblastomanın IDH-mutant/mutant olmayan olarak tekrar revize edilmesine yol açmıştır (Louis ve diğ., 2016). IDH1'deki en önemli mutasyonlardan biri kodon 132'de arjinin yerine histidin geçmesidir (R132H mutasyonu), IDH2'deki mutasyon ise kodon 172'de arjinin yerine lizin (R172K mutasyonu) geçişidir. IDH1 ve IDH2'de gerçekleşen bu mutasyonlar birçok malign glioma

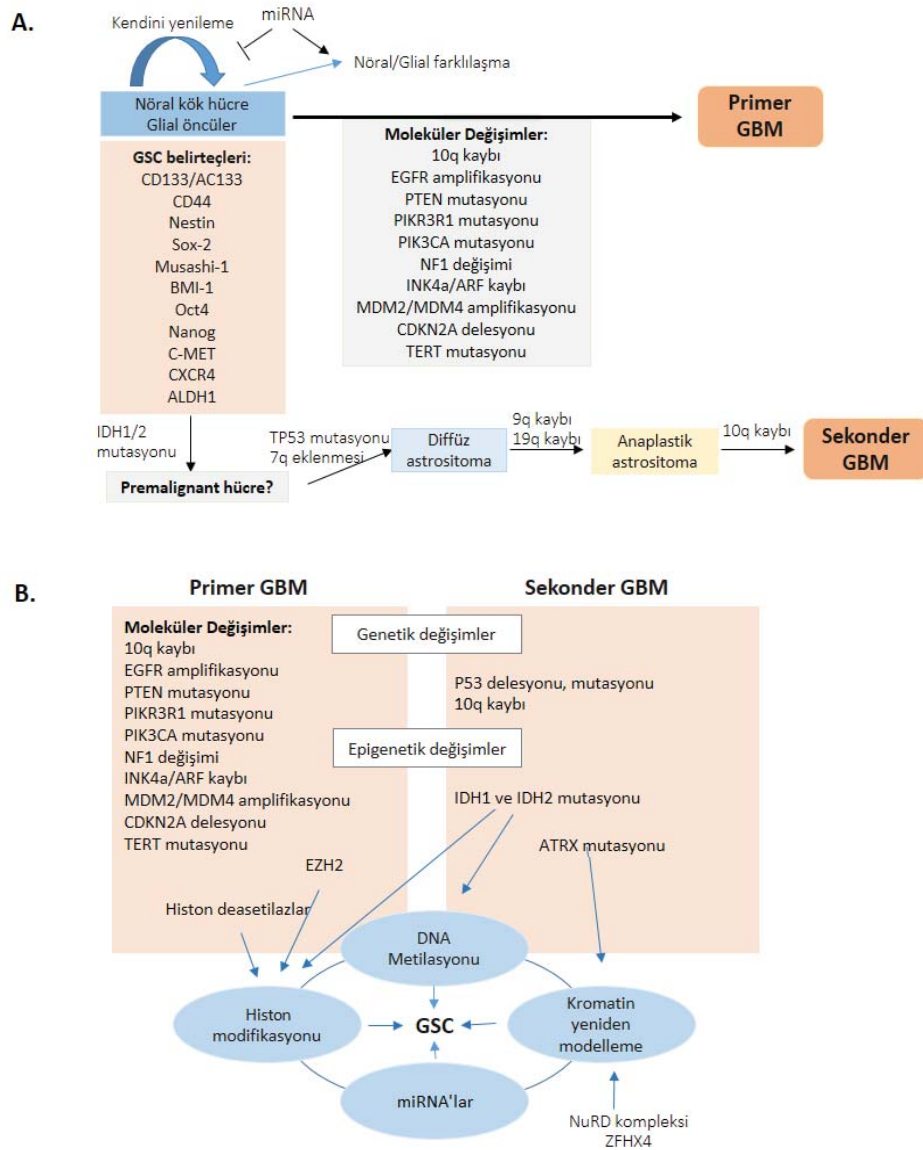
çeşidinde meydana gelmektedir. Sanson ve diğ. (2009) yaptıkları bir çalışmada, R132H mutasyonunun tümörün genomik profili ile ilişkili olduğunu ve 2-4 dereceli gliomalar için önemli bir prognostik biyobelirteç olabileceğini göstermişlerdir. Bu nedenle IDH mutasyon testlerinin, I. derece pilositik astrositomaların 2. derece diffüz astrositomalarından ayırt edilmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir (Yan ve diğ., 2009).

Glioblastomadaki diğer önemli biyobelirteç MGMT promotör metilasyonudur. MGMT geni, 10. Kromozomun 10q26 bölgesinde bulunur ve DNA alkilasyonunun önemli bir bölgesi olan guaninin O⁶ konumundan alkil gruplarını kaldıran bir DNA onarım proteinini kodlar. MGMT proteini, tümör hücrelerinin alkilleyici ajanlar tarafından öldürülmesini engeller, dolayısıyla yüksek seviyedeki MGMT aktivitesi, alkilleyici ajanlarının terapötik etkisini körelterek kanser hücresinin dirençli bir fenotip oluşturmaya neden olur. MGMT geninin promotör metilasyonu epigenetik susturum olarak kabul edilir. Metilasyon, MGMT anlatımındaki ve DNA onarım aktivitesindeki azalma ile yakından ilişkilidir. Bu durum, radyoterapiye ek olarak alkilleyici ajan alan glioblastomalı hastalarda daha uzun sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (Esteller ve diğ., 2000; Hegi ve diğ., 2005).

Kanser Genom Atlası ("The Cancer Genome Atlas", TCGA), gliomalar da dahil olmak üzere çok sayıda kanser türünün genetik yapısını aydınlatabilmek adına Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü ("National Institutes of Health", NIH) tarafından desteklenen bir proje olup çok sayıda tedavisiz glioblastoma örneğinde DNA dizisi, gen anlatımı, epigenetik modifikasyon ve mikroRNA anlatım analizini gerçekleştirmiştir (TCGA Network, 2008). Malignant gliomalarda, spesifik mutasyonların belirlenmesinin yanı sıra, moleküler yolların tanımlanması ve yolların nasıl etkileştiğinin bilinmesi de oldukça önemlidir. Bu nedenle yapılan çalışmalarda, bütünleşik genomik analizi yapılarak glioblastomada rol oynayan önemli genetik yollar ortaya konulmuştur. RTK/RAS/PI(3)K yolağındaki genetik değişiklikler glioblastomada en yaygın olarak karşılaşılan durumlardır, P53 ve RB yollarındaki sinyal değişimleri bu genetik değişiklikleri takip eder (Parsons ve diğ., 2008; TCGA Network, 2008).

Primer glioblastomalar, EGFR/PTEN/Akt/mTOR yolağı ile karakterize edilirken, sekonder glioblastomalar ise TP53 tümör supresör yolağındaki nokta mutasyonları ile karakterize edilir. EGFR amplifikasyonu primer glioblastomalarda %60 oranında görülmekteyken sekonder glioblastomalarda oldukça az bulunmaktadır (Ekstrand ve diğ., 1992; Watanebe ve diğ., 1996; Kita ve diğ., 2007).

Primer GBM'nin devam eden büyümesi ve nüks etmesi, çeşitli protein belirteçlerinin anlatımını yapan ve kendini yenileyen glioma kök hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, primer ve sekonder GBM'de çok sayıda moleküler değişiklik meydana gelmektedir. Bunlar arasında, P53 tümör baskılayıcı protein ve ATRX'teki mutasyonlar düşük dereceli gliomalarda ve sekonder GBM'de meydana gelir. IDH mutasyonu, kromatin yapısını etkileyen, önemli kromatin değiştirici ATRX'teki anormal DNA metilasyonuna ve mutasyonlara yol açmaktadır. Primer ve sekonder tümör tiplerinde görülen genetik değişiklikler ve anormal sinyal yolları Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2: A. Glioma kök hücre kaynaklı; B. Epigenetik kaynaklı primer ve sekonder GBM gelişimi (Safa ve diğ., 2015).

2.2.3. U-87 MG İnsan Glioma Hücreleri

İnsan glioma çalışmalarında en yaygın kullanılan hücre hatlarından biri olan U-87 MG (Uppsala 87 Malignant Glioma) glioblastomalı bir hastadan elde edilmiş hücre hattıdır. Orijinal U-87 MG hücre hattı, yaklaşık olarak 50 yıl önce Uppsala Üniversitesi'ndeki bir laboratuvarında Ponten ve diğ. (1968) tarafından elde edilmiştir. Diğer glioma hücreleriyle birlikte, U-87 MG hücre hattı Fogh ve diğ. (1977) yönetiminde bulunan bir hücre deposunda saklanarak, daha sonra Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'na ("American Type Culture Collection", ATCC) aktarılmıştır. 2016 yılında yapılan karşılaştırmalı genetik profillemeye çalışması, yaygın olarak kullanılan ve ATCC gibi hücre koleksiyonları tarafından dağıtılan bu hücre hattının orijinal hücre hattıyla bazı farklılıklar taşıdığını ortaya koymuştur (Allen ve diğ., 2016).

Farklı glioblastoma hastalarından elde edilen ve farklı kodlarla kültür koleksiyonlarında yer alan birçok hücre hattı bulunmaktadır: U-87 MG, U-118 MG, U-138 MG, U-251 MG, A172, LN-229, T98G vb. Farklı genetik profillere sahip bu hücreler farklı yaştaki hastalardan alınmış ve hücre morfolojileri açısından (epitelyal, poligonal, fibroblast) değişiklikler göstermektedir. Bu hücrelerden U-118 MG ve U-138 MG hücreleri, 1966-1969 arasında Ponten ve diğ. (1968) tarafından farklı erkek hastalardan alınmış malign glioma hücre hatlarıdır ve sitogenetik açıdan birbirlerine oldukça benzemektedir.

Farklı glioma hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar, hücrelerdeki moleküler farklılıkları ortaya koymaktadır. U-87 MG, U-373 MG, SW1088, Hs683, H4, T98G, A172, U-138 MG, U-118 MG hücre hatlarında yapılan bir çalışmada astrositlerde bulunan nestin, vimentin ve GFAP ara filament proteinleri aracılığıyla astroglial farklılaşma seviyeleri araştırılmıştır. SW1783 hücresinde astroglial farklılaşma seviyesinin düşük olduğu, U-87 MG hücresinde ise bu farklılaşmanın en yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca A-172 hücre hattında herhangi bir farklılaşma gözlenmemiştir (Belot ve diğ., 2001). Yapılan diğer bir çalışmada, steroid olmayan antienflamatuvar ilaçla aktive edilmiş NAG-1 geninin, U-87 MG, U-118 MG, U-251 MG ve T98G hücre hatlarında apoptozu arttırdığı, A172 ve LN-229 hücrelerinde ise herhangi bir artışa neden olmadığı belirlenmiştir (Zhang ve diğ., 2014). Li ve diğ. (2017), U-251 MG ve U-87 MG hücrelerindeki protein anlatım farklılıklarını incelemiş ve sonuçta farklılıkların nikotinamid nükleotid metabolizmasının düzenlenmesi, RNA kırılması, glikoliz ve pürin metabolizma yolağı ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

2.3. BEYİN TÜMÖRLERİNİN TEDAVİSİ

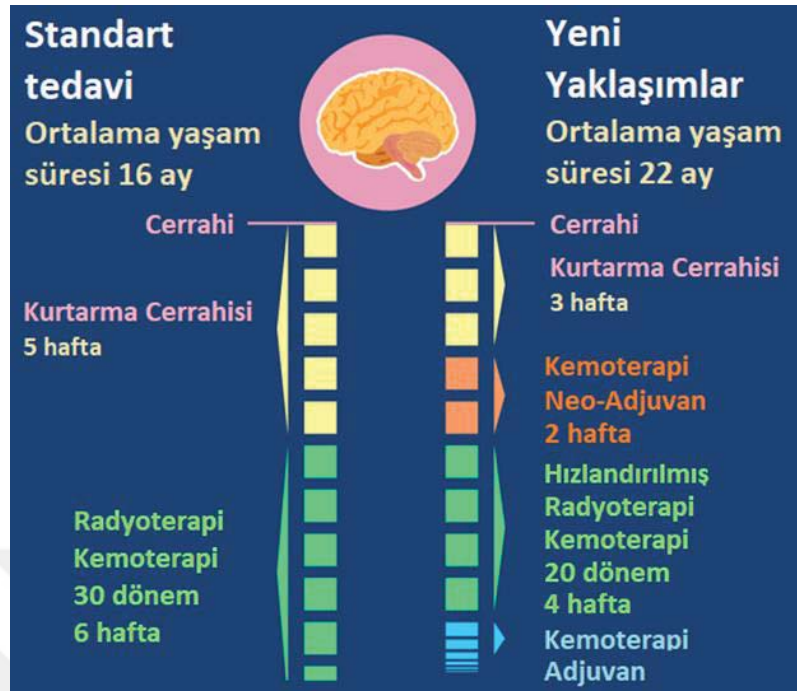
Ameliyat, malign glioma tedavisi için ilk yoldur ve tümör kitlesinin cerrahi olarak alınmasıyla birlikte dokunun analizi mümkün hale gelmektedir. Alınan parçanın boyutu, genel sağkalım ve brüt total rezeksiyon (“Gross Total Resection”, GTR) ile korelasyon göstermektedir (Sanai ve diğ., 2011). Beyinde ameliyat için uygun bölgelerde bulunan tümörler için rezeksiyon, ameliyat sırasında MRI ve nörogörüntüleme teknikleri kullanılarak desteklenebilir. Ancak tümör hücrelerinin normal beyin hücrelerine invazyonu tümörün tamamının rezeksiyonunu engellemektedir. Bu bağlamda araştırmacılar tedavide farklı yöntemleri uygulamaya başlamıştır. İlk olarak, glioblastomada ameliyat sonrası kalan tümör hücrelerini öldürmek için radyoterapi tedavisi uygulanmaya başlanmıştır ve sonuçta hasta sağkalımı 12 aya kadar uzatılmıştır (Walker ve diğ., 1978; Walker ve diğ., 1980).

Cerrahi rezeksiyona ilave olarak radyoterapi ve kemoterapi uygulamaları gerçekleştirilse de, neredeyse tüm malign gliomalı kişilerde hastalığın tekrar nüks ettiği görülmüştür. Çok sayıda klinik çalışmaya rağmen ortalama sağkalımda (“Overall Survival”, OS) ve progresyonsuz sağkalımda (“Progression-Free Survival”, PFS) çok az iyileşme sağlanmıştır. PFS aralığı ilk ameliyattan sonra 7–10 aydır. Glioblastoma vakası tekrarladığında eğer kitle ameliyatla çıkarılabilir haldeyse, tedavinin açık bir yararı olmadığı gösterilse dahi, yapılan ilk uygulama ek cerrahi rezeksiyondur. Cerrahi rezeksiyon ve radyoterapi glioblastoma tedavisinin temelini oluşturmaktadır, ancak kemoterapinin bu tedavilere eklenmesi ve yeni ilaçların geliştirilmesiyle uygulanan tedaviler artık daha olumlu sonuçlar vermektedir (Omuro ve diğ., 2007; Bloch ve diğ., 2014).

GBM tedavisinde kötü prognozun çeşitli sebepleri bulunmaktadır. Birincisi, nadir de olsa sistemik metastazlar aracılığıyla tümör hücrelerinin beyin parankiminin içine sızmasıdır. Bu durum tümörün cerrahi rezeksiyonla alınmasını zorlaştırır. İkincisi, kemoterapötik ilaçların geçişine engel teşkil eden kan-beyin bariyerinin varlığıdır. Sadece küçük ve lipofilik moleküller hedeflerine ulaşarak kan-beyin bariyerini geçebilmektedir. Bu nedenle beyin tümörü tedavisinde kullanılan ilaçların en önemli özellikleri, bu bariyeri geçebilmeleri olmaktadır. Üçüncü olarak da, glioblastomanın çoğu ajana karşı dirençli hale gelmesidir. Özellikle MGMT anlatımının artmasının, gliomanın alkilleyici ajanlara karşı ana direnç mekanizması olduğunu düşündürmektedir (Stupp ve diğ., 2005; Stupp ve diğ., 2007).

Kemodirenç, tekrarlayan GBM için ayırt edici bir özelliktir. GBM'nin sahip olduğu kök hücre özellikleri nedeniyle tümör yeniden ortaya çıkmaktadır ve bu nüksün kemodirenç ile bağlantısı bulunmaktadır. Tümör yenileyici hücreler olarak da tanımlanan glioma kök hücreleri ("Glioma Stem Cells", GSC) veya glioma başlatıcı hücreler ("Glioma Initiating Cells", GIC) GBM'nin uzun süreli yayılımından sorumludur. GBM içinde yavaşça bölünen bir popülasyonu oluşturan bu hücreler, tekrarlayan GBM'nin kötü prognozundan ve standart tedaviden sonra malign tümörün nüks etmesinden sorumlu tutulmaktadır. Bu aşamada GSC'lere yönelik tedavilerle kemodirençli yenecek mekanizmaların araştırılması da farklı bir tedavi stratejisi olarak önem taşımaktadır (Auffinger ve diğ., 2015).

1990'lı yıllarda, DNA alkilleyici ajanlardan biri olan temozolomid, malign glioma tedavisinde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi ("U.S. Food and Drug Administration", FDA) tarafından kemoterapötik bir ajan olarak test edilmiş ve onaylanmıştır. Temozolomid uygulamasının radyoterapi tedavisiyle birlikte kombine şekilde yapılmasının, glioblastomada sağkalımı arttırdığı gösterilmiştir (Stupp ve ark., 2005). Yapılan çalışmalar, DNA onarım enzimi MGMT'nin promotör bölgesinde DNA metilasyonu taşıyan hastaların, TMZ tedavisine yanıt verme olasılığının daha yüksek olduğunu göstermiştir (Hegi ve diğ., 2005). Son dönemde glioblastoma için mevcut tedavi standardı, eş zamanlı TMZ ile radyoterapi uygulaması ve cerrahi rezeksiyondur. Bu standart tedavinin ardından, tümörün nüks etme potansiyelini gidermek amacıyla adjuvan TMZ uygulaması yapılmaktadır. Shenouda ve diğ. (2016), neo-adjuvan TMZ uygulaması ile faz II klinik çalışması gerçekleştirmiş olup, standart tedaviler ile 16 ay olan ortalama yaşam süresinin yeni yaklaşımlarla 22 aya kadar çıkarılabildiğini göstermişlerdir (Şekil 2.3). Standart terapide, ilk cerrahi rezeksiyondan beş hafta sonra radyoterapiye geçilmekte, bu süreçte kanser hücreleri, özellikle kanser kök hücreleri, radyoterapi ve kemoterapiye daha dirençli hale gelebilmektedir. Tedavi etkinliğini arttırmak için yeni bir yaklaşımın denendiği bir çalışmada, yeni GBM tanısı konulmuş hastalara cerrahi rezeksiyondan sonra neo-adjuvan kemoterapi verilerek tümörün iyileşme sırasında ilerlemesi önlenmiş, sonrasında hızlandırılmış radyoterapi ile eş zamanlı TMZ uygulaması gerçekleştirilmiştir. Bu yeni yaklaşımlar sayesinde ortalama yaşam süresi daha da arttırılmıştır (Shenouda ve diğ., 2016).

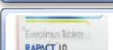


Şekil 2.3: Glioblastomada tümör direncinin üstesinden gelebilmek amacıyla uygulanan farklı tedavi stratejileri (Shenouda ve diğ., 2016).

Günümüzde birçok araştırmacı beyin kanseri tedavisinde terapötik ilaçların kullanılması yaklaşımına odaklanmaktadır. Bevacizumab, temozolomid (TMZ), karmustin (BiCNU), lomustin (CCNU), vinkristin bu ilaçlardan bazıları olup her biri FDA tarafından onaylanmış ilaçlardır (<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/brain>, Ziyaret Tarihi: 25 Mayıs 2019). Ayrıca başka kanserlerin tedavisinde kullanılan ilaçlarla oluşturulmuş, PCV denilen bir kombinasyon da beyin tümörü tedavisinde kullanılmaktadır (Tablo 2.3). TMZ dışında karmustin de glioblastoma için onaylanmış DNA-alkilleyici bir ajan ve birinci sınıf kemoterapötik ilaçtır. BiCNU (karmustin)-polimer kapsüllerinin, tümör rezeksiyonu sonrası tümör yatağına yerleştirildiği bir faz III klinik deneyinde, sağkalım için olumlu cevaplar alınmıştır (Westphal ve diğ., 2003). Bevacuzimab, VEGF'yi hedefleyen ve böylece anjiyogenezi bloke eden bir monoklonal antikordur. Tekrarlayan glioblastomada kullanımı için onaylanmış olup, halen glioblastoma tedavisinde Faz III klinik çalışmalarında araştırmaları devam etmektedir (Friedman ve diğ., 2009).

Tablo 2.3: Beyin tümöründe kullanılan (A) FDA onaylı ilaçlar ve (B) ilaç kombinasyonları (<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/brain>).

A. Onaylı İlaçlar

	Afinitor (Everolimus)
	Afinitor Disperz (Everolimus)
	Avastin (Bevacizumab)
	Bevacizumab
	BiCNU (Carmustine)
	Carmustine
	Carmustine Implant
	Everolimus
	Gliadel Wafer (Carmustine Implant)
	Lomustine
	Mvasi (Bevacizumab)
	Temodar (Temozolomide)
	Temozolomide

B. İlaç Kombinasyonları

PCV	
	P = Procarbazine hydrochloride
	C = Lomustine (CCNU)
	V = Vincristine Sulfate

Malign glioma için standart tedaviler, sadece yaşam süresini hastalığın doğal seyrinden yaklaşık bir yıl daha fazla uzatmakta olup, sınırlı bir etkiye sahiptir. Radyoterapi ve TMZ uygulaması da bireye ve tümöre spesifik değildir. Bu nedenle malign gliomaların genetik yapısı ve metabolik yolları daha iyi anlaşılabilirdiğinde, uygun hedefler belirlenerek daha iyi bir tedavi yolu seçilebilecektir (Brennan ve diğ., 2013).

Kanser Genom Atlası verileri ve diğer genom çalışmaları malign gliomalar için yeni moleküler hedefleri ortaya çıkarmıştır. Bu bağlamda proliferasyon, apoptozdan kaçınma, invazivlik ve anjiyogenez gibi malign glioma sağkalım yollarında birçok hedef belirlenmiştir (Wang ve diğ., 2013). Anormal büyüme faktörü sinyali, birçok malign gliomayı proliferasyona zorlamaktadır. Epidermal büyüme faktörü ("Epidermal Growth Factor", EGFR), trombosit kaynaklı büyüme faktörü ("Platelet-Derived Growth Factor", PDGF), insülin benzeri büyüme faktörü ("Insülin-Like Growth Factor", IGF) ve fibroblast büyüme faktörü ("Fibroblast Growth

Factor”, FGF) ya yüksek oranda regüle edilmekte ya da malign gliomların büyük bir yüzdesinde mutasyona uğramaktadır (Squatrito ve Holland, 2011). Son yıllardaki klinik çalışmalar, bu yolları bloke etmeyi hedeflemiştir. Bu bağlamda EGFR, malign gliomada en çok çalışılan büyüme faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Yüksek seviyede anlatım yapan EGFR, malign gliomaların yaklaşık %50’sinde bulunmaktadır ve bu durum onu cazip bir terapötik hedef haline getirmektedir (Rao ve diğ., 2010). Birkaç küçük inhibitör, yeni teşhis edilmiş ve tekrarlayan glioblastomalarda kullanılmak üzere, faz II klinik deneme aşamasında değerlendirilmektedir. Gefitinib, erlotinib ve lapatinib klinik denemelerde en fazla çalışılmış küçük molekülü EGFR inhibitörleridir. Ayrıca, faz II klinik deneyleri devam eden Cetuximab, EGFR'ye karşı oluşturulmuş kimerik bir monoklonal antikor olarak literatürde yer almaktadır (Belda-Iniesta ve diğ., 2006).

Glioblastoma tedavisinde viral çalışmalar da son yıllarda öne çıkmıştır. Price ve diğ. (2013) yaptıkları bir çalışmada, sitomegalovirüsün glioblastoma ilerlemesini teşvik ettiğini öne sürmüşlerdir. Söderberg-Naucler ve diğ. (2013) ise GBM’nin standart tedavisinin yanı sıra, sitomegalovirüs enfeksiyon tedavisinde kullanılan Valgansiklovir’in en az altı ay kullanımıyla ortalama sağkalım süresinin arttığını bildirmişlerdir.

İmmünoterapi, kanseri yok etmede, otolog hücreler kullanıldığı ve nispeten daha iyi tolere edildiği için son dönemde cazip bir seçenek haline gelmiştir. İmmünoterapiler ve toksin-ligand konjugatlarının ilk faz çalışmaları ümit vaat etmektedir, ancak henüz faz III ileri aşamalarda kesin etkinlikleri gösterilememiştir. Hastanın bağışıklığı ve kanser arasındaki etkileşim oldukça karmaşıktır. Malign melanoma tedavisinde T hücrelerine karşı geliştirilmiş bir antikor olan Ipilimumab ile hormona dirençli prostat kanseri için kullanılan otolog dendritik bir hücre aşısı olan Provenge, FDA tarafından onaylanmıştır (Brower, 2011). Şu anda immünoterapi için klinik çalışmalarda dendritik hücre aşıları, peptit aşıları, gen transfer aracılı aşılar, otolog tümör hücresi aşıları ve T hücresi immünoterapisi gibi çoklu yaklaşımlar değerlendirilmektedir (Price ve Chiocca, 2014).

Malign glioma hücrelerinde aşırı anlatımı yapılan ısı şoku proteinlerinin (HSP’lerin) EGFR, PDGFR, PI3K gibi moleküller ile etkileştiği gösterilmiştir (Graner ve diğ., 2007; Soo ve diğ., 2008). HSP’ler immünoterapi çalışmalarında da kullanılmaktadır. Tümör-bağılantılı antijenler (“Tumor-Associated Antigens”, TAA) ve tümöre özgü HSP’lerin bağlanmasıyla oluşturulan çeşitli HSP aşıları bulunmaktadır. HSP’ler tümöre özgü immün yanıt ile sonuçlanan TAA’lara

karşı proinflatuar etki göstermektedir (Udono ve Srivastava, 1993). GBM tedavisinde immünoterapi çalışmaları dışında, çeşitli doğal ürünlerin ya da terapötik ilaçların HSP inhibitörü olarak kullanıldığı çok sayıda HSP ilişkili çalışma da bulunmaktadır. HSP inhibisyonu, özellikle apoptoza karşı hücre direncini azaltmakta kullanılan önemli stratejilerden biri olarak kabul edilmektedir (Rérole ve diğ., 2011; Önay Uçar, 2015; Önay Uçar ve Şengelen, 2019).

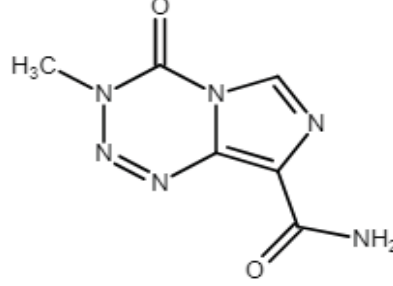
Yakın gelecekte, bir hastanın temozolomide yanıt verip vermeyeceği genetik testler aracılığıyla belirlenebilecektir. Tümör DNA'sının dizilenmesi ve gen anlatım analizleri, malign gliomaya sahip hastalar için tedavide yönlendirici olacaktır. Elde edilen bulgular yorumlanarak, tümörün en iyi tedavi şekli belirlenip, uygun kombine terapiler seçilebilecektir. Teknoloji, tıbbi daha kişiselleştirilmiş hale getirmek için geliştikçe, her bir malign gliomanın tedavisi için uygun kombine terapiyi seçmek daha kolay olacaktır (Price ve Chiocca, 2014).

2.4. TEMOZOLOMİD

Günümüzde, birçok araştırmacı beyin kanseri tedavisinde farklı yaklaşımlara odaklanmaktadır. Bu yaklaşımlardan biri tedavi için kemoterapötik ilaçların kullanılmasıdır. Özellikle alkilleyici ajanlar bu bağlamda çok fazla tercih edilmektedir. Tedavide kullanılan bu ilaçların bazıları onaylanmış, bazıları halen araştırma aşamasındadır. Malign gliomayı tedavisinde etkili yeni terapötikleri keşfetmek amacıyla birçok çalışma yapılmasının yanı sıra, diğer hastalıkların tedavisinde kullanılan ve kan beyin bariyerini geçebilen FDA onaylı ilaçlar yeniden incelenerek, farklı amaçlar için tasarlanmaktadır. Farklı hastalıkta etkileri değerlendirilen bu ilaçlar diğer bir kanser türünde de benzer yolakları değiştirilebilir, hatta malign glioma tedavisinde kullanılabilir (Gupta ve diğ., 2013).

Temodar[®], Temodal, Temcad, Temomid, Temozolid ya da Midizol gibi ticari isimleriyle piyasada bulunan temozolomid (TMZ), beyin kanseri tedavisinde kullanılan ve kan-beyin bariyerini geçebilen kemoterapötik bir ilaçtır. Kimyasal adı 3,4-dihidro-3-metil-4-oksoimidazol[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-8-karboksiamid (Şekil 2.4) olan TMZ bir imidazol derivatifi olup, ikinci nesil DNA alkilleyici ajandır (Mutter ve Stupp, 2006). Standart tedaviden sonra tekrar nüks eden glioblastomalı hastaların tedavisi için Avrupa İlaç Ajansları tarafından sertifikalandırılmıştır. Anaplastik astrositomalı hastaların bir nitrozüre ilacı (BiCNU veya CCNU) ve prokarbazin içeren tedavisinden sonra hastalığın nüks etmesi durumunda, tedavide

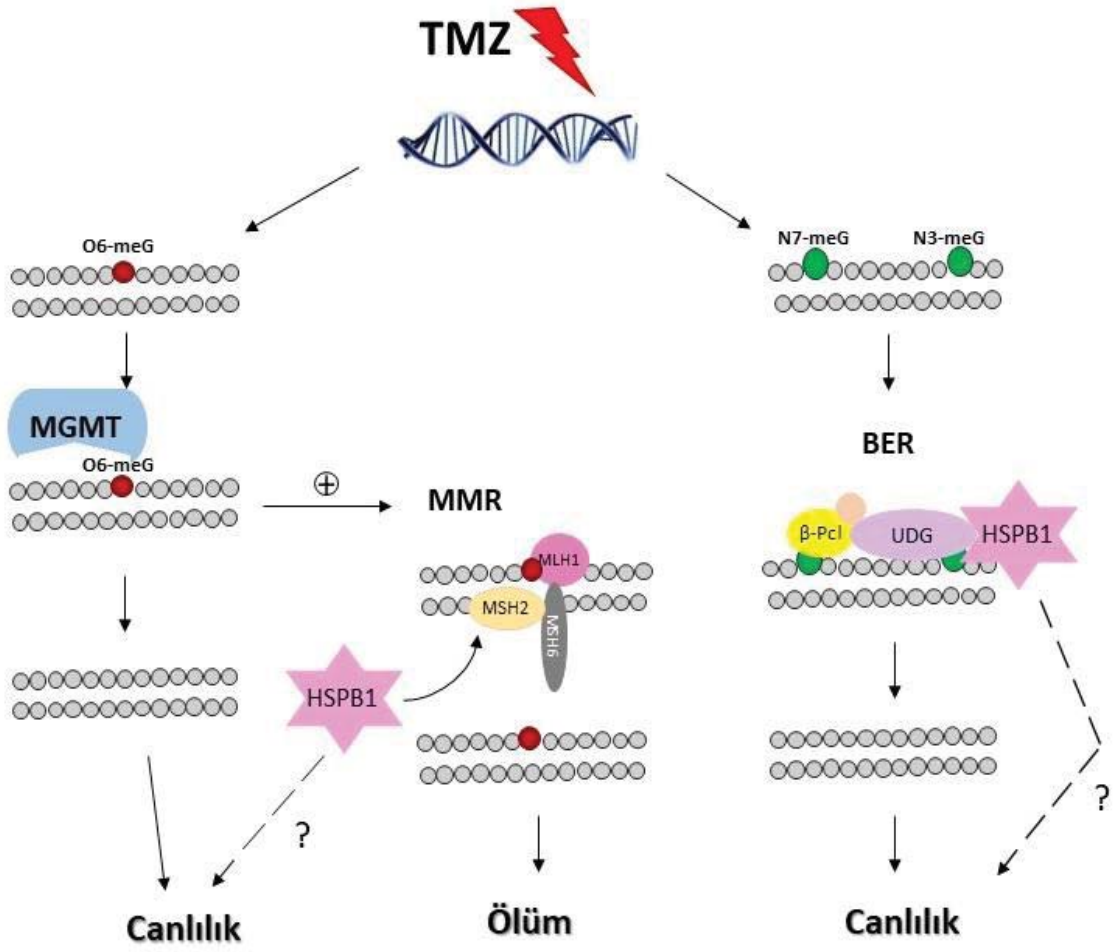
kullanımı için FDA onayını almıştır (Newlands ve diğ., 1997; Friedman ve diğ., 2000). TMZ cerrahi rezeksiyon ve radyoterapiye eklendiğinde medyan sağkalımını 14.6 aya, 2 yıllık sağkalım oranını ise % 10'dan % 27'ye çıkarmaktadır (Stupp ve diğ. 2005).



Şekil 2.4: Temozolomidin kimyasal yapısı.

Bu ilaç, hücrelerde DNA üzerinde O⁶-metilguanin (O⁶-meG) oluşumuna neden olmaktadır. Bu da glioma hücrelerinin G2/M fazının tutuklu kalmasına ve sonuçta ölümüne neden olmaktadır. Hücredeki MGMT anlatımının azalması ve MGMT geni promotör metilasyonu TMZ'ye karşı hassasiyeti artırmaktadır. Çalışmalar MGMT'nin bu hassasiyeti arttıran tek etmen olmadığını göstermiştir. Son çalışmalar Hsp27 inhibisyonunun da glioma hücrelerindeki TMZ'ye karşı hassasiyeti arttırdığını göstermiştir (Sang ve diğ., 2014).

TMZ uygulaması sonrası glioma hücrelerinde Hsp27 (HSPB1) proteininin DNA hata mekanizmasındaki rolü incelendiğinde; TMZ'nin, O⁶-metilguanin ve N⁷-metilguanin (N⁷-meG) gibi sitotoksik DNA lezyonlarına yol açtığı görülmüştür. MGMT hücrenin hayatta kalmasına neden olan O⁶-meG kalıntılarını ortadan kaldırmaktadır. MGMT hata onarım sisteminden kaçan hücrelerde yanlış baz eşleşmesi varsa replikasyon sırasında MMR sistemi tarafından tanınmakta, bu da hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Ancak hata, baz kesip çıkarma onarım ("Base Excision Repair", BER) sisteminde ise hücre hayatta kalmaktadır. TMZ uygulaması MSH2 – Hsp27 etkileşimi ile MMR sistemi üzerinde etkili olmakta, böylece malignant glioma hücreleri yok edilebilmektedir (Şekil 2.5) (Castro ve diğ., 2015).



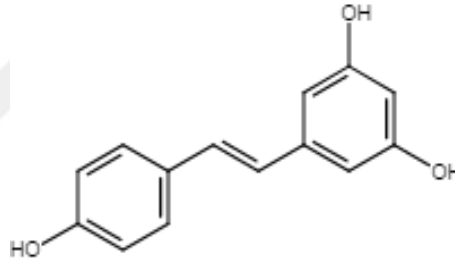
Şekil 2.5: İnsan glioma hücrelerinde temozolomidle indüklenen DNA onarım sistemlerinde Hsp27'nin rolü (Castro ve diğ., 2015).

Castro ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2015); TMZ uygulaması sonrasında MGMT, MSH2, Hsp70 ve Hsp27 anlatımlarının anlamlı derecede arttığı ve MSH2 ile Hsp27 proteinlerinin birlikte nukleusta yeniden lokalize olduğu gösterilmiştir. Temozolomid uygulaması sonrasında, U-87 MG, Gli36, DBTRG hücrelerinde yüksek düzeyde Hsp27 anlatımı görülürken, Gli36 ve DBTRG hücrelerinde ise Hsp70 seviyesinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Jakubowicz-Gil ve diğ. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, T98G glioblastoma hücrelerinde, TMZ ile kersetinin birlikte kullanımının Hsp27 ve Hsp70 proteinlerinin anlatımını inhibe ettiği bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada, TMZ tedavisinin, U-87 MG hücre hattındaki Hsp70 anlatım seviyelerinde herhangi bir değişime neden olmadığı gösterilmiştir (Paolini ve diğ. 2011). Sonuçlar, temozolomidin farklı glioma hücrelerinde farklı

tepkilere neden olduğunu ortaya koymuş ve moleküler heterojenliğin, mevcut terapötik tedavilerin nasıl başarısız olduğunu anlamada önemli olabileceğini göstermiştir (Chorny ve diğ., 2000).

2.5. RESVERATROL

Doğal bir polifenolik bileşik olan resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben), çoğunlukla üzümde, yer fıstığında ve kırmızı şarapta bulunan güçlü bir antioksidandır (Şekil 2.6). Bu bileşik ilk olarak 1939'da Michio Takaoka tarafından *Veratrum grandiflorum* bitkisinin köklerinden izole edilmiştir. Resveratrol adındaki res- resveratrolün bir derivatifi olan resorkinol bileşiğinden, -veratr- *Veratrum* bitkisinden gelmekte, -ol eki ise hidroksil gruplarının varlığını işaret etmektedir. Bu bileşik temozolomid gibi kan-beyin bariyerini geçebilmektedir (Yuan ve diğ., 2012).



Şekil 2.6: Resveratrolün kimyasal yapısı.

Çeşitli kanser tipleri üzerinde antiproliferatif etkileri olduğu gösterilen (Cucciolla ve diğ., 2007; Wang ve diğ., 2002; Gerszon ve diğ., 2014) resveratrolün düşük toksisitesi, insanlarda yan etkileri olmadan nispeten yüksek dozlarda kullanılmasını mümkün kılar. Bununla birlikte, antioksidan ve antimutajenik olarak etki edebildiği, anti-enflamatuar etkilere aracılık ettiği, siklooksijenaz ve hidroperoksidazı inhibe ettiği ve hücre farklılaşmasını indüklediği bilinmektedir. Ayrıca anti-artrit, anti-diyabetik, anti-astım, nöro-koruyucu, hepato-koruyucu, kardiyokoruyucu ve yaşlanma karşıtı biyolojik etkilerinin de bulunduğu bildirilmiştir (Jang ve diğ., 1997; Pandey ve Rizvi, 2011; Yuan ve diğ., 2012) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: Resveratrolün biyolojik etkileri.

Vinkristin, adriamisin, doksorubisin, paklitaksel ve gemsitabin gibi çeşitli ajanlarla birlikte uygulanan resveratrolün, oral epidermoid karsinoma, akut miyeloid lösemi, akciğer karsinoma ve pankreas kanseri hücrelerinde kemoterapötik ilaçlara karşı duyarlılığı arttırdığı gösterilmiştir (Kubota ve diğ., 2003; Quan ve diğ., 2008; Kweon ve diğ., 2010; Harikumar ve diğ., 2010). Bu maddenin oksidatif stresin zararlı etkilerini azalttığı da bilinmektedir. Resveratrol kaspaz-3, kaspaz-9 aktivasyonunu sağlamakta ve mitokondriden sitoplazmaya sitokrom-c salımını indüklemektedir (Fremont, 2000; Jiang ve diğ., 2005).

Tümöre özgü moleküler hedefli tedaviler, geleneksel kemoterapötiklerden daha etkili sonuçlar ortaya koyabilir. Yakın zamanda geliştirilen terapötik stratejiler, bazı glioma sinyal yollarını hedeflemeye odaklanmıştır. Bununla birlikte, moleküler çeşitlilik, heterojenlik ve malign glioma ile bağlantılı sinyal yollarının sayısı göz önüne alındığında, tek bir ajanın, bir tümör grubundan fazlasında etkinlik göstermesi olasılığı azalmaktadır. Bu terapötik engellerin üstesinden gelebilmek amacıyla, kombine tedaviler öne çıkarılmıştır. Bu süreçleri eş zamanlı olarak engelleyebilen çoklu ajanların kullanımının, tedavide daha etkili sonuçlar ortaya koyabileceği bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Thaker ve Pollack, 2009; Ghosh ve diğ., 2018).

Günümüzde, standart tedavinin (cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve kemoterapi) yanı sıra, beyin kanseri tedavisinin etkinliği arttırmak için çok sayıda doğal ürün denenmektedir (Filippi-Chiela

ve diğ., 2013; Jakubowicz-Gil ve diğ., 2013). Özellikle ilaçlarla birlikte kullanılabilen maddelerle gerçekleştirilen kombine tedavi yaklaşımları sayesinde kemoterapötik ajanların hastalara uygulanan dozunu azaltmak, etkisini arttırmak ve olası ilaç direncini azaltmak mümkün hale gelmiştir. Bununla birlikte sağlıklı hücreler üzerindeki olumsuz toksik etkilerin azaltılması sağlanabilmiştir (Ferreira ve diğ., 2018).

2.6. STRES PROTEİNLERİ VE KANSER

Isı şoku proteinleri (“Heat Shock Protein”, HSP) olarak da adlandırılan stres proteinleri, ısı şoku, oksidatif stres, radyasyon, ağır metaller, toksinler ve kemoterapi gibi stres faktörlerine maruz kalan hücrelerde anlatımı artan ve evrimsel olarak korunmuş olan geniş bir protein ailesidir. Stres proteinleri moleküler ağırlıklarına göre altı sınıfa ayrılmaktadırlar: Küçük HSP ailesi (sHSP), HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 ve HSP100 (Benjamin ve McMillan, 1998; Snoeckx ve diğ., 2001).

HSP’ler, hücreler strese maruz kaldıklarında, hasarlı proteinlerin ortadan kaldırılmasında ve yanlış katlanan proteinlerin yeniden katlanmasının düzenlenmesinde rol oynarlar. Hücreleri strese bağlı hasarlardan koruyan HSP’ler, diğer proteinlerin yapılarını ve etkileşimlerini değiştirme özelliğine sahip olan moleküler şaperonlar olarak da tanımlanmıştır. Şaperon işlevi esas olarak, hücreyi ve hücredeki protein homeostazını korumaktan sorumludur (Heinrich ve diğ., 2016).

Isı ile anlatımları indüklenen HSP’ler dışında, hücrelerde yapısal olarak anlatımı gerçekleştirilen çok sayıda HSP bulunmaktadır. Son çalışmalar, yapısal HSP’lerin, HSP ve kofaktörleri içeren çoklu protein komplekslerinde bulunduğunu göstermiştir. Bunlar, hem protein katlanma yollarında hem de hücre içindeki anahtar düzenleyici proteinlerle spesifik işbirliğinde yer alan Hsp70/Hsp90 kompleksleri ile protein katlanmasına aracılık eden Hsp10 ve Hsp60 komplekslerini içermektedir. Özellikle Hsp90, hücre regülasyonunda, çok sayıda hücre kinaz, transkripsiyon faktörü ve diğer molekülleri içeren kompleksler oluşturarak çok yönlü bir rol oynamaktadır (Ciocca ve Calderwood, 2005).

Tümör hücresi proliferasyonu, farklılaşması, invazyonu, metastazı, ölümü ve bağışıklık sistemi tarafından tanınmasıyla yakından ilişkili oldukları bilinen farklı HSP’lerin birçok kanser türünde yüksek seviyede anlatım yaptığı gösterilmiştir (Heinrich ve diğ., 2016; Önay Uçar ve diğ., 2018). HSP’lerin aşırı anlatımı, sağkalım ve tedaviye yanıt açısından kötü prognozu işaret

etmektedir. Özellikle malignant hücrelerde artan HSP anlatımı, malignite ile ilişkili spontan apoptozdan korunmanın yanı sıra, tümör gelişiminde ve terapiyle oluşturulan apoptozdan korunmada da kilit bir rol üstlenmektedir (Nylandsted ve diğ., 2000; Ciocca ve Calderwood, 2005).

HSP genlerinin transkripsiyonu, ısı şoku faktörü ("Heat Shock Factor", HSF) ailesine ait transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenmektedir. HSF ailesi, stres cevabının moleküler koordinatörü olan HSF1, HSF2 ve HSF4'ü içermektedir (Wu, 1995; Morimoto, 1998). HSP transkripsiyonu, kanserde yüksek miktarda eksprese edilen ve metastazda rol oynayan aktif haldeki HSF1'i gerektirmektedir. HSP'ler, normal hücrelerde sadece stres koşulları altında indüklenmektedir, ancak malign fenotip bazı durumlarda HSP anlatımının indüklenmesine neden olmaktadır (Ciocca ve Calderwood, 2005).

HSP seviyeleri tanı düzeyinde bilgilendirici olmasa da yararlı biyobelirteçler olarak kabul edilmekte, bazı kanserlerin farklılaşma derecesini ve agresifliğini işaret etmektedir. Artan HSP anlatımı, bazı antikanser tedavilere karşı yanıtı da ortaya koyabilmektedir (Ciocca ve Calderwood, 2005). Bu nedenle HSP'lerin inhibisyonu kanser tedavisinde önemli bir strateji olarak kabul edilmektedir ve bu amaçla birçok HSP inhibitörü geliştirilmektedir. Yapılan bir çalışmada Hsp90 inhibitörü olduğu bilinen Geldanamisin ve 17-AAG, gliomalara karşı, geleneksel sitotoksik kemoterapötik ajanların yanı sıra diğer sinyal modülatörlerinin etkinliğini arttırmak amacıyla kullanılmış ve etkili sonuçlar alınmıştır (Premkumar ve diğ., 2006; Graner ve Bigner, 2007).

2.6.1. Stres Proteinlerinin Sınıflandırması

Hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunan ve evrimsel açıdan oldukça korunmuş olan stres proteinleri, biyolojik stres koşulları altında hücrelerin cevap mekanizmasında önemli rol oynamaktadır (Van Eden ve diğ., 2013). Bu proteinlerden 70 ve 90 kDa ağırlığındaki ısı şoku proteinlerinin (Hsp70 ve Hsp90) diğer proteinlerle olan etkileşimleri daha fazla olduğu bilinmektedir. Bu proteinlerin etkinleşmesi ve gen anlatım düzeylerinin düzenlenmesi üzerine yapılan birçok araştırma, hücre yaşam döngüsü ve onarım mekanizmalarında önemli roller üstlendiklerini vurgulamaktadır. Bu moleküllerin hücre içinde aktif hale gelebilmelerinde özellikle fosforilasyonun önemli olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (Datta ve diğ., 2017).

15-110 kDa aralığında farklı moleküler ağırlığa sahip olan HSP'ler hücre içinde sitosol, mitokondri, endoplazmik retikulum (ER) ve nükleusta bulunurlar. Hücrede yer alan ısı şoku proteinlerinin sınıfları, fonksiyonları ve hücre içi lokasyonları Tablo 2.4'te özetlenmektedir. Memelilerde üzerinde en fazla çalışılmış ve fonksiyonları ortaya çıkarılmış HSP'ler, 60, 70, 90 ve 110 kDa molekül ağırlığına sahip olan HSP'lerdir. Bu HSP'ler hücre içinde farklı lokasyonlarda bulunurlar ve çok farklı işlevsel özellikler gösterirler (Kregel, 2002).

Tablo 2.4: Isı şoku proteinlerinin fonksiyonları ve hücre içi lokasyonları (Kregel, 2002).

HSP Ailesi	Hücresel lokasyon	Fonksiyon
sHSP (HSP27)	Sitozol, nükleus	Mikrofilament stabilizasyonu, antiapoptotik
HSP60	Mitokondri	Proteinlerin yeniden katlanması, denatüre proteinlerin agregasyonunun önlenmesi, proapoptotik
HSP70 ailesi:		Antiapoptotik
HSP72 (Hsp70)	Sitozol, nükleus	Protein katlanması, hücresel koruma
HSP73 (Hsc70)	Sitozol, nükleus	Moleküler şaperonlar
HSP75 (mHSP70)	Mitokondri	Moleküler şaperonlar
HSP78 (GRP78)	ER	Hücresel koruma, moleküler şaperonlar
HSP90	Sitozol, ER, nükleus	Steroid hormon reseptörlerinin düzenlenmesi, protein translokasyonu
HSP110/104	Sitozol	Protein katlanması

2.6.2. Hsp27

Molekül ağırlığı 27 kDa olan küçük ısı şoku proteini (Hsp27), gelişimde, stres yanıtında ve başta kanser olmak üzere birçok hastalıkta moleküler şaperon olarak görev almaktadır (Heinrich ve diğ., 2016). Küçük HSP'lerin (sHsp) anlatım seviyelerinin kanser dışında; hücre içinde proteotoksik hasarın arttığı bilinen nörolojik hastalıklar, miyopati ve MS gibi hastalıklarla ilişkili olarak da arttığı gösterilmiştir (Haslbeck ve diğ., 2019).

Sinyal iletim mekanizmasında görev yapan Hsp27, kinazlar tarafından fosforile edilerek aktifleşir ve sonuçta birçok proteinin aktivasyon/inhibisyon mekanizmasında rol alır. İnsanlarda bulunan Hsp27 türü üç adet fosforilasyon bölgesi içermektedir (Ser-15, Ser-78, and Ser-82). Bu bölgeler MAPK yolağında bulunan protein kinazlar tarafından aktive edilmektedir (Haslbeck ve diğ., 2019).

Hsp27 proteininin, apoptotik sinyal yollarıyla da ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu protein, özellikle oksidatif stresin azalmasında ve apoptozun baskılanmasında rol oynamaktadır. Hücrede artmış Hsp27 seviyesinin, hücre içi ROT miktarının ve demir seviyelerinin azalmasıyla ve glutatyon seviyesinin artmasıyla da yakından ilişkili olduğu belirtilmektedir (Vidyasagar ve diğ., 2012).

Hsp27 anlatım seviyeleri, glioma (Castro ve diğ., 2015), pankreas (Xia ve diğ., 2009), meme (Kang ve diğ., 2008), karaciğer (Feng ve diğ., 2005) ve mesane (Kamada ve diğ., 2007) gibi birçok kanser türünde artış göstermektedir. Bu protein kanser hücrelerinde artış gösterirken aynı zamanda ilaç direncinde de rol oynamaktadır. Bu proteinin, Chauhan ve diğ. (2004) multipl miyeloma hücrelerinde deksametazon direnciyle, Kamada ve diğ. (2007) mesane kanseri hücrelerinde paklitaksel direnciyle, Kuramitsu ve diğ. (2012) pankreas kanseri hücrelerinde gemsitabin direnciyle, Castro ve diğ. (2015) ise glioma hücrelerinde TMZ direnciyle ilişkili olduğunu bildirmektedir.

Yapılan bazı çalışmalarda, Hsp27'nin anlatımının baskılanmasının kanser hücrelerindeki ilaç direncini azalttığı gösterilmiştir. Hsp27 hedefli terapilerin, kanser tedavisinde umut verici bir strateji haline gelmesi, Hsp27 anlatımını baskılamak amacıyla çeşitli ajanların kullanımını öne çıkarmıştır. Glioma hücrelerinde yapılan bir çalışmada, pAKT inhibitörü kullanılarak Hsp27'nin inhibe edilmesinin, hücredeki TMZ kemosenesivitesini arttığı gösterilmiştir (Schultz ve diğ., 2012). Glioma hücrelerinde Hsp27 inhibisyonu için gerçekleştirilen diğer bir strateji de, kersetin (Jakubowicz-Gil ve diğ., 2010; Sang ve diğ., 2014) ve resveratrol (Önay Uçar ve Şengelen, 2019) gibi doğal ürünlerin kullanımınıdır. Bu proteinlerin anlatımının baskılanması amacıyla siRNA uygulaması gibi moleküler tekniklerden de faydalanılmaktadır. Glioma hücrelerinde, rozmarinik asit ve siRNA'nın kombine şekilde uygulandığı bir çalışmada, Hsp27 anlatımının baskılandığı ve bu hücrelerde apoptozun indüklendiği gösterilmiştir (Şengelen ve Önay Uçar, 2018).

2.6.3. Hsp70

Hsp70 proteini yaklaşık 70 kDa ağırlığında (66-78 kDa) olan diğer bir ailenin üyesidir. Bu protein, Hsp90 proteini ile birlikte diğer proteinlerin aktivasyonunda rol almakta ve hücre içi sinyal mekanizmasının işleyişinde önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir (Önay Uçar ve diğ., 2018; Haslbeck ve diğ., 2019).

Hsp70 proteinlerinin glioma (Takano ve diğ., 1997), kolorektal adenokarsinoma (Dundas ve diğ., 2005) ve hepatoselüler karsinoma (Yi ve diğ., 2008) gibi birçok kanser türünde anlatımının arttığı bildirilmiştir. Hsp70 proteininin kanserli hücrelerde proliferasyonu arttırdığı, apoptozu inhibe ettiği, kemoterapötik ilaçlara karşı direnç oluşturduğu ve metastazın arttırdığı bilinmektedir (Ciocca ve Calderwood, 2005; Önay Uçar ve diğ., 2018). Fare modellerinde Hsp70 proteini fazlalığında tümör boyutunun ve metastaz potansiyelinin arttığı gözlemlenmiştir (Rérole ve diğ., 2011).

Tümör hücrelerinde Hsp70 anlatımının baskılanması, aynı Hsp27'de olduğu gibi, kanser tedavisi için önemli bir hedef kabul edilmektedir. Hücre içinde Hsp70 ile etkileşime giren moleküllerin belirlenmesi ve Hsp70 proteinlerinin etki mekanizmalarının tam olarak ortaya konulabilmesi amacıyla çalışmalar halen devam etmektedir.

Hsp70 proteinlerinin anlatımlarının düzenlenmesinde çeşitli doğal ürünlerin ya da ajanların kullanıldığı birçok çalışma vardır. Örneğin kersetin kullanımıyla glioma (Jakubowicz-Gil ve diğ., 2013), serviks (Badziul ve diğ., 2014) gibi kanser türlerinde Hsp70 inhibisyonu sağlanmış ve dolayısıyla kanser hücrelerinin apoptozla gittikleri gözlenmiştir. K562 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, resveratrol kullanımıyla Hsp70 inhibisyonu sağlanmıştır (Banerjee Mustafi ve diğ., 2010). Bununla birlikte bazı Hsp90 inhibitörlerinin, Hsp70 protein anlatım seviyesini değiştirdiği gösterilmiştir (Önay Uçar ve diğ., 2018; Haslbeck ve diğ., 2019).

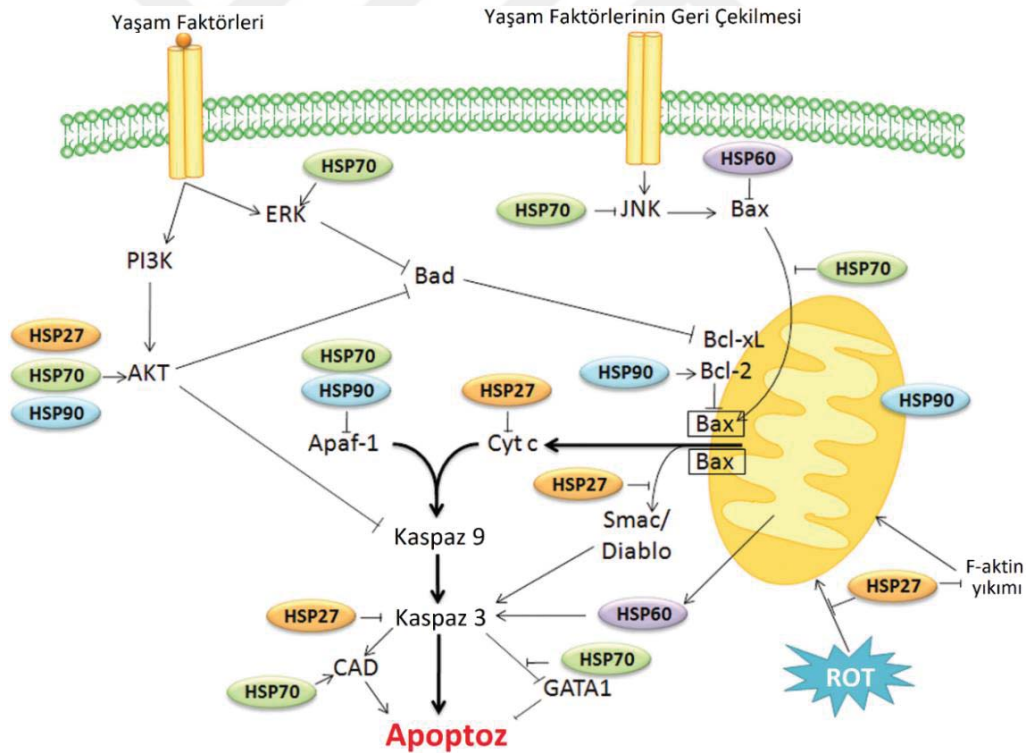
Hsp70 inhibisyonuna yönelik, CRISPR/Cas9 moleküler tekniklerinin kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmalarda meme, kolorektal ve akciğer kanser hücrelerinde Hsp70 anlatımının susturulduğu ve kanser hücrelerinin apoptozla yönlendiği gösterilmiştir (Gehrmann ve diğ., 2014; Murakami ve diğ., 2015). Hsp70 anlatımının siRNA aracılığıyla baskılandığı diğer bir çalışmada, uygulanan terapiye karşı kanser hücrelerinin duyarlılığını arttırdığı ortaya konulmuştur (Powers ve diğ., 2009).

2.7. APOPTOZ VE KANSER

Programlanmış bir hücre ölüm biçimi olan apoptoz, hücrelerin, kendi kendini yok etme kaskadına aktif olarak katılımıyla gerçekleşen karmaşık bir süreçtir. Apoptoz inhibisyonu ise başta kanser, nörodejeneratif hastalıklar, otoimmün hastalıklar olmak üzere birçok hastalıkla ilişkilidir ve kontrolsüz hücre proliferasyonuna yol açmaktadır. Apoptoz, kansere karşı etkili bir savunmadır, ancak tümör hücreleri, apoptozla karşı direnç kazanabilmektedir. Bu hücrelerin

yok edilmesinde apoptoz, fizyolojik bir mekanizma sağlar ve apoptozu etkileyecek terapötik faktörlerin belirlenmesi bu hücrelere karşı önemli etkiler yaratılmasına yardımcı olabilir (Saikumar ve diğ., 1999; Watson ve diğ., 2000).

Hücre ölüm mekanizmasında çeşitli hücre içi ve hücre dışı faktörler önemli rol oynamaktadır. Jnk yolağının aktifleşmesini takiben hücre içerisinde denge mekanizmasının kurulamaması (DNA hasarı, hücre içi ROT seviyesinin artışı vb.) ve yaşam faktörlerinin yetersiz kalması hücreyi apoptozla yönlendirmektedir. Bu aşamada bazı stres proteinleri hücrelerin apoptozla gitmesini engelleyebilmektedir. Hücre içi faktörler nedeniyle mitokondriden sitokrom c salınımı, Apaf-1 ile birlikte sitozolik kompleksin oluşumunu sağlamaktadır. Böylece prokaspaz-3 (cas-3) ve prokaspaz-9 (cas-9) aktif hale gelmektedir. Ancak Hsp27, sitokrom c inhibisyonunu sağlayarak ya da cas-3 aktivitesini direkt olarak baskılayarak hücrenin apoptozla yönelmesini inhibe etmektedir (Şekil 2.8) (Lanneau ve diğ., 2008).



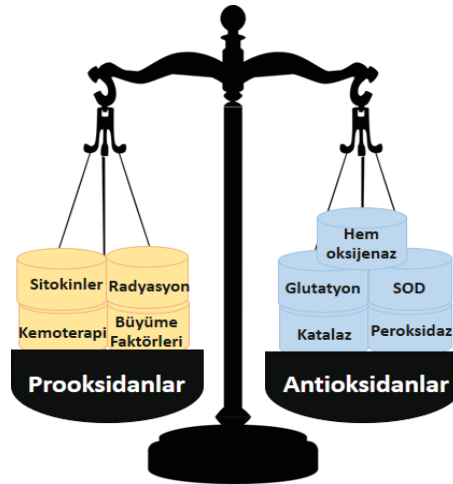
Şekil 2.8: HSP'lerin düzenleyici fonksiyonu ve apoptozla ilişkisi (Lanneau ve diğ., 2008).

Isı şoku proteinlerinin Apaf-1 ve kaspaz-3 gibi anahtar apoptoz molekülleri ile etkileşerek kontrollü hücre ölümünü baskılayabildiği bilinmektedir (Beere ve diğ., 2000). Kanser

hastalığında proteotoksik koşullara uyumu kolaylaştıran HSP'lerin hücre içerisindeki anlatım seviyelerinin kontrol altına alınması, günümüzde hedef tedavi stratejileri arasında yer almaktadır. Bu aşamada protein ve gen anlatımı düzeyinde HSP'lerin anlatım seviyelerinin kontrol edilebilmesi kanser tedavisine yönelik başarı sağlayabilecektir (Dai ve diğ., 2012).

2.8. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ VE KANSER

Serbest radikaller, bir ya da daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron çiftine sahip yüksek enerjili atom ve moleküller olarak tanımlanmaktadır. Reaktif oksijen türleri ise (ROT) oksidatif stres sonucunda oluşan çeşitli serbest radikaller ve hidrojen peroksit gibi radikal olmayan ara ürünlerdir. ROT'lar hem süperoksit anyonu, hidroksil, peroksil, hidroperoksil ve alkoksil gibi radikalleri; hem de hidrojen peroksit, hipoklorik asit singlet oksijen, peroksinitrit ve ozon gibi radikal olmayan ürünleri kapsar. Endojen ya da eksojen kaynaklı oksidanlara maruz kalan hücrelerde serbest radikal ve ROT miktarı artmaktadır. Organizmada, bu moleküllerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla iş gören ve **antioksidanlar** olarak adlandırılan çeşitli koruyucu mekanizmalar bulunmaktadır. Oksidan-antioksidan dengesinin bozulması hücrede oksidatif strese yol açmaktadır. Normal koşullar altında hücrede antioksidanlar oksidanlara karşı üstündür, ancak oksidatif stres koşullarında prooksidanlar bu dengeyi bozarak baskın hale geçerler ve sonuçta kanser başta olmak üzere birçok hastalığa neden olurlar (Şekil 2.9) (Halliwell ve Gutteridge, 2003; Reuter ve diğ., 2010).

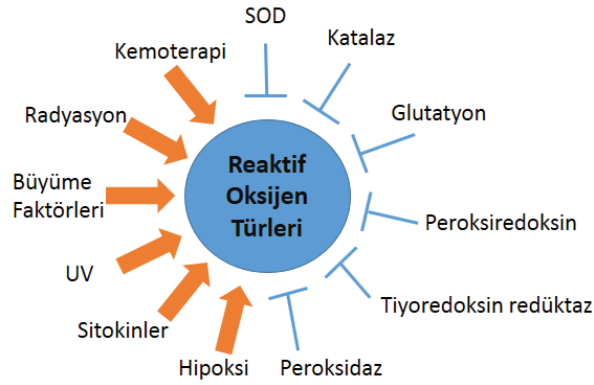


Şekil 2.9: Prooksidanlar ile antioksidanlar arasındaki denge (Reuter ve diğ., 2010).

Kanserli hücrelerin oluşumu, çoğalmaları ve gelişimi aşamalarında oksidatif stresin rol aldığı yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Başlangıç aşamasında DNA üzerinde değişimlere ve mutasyonlara sebep olduğu, çoğalma aşamasında gen anlatım seviyeleri üzerine etkili olduğu ve hücrelerin iletişim mekanizmalarını bozduğu, gelişme aşamasında ise daha fazla hücrenin DNA yapısı üzerindeki değişimlere neden olduğu bu çalışmalarda ortaya konulmuştur (Schulte-Hermann ve diğ., 1990; Visconti ve Grieco, 2009).

Oksidatif stres koşulları, hücre içerisinde bulunan tüm makromoleküller için tehlike arz etmektedir. Özellikle oksidatif stres sonucu protein ve lipid yapısı bozulan hücrelerde, mutasyon oranının arttığı bilinmektedir (Sies, 1991; Reuter ve diğ., 2010). Maruz kalınan oksidatif stres koşullarına yanıt olarak hücreler tarafından devreye sokulan antioksidan mekanizmalar, enzimatik (Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, katalaz vb.) ve enzimatik olmayan moleküller (Glutatyon (GSH), C Vitamini, β -karoten) aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.9) (Reuter ve diğ., 2010).

ROT'ların uzaklaştırılması için hücre içerisinde görev yapan çeşitli enzimler bulunmaktadır. Kemoterapi, radyasyon, büyüme faktörleri gibi etmenler hücre içinde ROT oluşumunu artırırken; katalaz, peroksidaz gibi enzimler ya da enzimatik olmayan antioksidanlar ROT oluşumunda inhibitör görevi görmektedir (Şekil 2.10) (Reuter ve diğ., 2010).



Şekil 2.10: ROT oluşumunda rol oynayan bazı aktivatör ve inhibitörler (Reuter ve diğ., 2010).

2.9. GLUTATYON VE KANSER

Glutatyon (GSH, γ -Glu-Cys-Gly), tripeptid yapıda, önemli bir hücre içi enzimatik olmayan antioksidan moleküldür ve radikal aracılı hasarın önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır

(Pompella ve diğ., 2003). Özellikle ROT'ların ve elektrofilik kimyasalların DNA'ya verdiği zararı glutatyonun engelleyebildiği bildirilmektedir (Valko ve diğ., 2007).

Glutatyon, oksidatif strese karşı oldukça önemli antioksidan enzim olan glutatyon peroksidaz gibi çeşitli enzimlerin de koenzimi olarak görev yapmaktadır. H_2O_2 detoksifikasyonunda iş gören ve selenyum içeren glutatyon peroksidaz, indirgenmiş glutatyonu H_2O_2 ile oksitleyerek oksitlenmiş glutatyon (GSSG) dönüştürmektedir. Glutatyon redüktaz enzimi ise GSSG'nin GSH'ye dönüşümünde rol oynamaktadır (Deponte, 2013).

Oksidatif strese maruz kalan hücrede, indirgenmiş glutatyon azalırken oksitlenmiş glutatyon (GSSG) seviyesi artmaktadır. Özellikle kemoterapiye direnç gösteren hücrelerde glutatyonun yüksek seviyede olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Calvert ve diğ., 1998.; Estrela ve diğ., 2006; Browne ve Armstrong, 1998).

GSH, hücre farklılaşması, proliferasyon ve apoptoz gibi birçok hücrel süreçte önemli bir rol üstlenmektedir. GSH homeostazındaki bozukluklar, kanser dahil birçok insan hastalığının ilerlemesine sebep olmaktadır. GSH eksikliği veya GSH / GSSG oranındaki bir düşüş, kanserin ilerlemesine neden olan oksidatif strese karşı, hücredeki duyarlılığın artmasına yol açmaktadır. Birçok kanser hücresinde gözlenen yüksek GSH seviyesi, bu hücrelerin antioksidan kapasitesini ve oksidatif strese karşı dirençlerini arttırmaktadır. Bu açıdan, kanser tedavisinde GSH seviyesini düşürmeye yönelik kullanılan yeni antikanser madde/ajanların saptanması ve GSH'ın ilaç direnci üzerindeki etkilerine ilişkin moleküler yolların aydınlatılması önem kazanmaktadır (Traverso ve diğ., 2013).

2.10. DNA HASARI VE KANSER

Organizma, DNA'ya zarar veren ve sağlığı olumsuz yönde etkileyerek hastalıklara sebep olabilen sayısız maddeye ya da ajana maruz kalmaktadır. DNA hasarları temelde orijinlerine göre endojen ve eksojen olarak iki sınıfa ayrılmaktadır (Chatterjee ve Walker, 2017):

Endojen DNA Hasarı: Replikasyon sırasında, DNA baz eşleşmeleri sırasında ve topoizomeraz–DNA kompleksleri oluşumu sırasında, normalden farklı bir DNA metilasyonu ve ROT dengesinde ortaya çıkabilecek bir değişim hücre içerisinde DNA hasarına sebep olmaktadır. Örneğin ROT türleri arasında yer alan $OH^\cdot$ radikallerinin, DNA üzerinde hasara neden olduğu bilinmektedir. Metilasyon profillerinin çevresel etmenler ile değişimi de, DNA

onarım mekanizmalarının işlemlerini önleyerek kalıcı hasarlara, dolayısıyla çeşitli hastalıklara sebep olabilmektedir (Chatterjee ve Walker, 2017).

Eksojen DNA Hasarı: İyonize radyasyon, UV radyasyon, kimyasal ajanlar (alkilleyici ajanlar, aromatik aminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, reaktif elektrofiller), toksinler ve çevresel stres faktörleri eksojen DNA hasarlarına neden olan etmenler arasında yer almaktadır (Chatterjee ve Walker, 2017).

Hücrelerde DNA'yı hasarlara karşı korumak amacıyla DNA onarım mekanizmaları bulunmaktadır ve sağlam bir onarım mekanizması, oluşan hasarı ortadan kaldırmakta ya da tolere etmekte hücreye yardımcı olmaktadır. DNA hasarı onarımında iş gören farklı DNA onarım sistemleri Tablo 2.5'te verilmiştir.

Tablo 2.5: DNA hasarlarının onarımında iş gören farklı DNA onarım sistemleri (Torgovnick ve Schumacher, 2015).

Onarım Mekanizması	Lezyon Özelliği	Genotoksik Kaynaklar
Baz kesip çıkarma onarımı (BER)	Oksidatif lezyonlar	ROT
Nükleotid kesip çıkarma onarımı (NER)	Heliks yapısı bozulmuş lezyonlar	UV radyasyon
Translezyon sentezi	Çeşitli lezyonlar	Çeşitli kaynaklar
Yanlış eşleşme onarımı (MMR)	Replikasyon hataları	Replikasyon
Tek zincir kırığı onarımı (SSBR)	Tek zincir kırığı	İyonize radyasyon, ROT
Homolog rekombinasyon (HR)	Çift zincir kırığı	İyonize radyasyon, ROT
Homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ)	Çift zincir kırığı	İyonize radyasyon, ROT
Zincirler arası çapraz bağ onarımı (ICL)	Zincirler arası çapraz bağlar	Kemoterapi

Hücrede onarılamayan DNA hasarı, hücre döngüsünün durmasına, hücrenin yaşlanmasına veya apoptoza yönelmesine neden olabilmektedir. DNA hasarı sonrasında gerçekleşen hatalı bir DNA onarımında, onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin etkilendiği çeşitli mutasyonlar ve kromozomal aberasyonlar ortaya çıkmaktadır. Bu hücreler kanserleşme sürecine girerek malignant transformasyona uğramaktadır (Hechtman ve diğ., 2019). Farklı DNA onarım sistemindeki mutasyonların, çeşitli kanser tiplerinin gelişiminde etkili olduğu bilinmektedir (Curtin ve diğ., 2012). Bununla birlikte, DNA hasarı sadece kanser gelişimine yol açmamakta, aynı zamanda kemoterapi ve radyoterapi uygulanarak kanser hücrelerinin tedavisinde önemli

bir avantaj sağlamaktadır. Bu bağlamda kanser tedavisinde, tümör hücresinin gelişimini durdurmak ve apoptotik ölümünü indüklemek amacıyla DNA hasar kontrol noktalarını tetikleyen çeşitli genotoksik ajanlar uygulanmaktadır (Torgovnick ve Schumacher, 2015).

Birçok antikanser ilaç ve iyonize radyasyon, DNA çift zincir kırıklarını indüklemektedir. Bu kırıkların onarımı kanser hücresinin hayatta kalma şansını arttırmaktadır. Oldukça toksik olan çift zincir kırıklarının onarımında iş gören proteinlerin baskılanması, kanser tedavisinde önemli hale gelmiştir (Belzile ve diğ., 2006).

Temozolomid gibi alkilleyici ilaçlar, DNA üzerinde birçok bölgede metilasyonu indüklemektedir. DNA'da oluşan O⁶-metilguanin normalde MGMT enzimi aracılığıyla tamir edilmektedir. MGMT metilasyonu ile daha iyi bir prognoz ortaya çıkmaktadır (Günther ve diğ., 2003). Hücrede MGMT eksikliği varsa, ATM/ATR-Chk1/Chk2 sinyal yolağının aktivasyonu ve çift zincir kırıklarının oluşumuyla MMR onarım mekanizması indüklenmekte, böylece hücre apoptoza yönlendirilmektedir (Günther ve diğ., 2003; Castro ve diğ., 2015).

DNA üzerinde hasar oluşumunun tespitine yönelik floresan (Comet, TUNEL, FISH vb.), kemilüminesans (ELISA vb.) ya da analitik temelli (HPLC vb.) birçok analiz tekniği kullanılmaktadır. Özellikle TUNEL ve Comet gibi yöntemler, çift zincir kırıklarının tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Figuerola-González ve Pérez-Plasencia, 2017).

2.11. PROTEİN HASARI VE KANSER

Yaşlanma ve birçok hastalıkla ilişkili olduğu bilinen protein oksidasyonu, proteinlerin doğrudan ROT'lar tarafından ya da dolaylı yoldan oksidatif stresin ikincil yan ürünleri tarafından hasara uğratılmasıyla ortaya çıkmaktadır (Linton ve diğ., 2001). Protein oksidasyonu, DNA hasarı gibi endojen veya eksojen kaynaklı çeşitli moleküller aracılığıyla oluşturulan, ROT miktarı ile orantılıdır. Oksidatif protein hasarına neden olan faktörler arasında hidrojen peroksit, hipoklorit, radyasyon, nitrik oksit, ozon, sülfür oksit vb. bulunmaktadır (Davies, 2016).

Protein karbonil gruplarının oluşumu, lizin, arginin, prolin ve histidin amino asitlerindeki oksidasyon neticesinde ortaya çıkmaktadır. Bu olay geri dönüşümsüzdür ve hücre ölümüne neden olabilmektedir. Özellikle doymamış bağ içeren proteinler, hasardan daha çok

etkilenmektedir. Yapılarında çok sayıda disülfid bağı bulunan proteinlerin de oksidasyon sonucu fonksiyon kaybına uğradığı bilinmektedir (Linton ve diğ., 2001; Davies, 2016).

Oksidatif protein hasarı, protein karbonil miktarındaki artış ile değerlendirilebilmektedir. Bu amaçla, dinitrofenilhidrazinin (DNPH) kullanıldığı spektrofotometrik ya da immünolojik yöntemler kullanılmaktadır. Ayrıca kapiler elektroforezle, radyoaktif etiketleme yöntemiyle ve “diode-array” ya da floresan dedektörlerin kullanıldığı HPLC ile bu protein karbonillerin belirlenmesi mümkündür (Purdell ve diğ., 2014).



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MALZEME VE CİHAZLAR

Bu tez kapsamında kullanılan bütün kimyasallar ve ticari kitler Tablo 3.1’de, cihazlar ise Tablo 3.2’de verildi.

Tablo 3.1: Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve ticari kitler.

Madde Adı	Marka	Kod
“Caspase-3 Colorimetric Activity Assay Kit”	Millipore	APT165
“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium / High Glucose” (DMEM/High Glucose)	Thermo Fisher Scientific	41966
“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium/Nutrient Mixture F12 Ham” (DMEM/F12 Ham)	Sigma Aldrich	D8900
“Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline” (PBS)	Sigma Aldrich	D5652
“Hank’s Balanced Salt Solution” (HBSS)	Sigma	H6648
“Oxyblot Protein Detection Kit”	Chemicon Int.	S7150
“Pierce™ ECL Western Blotting Substrate”	Thermo Fisher Scientific	32106
“SMART™ BCA Protein Assay Kit”	iNtRON Biotechnology	21071
β-Merkaptoetanol	AppliChem	A1108
Akrilamid	Biomatik	79-06-1
Antibiyotik-Antimikotik Solüsyonu [Streptomisin (100 U/ml), Penisilin (100 µg/ml), Amfoterisin B (0.25 µg/ml)]	Sigma Aldrich	A5955
APS (Amonyum Persülfat)	AppliChem	A2941.0500
Asetik Asit (Glasiyel)	Sigma	27225
Bis Akrilamid	Biomatik	A2214
Bromofenol Mavisi	Merck	108122
CM-H ₂ DCFDA (5-(and-6)-chloromethyl-2’,7’-dichlorodihydrofluorescein diacetate)	Thermo Fisher Scientific	C6827
Coomassie Parlak Mavisi R-250	Merck	112553
DMSO (Dimetil Sülfoksit)	Merck	116743
DTNB (5-5’-Ditiobis (2-Nitrobenzoik Asit))	Sigma	D8130
EDTA Disodyum Tuzu	Santa Cruz Biotechnology	sc-29092

Tablo 3.1: Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve ticari kitler (Devam).

Madde Adı	Marka	Kod
EDTA İçermeyen Proteaz İnhibitör Kokteyli	Roche	11873580001
Esansiyel Olmayan Amino Asit Solüsyonu ("Non-Essential Amino Acids", NEAA)	Thermo Fisher Scientific	11140
Etil Metansülfonat (EMS)	Merck	8.20774.0005
Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA)	Thermo Fisher Scientific	15576-028
Fenilmetilsülfonil Florür (PMSF)	AppliChem	A0999
Fetal Sığır Serumı ("Fetal Bovine Serum", FBS)	Thermo Fisher Scientific	10500
Glisin	AppliChem	A1067
Glutasyon (İndirgenmiş Form)	Sigma	G-6529
Hidroklorik Asit	Merck	100314
Metanol	Merck	106008
Meta-Fosforik Asit	Merck	1.00546.0100
MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür)	Serva	20395
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific	26619
Resveratrol	Santa Cruz Biotechnology	sc-200808
SLS (N-Lauroylsarcosine)	Sigma	L-5000
Sodyum Dihidrojen Fosfat Dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck	1.06345.1000
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Merck	817034
Sodyum Klorür	Merck	106404
Sodyum Sitrat	Fluka	71402
Sukroz	Amresco	0335
Temozolomid	Santa Cruz Biotechnology	sc-203292A
Tetrametiletildiamin (TEMED)	Fluka	87689
Tripsin	Sigma	T-4799
Tris-HCl	AppliChem	A3452
Triton X-100	Merck	108603
Trizma Baz	Sigma	T1503
Tween-20	Santa Cruz Biotechnology	sc-29113
Yağsız Süt tozu	Sigma	70166

Tablo 3.2: Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Marka
Chemidoc MP Görüntüleme Cihazı	Bio-Rad
Derin Dondurucu	Vestel
Dikey Elektroforez Sistemi	Bio-Rad
Floresan Mikroskop	Nikon Eclipse, Ti-U
Güç Kaynağı	Bio-Rad
Hassas Terazı	Shimadzu
Isıtıcı Blok	Daihan Scientific, Wisd
Işık Mikroskobu	Prior
İnvert Mikroskop	Olympus, CKX53
Karbondioksitli Etüv	Thermo Scientific, Heracell™ 150i
Karıştırıcı (Vorteks)	Velp Scientifica
Laminar Hava Akımlı Kabin	Heal Force
Mikropipetler	Gilson
Orbital Çalkalayıcı	Heidolph Instruments
pH Metre	Jenco
Saf / Ultra Saf Su Cihazı	Millipore
Soğutmalı Santrifüj	Sigma, 3-30K
Spektroflorometre	Biotek
Spektrofotometre (Mikroplaka Okuyucu)	Biotek, Eon
Trans-Blot® Turbo™ Transfer Sistemi	Bio-Rad
Tüp Çevirici (Rotatör)	IsoLab
Ultrasonik Su Banyosu	Daihan Scientific, Wisd
Yatay Elektroforez Sistemi	Bio-Rad

3.2. HÜCRELER VE KÜLTÜRLEME KOŞULLARI

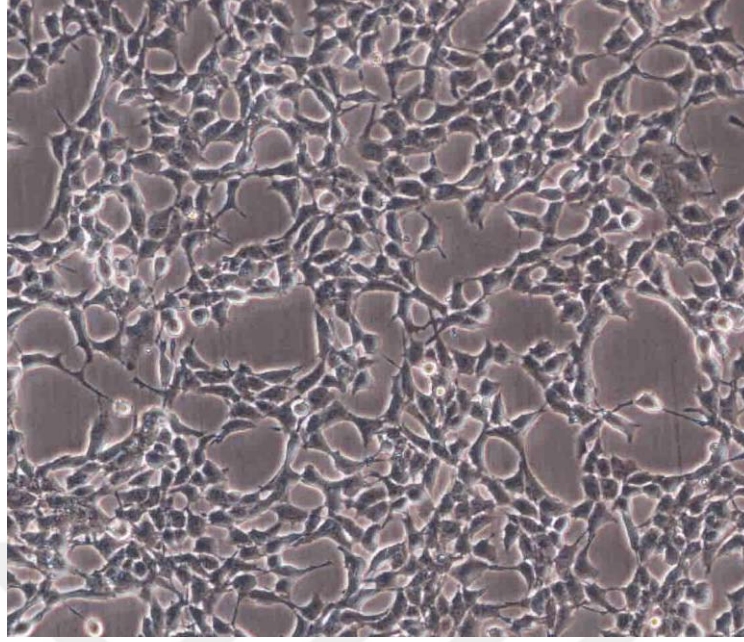
Bu tez kapsamında, Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nden temin edilen U-87 MG insan glioma hücreleri ile Medipol Üniversitesi'nden temin edilen HEK 293 insan embriyonik böbrek hücreleri kullanıldı. İçeriğinde pirüvat, L-glutamin ve 4.5 g/L D-glukoz bulunan DMEM/High Glucose besiyerine (pH 7.4) ısıyla inaktive edilmiş %10 FBS, %1 NEAA ve %1 antibiyotik-antimikotik solüsyonu eklenerek U-87 MG hücrelerini üretmek amacıyla kullanıldı. Kontrol hücre grubu olarak kullanılan HEK 293 hücrelerini üretmek amacıyla ise %10 FBS ve %1 antibiyotik-antimikotik içeren DMEM/F12 Ham besiyeri kullanıldı.

U-87 MG ve HEK 293 hücrelerinin altkültürleme aşamasında, öncelikle kültür kabı içindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine 5 ml PBS eklenerek, hücreler dikkatli bir şekilde yıkandı. Yıkama işleminden sonra PBS dökülüp kültür kabı içine 1 ml Tripsin-EDTA (%0.2 tripsin, %0.04 EDTA) eklendi ve hücreler 37°C'lık etüvde yaklaşık 1 dakika inkübasyona bırakıldı. Kültür kabına tutundukları yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine 5 ml besiyeri eklendi ve pipet yardımıyla süspansiyon haline getirildi. Yeni bir kültür kabına alınmadan önce hemositometre (Neubauer lamı) yardımıyla sayılan hücreler, istenilen sayıda süspansiyondan alınarak yeni kültür kabına aktarıldı. Hücreler 37°C'lık % 5 CO₂ sağlayan etüve kaldırılarak altkültürleme işlemleri üç günde bir tekrar edildi (Freshney, 2000).

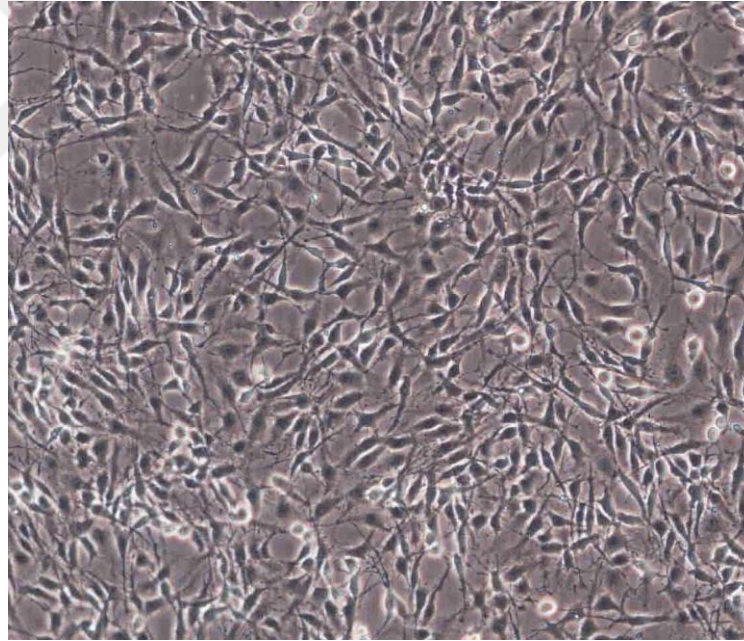
3.3. U-87 MG VE HEK 293 HÜCRELERİNE AİT ÇOĞALMA EĞRİLERİNİN OLUŞTURULMASI

U-87 MG insan glioma hücrelerinin ve HEK 293 insan embriyonik böbrek hücrelerinin jenerasyon sürelerini hesaplayabilmek için, başlangıç sayıları 0.5×10^5 hücre/ml ve 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür kaplarına ekim yapıldı. Hücreler 10 gün boyunca her gün sayılarak çoğalma eğrisi oluşturuldu. Hücre süspansiyonu, % 0.5 PBS içinde hazırlanmış olan tripan mavisi ile 1:1 (v/v) karıştırıldı ve boyanmayan canlı hücreler 10 gün boyunca hemositometre yardımıyla mikroskop altında sayıldı (Freshney, 2000). İki günlük U-87 MG ve HEK 293 hücrelerine ait görüntüler invert mikroskopta alınarak Şekil 3.1'de verildi.

A



B



Şekil 3.1: Başlangıç hücre sayısı 1×10^5 hücre/ml olan HEK 293 (A) ile 0.5×10^5 hücre/ml olan U-87 MG (B) hücrelerine ait 2 günlük kültürlerin invert mikroskop altındaki görüntüleri (100X).

Hücrelerin sayım sonuçları GraphPad Prism 7.0 istatistik programı ile değerlendirilerek grafik oluşturuldu. Çizilen yarı logaritmik çoğalma eğrisinde absise zaman (gün), ordinata ml'deki hücre sayıları yerleştirildi. Elde edilen bu grafik yardımıyla hücrelerin lag, log ve durağan evreleri belirlendi. Sonuçlar tek-yönlü ANOVA testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

Oluşturulan çoğalma eğrileri kullanılarak hücrelerin jenerasyon sayıları ve süreleri aşağıdaki formüllere göre hesaplandı (Moat, 1979):

$$n = \frac{\log N_2 - \log N_1}{\log 2}$$

$$St = \frac{T_2 - T_1}{n}$$

n: jenerasyon sayısı

N₁: logaritmik bölünme başlangıcındaki hücre sayısı

N₂: logaritmik bölünme sonundaki hücre sayısı

St: jenerasyon süresi

T₁: logaritmik bölünmenin başlangıç zamanı

T₂: logaritmik bölünmenin bitiş zamanı

3.4. SİTOTOKSİSİTE ANALİZLERİ

Tez kapsamında kullanılacak temozolomid (TMZ) ve resveratrolün (RSV) hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile saptandı. Mosmann (1983) tarafından önerilen ve Önay Uçar ve diğ. (2012) tarafından modifiye edilmiş şekliyle uygulanan bu yöntem, canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesi sonucu MTT'nin suda çözünmeyen formazan kristallerine çevrilmesi ve bu kristallerin de DMSO ile çözülerek 540 nm dalga boyundaki absorbasının spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu amaçla, 96 kuyucuklu kültür kaplarına 0.5x10⁵ h/ml olacak şekilde U-87 MG hücrelerinin ve 1x10⁵ h/ml olacak şekilde HEK 293 hücrelerinin ekimi yapıldı ve 24 saat süreyle 37°C'lık %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Bu süre sonunda kültür kabına tutunmuş hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak, deney grubu hücrelere farklı konsantrasyonlarda madde (TMZ ve/veya RSV) içeren besiyerleri, kontrol grubu için ise sadece besiyeri eklendi.

Hücrelere uygulanan ajanların stok solüsyonları, 200 mM TMZ ve 100 mM RSV konsantrasyonlarında DMSO içinde çözülerek hazırlandı. Hücrelere farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saat) yapılan TMZ uygulamaları 1-2000 µM konsantrasyon aralığında, RSV uygulamaları ise 1-500 µM konsantrasyon aralığında gerçekleştirildi. Maddelerin çözücüsü olarak kullanılan DMSO'nun hücreler üzerindeki toksisitesini elimine etmek amacıyla, besiyerindeki konsantrasyonu % 1'in altında kalacak şekilde ayarlandı.

Gerçekleştirilen 24., 48. ve 72. saatlik uygulamalar değerlendirildiğinde U-87 MG hücrelerinde TMZ ve RSV uygulamaları için en uygun sürenin 48 saat olduğu belirlendi. Bu nedenle HEK 293 hücreleri için sadece 48 saatlik TMZ ve RSV uygulamaları yapılarak ile toksik etkileri incelendi. Analizin son aşamasında hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 30 µl MTT stok çözeltisi (5 mg/ml, PBS içinde hazırlandı) eklendi. Hücreler 4 saat

etüvde bekletildikten sonra, her bir kuyucuğa 150 µl DMSO eklenip çözelti homojen hale gelinceye kadar çalkalandı. Oluşan renkli ürünün absorbansı spektrofotometrede ölçülerek, hücrelerin canlılığı kontrol grubu hücrelerle karşılaştırıldı ve aşağıdaki formül yardımıyla % cinsinden hesaplandı:

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Deney grubu hücrelerinin absorbansı}}{\text{Kontrol grubu hücrelerinin absorbansı}} \times 100$$

Sitotoksosite analizleri en az 6 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Sonuçlar istatistiksel açıdan değerlendirildikten sonra, bu tez çalışmasında kullanılan ajanların/maddelerin U-87 MG ve HEK 293 hücrelerine uygulanacak dozları belirlendi.

TMZ ve RSV kombine uygulamalarının hücreler üzerindeki toksik etkilerini değerlendirmek amacıyla 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında TMZ ile 5, 7.5, 10 ve 15 µM konsantrasyonlarında RSV, U-87 MG hücreleri üzerinde ayrı ayrı ve birlikte 48 saat süresince uygulandı ve yukarıda anlatıldığı şekilde MTT yöntemine göre değerlendirildi. Hücrelere kombine şekilde uygulanacak TMZ ve RSV konsantrasyonları bu analizin sonuçlarına göre belirlendi.

3.5. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Normalde belli bir konsantrasyonda bulunan stres proteinlerinin hücre içi anlatımı, ısı şoku veya bazı kimyasal ajanların uygulanması sonucunda artmaktadır. Glioma hücrelerindeki stres proteinlerinin anlatımının, 42°C’da 1 saat ısı şoku uygulamasını takiben 6 saatlik bir dinlenme periyodu ile indüklendiği bilinmektedir (Zhang ve diğ., 2001; Önay Uçar ve diğ., 2012).

Bu tez kapsamında hücrelerdeki stres proteinlerini indüklenmek amacıyla 42°C’lık ısı şoku uygulaması yapıldı. Oluşturulan deney grupları ve kodları Tablo 3.3’te verildi. Kontrol grubu olarak belirlenen hücrelere herhangi bir madde uygulaması ya da stres uygulaması yapılmadı. Stres uygulanmayan gruplarda, hücre ekimini takip eden 24 saatlik süre sonunda hücrelere uygun dozlarda TMZ ve RSV uygulanarak, 48 saat daha inkübasyona bırakıldı. Isı şoku uygulanan gruplarda TMZ ve RSV uygulanan/uygulanmayan hücreler inkübasyon süresinin sonunda (72. saat) 1 saat 42 °C’da tutulup, daha sonra 37 °C’da 6 saatlik dinlenmeye alındı. Çalışma kapsamında oluşturulan tüm gruplar istatistiksel açıdan karşılaştırmalı olarak incelendi.

Tablo 3.3: Oluşturulan deney grupları ve kodları.

Gruplar	Kontrol	TMZ	RSV	TMZ+RSV
Stres uygulanmayan	K	T	R	T+R
Isı şoku uygulanan	42/K	42/T	42/R	42/T+R

3.6.HÜCRELERE MADDE UYGULANMASI VE HÜCRELERİN TOPLANMASI

Hücrelere uygulanacak madde konsantrasyonları Bölüm 3.4'te anlatılan sitotoksizite analiz sonuçlarına göre belirlendi. Tez kapsamında yapılan tüm uygulamalarda U-87 MG hücreleri için 0.5×10^5 h/ml, HEK 293 hücreleri için 1×10^5 h/ml olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saatlik inkübasyon sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı. Kontrol hücrelerine sadece besiyeri, deney grubu hücreleri üzerine ise belirlenen konsantrasyonlarda TMZ ve RSV içeren besiyerleri eklendi. Optimizasyon çalışmalarında 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M ve 200 μ M TMZ; 5 μ M, 7.5 μ M, 10 μ M, 15 μ M ve 20 μ M RSV hücrelere uygulandı. Hücrelere madde uygulamaları yapıldıktan sonra kültür kabı 37 °C'lık etüvde 48 saat inkübe edildi. Besiyeri uzaklaştırılıp kültür kaplarına tutunmuş hücreler PBS eklenerek yıkandıktan sonra, hücrelerin üzerine tripsin/EDTA solüsyonu eklenerek hücrelerin tutundukları yüzeyden ve birbirinden ayrılması sağlandı. Tripsini inhibe etmek için kültür kabına besiyeri eklendi ve süspansiyon halindeki hücreler temiz bir santrifüj tüpüne alınarak 3000xg'de 5 dakika santrifüjlendi. Son aşamada süpernatant uzaklaştırılıp, pellet soğuk PBS ile üç kez yıkandı. Elde edilen tüm hücre grupları kullanılıncaya kadar -20°C'lık derin dondurucuya kaldırıldı.

Tez çalışması kapsamında tüm deneylerde kullanılacak TMZ ve RSV konsantrasyonlarına immünolojik ve apoptotik analizler sonucu elde edilen veriler doğrultusunda karar verildi. Kombine terapi aşamasında hücrelere 50 μ M TMZ ile 5 μ M RSV aynı anda uygulandı ve yukarıda anlatılan süreç tekrarlanarak hücreler toplandı.

3.7. PROTEİN ANALİZLERİ

3.7.1. Protein İzolasyonu

Sitotoksik analiz sonuçlarına göre belirlenen dozlarda ajanların uygulandığı hücreler Bölüm 3.6'da anlatıldığı şekilde toplandı. -20°C'lık derin dondurucuda muhafaza edilen bu hücreler; %0.04 (w/v) EDTA, %1 (v/v) Triton X-100, EDTA içermeyen proteaz inhibitör kokteyli (1

tablet / 50 ml), 1 mM PMSF ve 0.02 M Tris-HCl (pH 6.8) içeren parçalama tamponu ile tekrarlanan periyotlarda ultrasonik su banyosu ve buz içinde tutularak parçalandı. Homojenat 4°C'da 15000xg hızda 20 dakika boyunca santrifüj edildi ve süpernatant fazında bulunan suda çözünebilir proteinler ayrı bir tüpe alındı. Elde edilen tüm protein örnekleri kullanılıncaya kadar -20°C'lık derin dondurucuda saklandı (Zhang ve diğ., 2001).

3.7.2. Proteinlerin Konsantre Hale Getirilmesi

Proteinleri konsantre etmek amacıyla, Wessel ve Flügge (1984) tarafından önerilen metanol/kloroform protein çöktürme yöntemi modifiye edilerek kullanıldı. Bu yöntemde başlangıçta parçalama tamponu içinde bulunan protein örneğinden 1 hacim alınarak, üzerine 4 hacim metanol eklenip iyice karıştırıldı. Karışıma daha sonra 1 hacim kloroform eklenerek tekrar karıştırıldı ve son olarak 3 hacim dH₂O ilave edilip karışım homojen hale getirildikten sonra 14000xg'de 4°C'da 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonunda oluşan üç fazdan, üst faz mikropipet yardımıyla atıldı. Karışımın üzerine tekrar 4 hacim metanol eklenerek iyice karıştırıldı ve örnekler bir kez daha 14000xg'de 4°C'da 10 dakika santrifüjlendi. Elde edilen son üründe çökelti fazında proteinler, süpernatant fazında ise çözücüler kaldı. Metanol tüpten dikkatlice uzaklaştırılıp pellet oda sıcaklığında kurutulduktan sonra proteinler %1 SDS içeren Tris-HCl (pH 6.8) tamponu içinde çözündürüldü.

3.7.3. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Örneklerin protein konsantrasyonları bikinkoninik asit (BCA) yöntemine göre, "BCA Protein Assay" kiti (SMART™ BCA Protein Assay Kit, iNtRON Biotechnology) kullanılarak belirlendi. Kit içinde bulunan BSA ("Bovine Serum Albumin", Sığır Serum Albumini) farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak, protein standardı olarak kullanıldı. Protein konsantrasyonu belirlenecek örnekler ile kör örnek (parçalama tamponu) beş kez dH₂O ile seyreltildi. Gerekli hacimdeki BCA belirteci, kit içinde bulunan reaktif A ve reaktif B solüsyonları 50:1 (v:v) oranında karıştırılarak hazırlandı. 96 kuyucuklu mikropłakanın kuyucuklarına önce 200 µl BCA belirteci, daha sonra 25'er µl seyreltilmiş örnek/kör/standart eklenerek, mikropłaka 30 dakika 37°C'lık etüvde bekletildi. Oluşan renkli ürünün 562 nm dalga boyundaki absorbansı mikropłaka okuyucu ile ölçüldü ve kör örneğin absorbansı çıkarılarak gerçek absorbans değerleri belirlendi. BSA kullanılarak oluşturulan standart grafik yardımıyla, tüm örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi.

3.7.4. Elektroforetik Analizler

Protein örnekleri sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemine göre ayrıştırıldı. Bu yöntemde kullanılan solüsyonlar ve içerikleri Tablo 3.4'te verildi.

Tablo 3.5'te verilen hacimler doğrultusunda akrilamid solüsyonu, Tris-HCl tamponu, SDS, APS, TEMED içeren ayırma jeli ile yükleme jelinden oluşan jel kaseti hazırlandı. Analizi yapılacak örnekler; içeriği Tablo 3.4'te verilen örnek yükleme tamponu ile karıştırılıp 3 dakika kaynatıldıktan sonra, her bir kuyucukta 50 µg protein olacak şekilde hazırlanan jele yüklendi ve 200 V sabit akımda 40 dakika elektroforetik olarak ayrıştırıldı. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeldeki proteinler ya Coomassie boyama yöntemine göre boyanarak görünür hale getirildi ya da Bölüm 3.8'de anlatıldığı şekilde Western blotlama yönteminde kullanılmak üzere membrana aktarıldı (Walker, 2002).

Tablo 3.4: SDS-PAGE için kullanılan solüsyonlar ve içerikleri.

Solüsyonlar	Bileşenler	Gram / Hacim
Akrilamid Solüsyonu	Akrilamid	30 g
	Bis	0.8 g
	dH ₂ O	100 ml'ye tamamlandı
1.875 M Tris-HCl Tamponu (pH: 8.8)	Tris base	45.43 g
	dH ₂ O	200 ml'ye tamamlandı
0.6 M Tris-HCl Tamponu (pH: 6.8)	Tris base	14.54 g
	dH ₂ O	200 ml'ye tamamlandı
%10 SDS	SDS	20 g
	dH ₂ O	200 ml'ye tamamlandı
%10 APS	APS	0.1 g
	dH ₂ O	1 ml'ye tamamlandı
1X Yürütme Tamponu (pH: 8.3)	Tris base (25 mM)	3.03 g
	Glisin (192 mM)	14.4 g
	SDS (% 0.1)	1 g
	dH ₂ O	100 ml'ye tamamlandı
Örnek Yükleme Tamponu	Tris-HCl (0.6 M, pH: 6.8)	5 ml
	SDS	0.5 g
	Sukroz	5 g
	β-Merkaptoetanol	0.25 ml
	%0.5'lik Bromofenol Mavisi	5 ml
	dH ₂ O	50 ml'ye tamamlandı

Tablo 3.5: SDS-PAGE yöntemine göre 4 adet mini jel hazırlamak için kullanılan solüsyonlar ve miktarları.

Solüsyonlar	Ayırma Jeli (% 10 Akrilamid)	Yükleme Jeli (% 5 Akrilamid)
1.875 M Tris-HCl Tamponu (pH: 8.8)	4.0 ml	-
0.6 M Tris-HCl Tamponu (pH: 6.8)	-	1.0 ml
dH ₂ O	9.05 ml	7.5 ml
Akrilamid Solüsyonu	6.65 ml	1.35 ml
%10 SDS	0.2 ml	0.1 ml
%10 APS	0.1 ml	0.05 ml
TEMED	7 µl	14 µl

*TEMED konulmadan önce ultrasonikatör yardımıyla jel karışımının havası alındı.

3.7.5. Coomassie Boyama Yöntemi

Elektroforezin ardından jeldeki protein bantlarını görünür hale getirmek amacıyla Coomassie boyama yöntemi kullanıldı. Bu amaçla kullanılan solüsyonlar ve bileşenler Tablo 3.6’da verildi. Boyama çözeltisi içinde oda sıcaklığında birkaç saat çalkalanan jel, daha sonra fazla boyayı uzaklaştırmak için kullanılan yıkama çözeltisi içinde çalkalanarak, arka plan boyadan tamamen arındırılincaya kadar birkaç kez yıkandı. Jelde oluşan bantlar ChemiDoc MP görüntüleme cihazında ImageLab yazılımı yardımıyla görüntülendi (Arda ve diğ., 2018).

Tablo 3.6: Coomassie boyama yönteminde kullanılan çözelti ve içerikleri.

Solüsyonlar	Bileşenler	Gram / Hacim
Boyama Çözeltisi	Coomassie parlak mavisi R-250	1 g
	Metanol	500 ml
	Asetik asit (glasiyel)	100 ml
	dH ₂ O	1000 ml’ye tamamlandı
Yıkama Çözeltisi	Metanol	50 ml
	Asetik asit (glasiyel)	70 ml
	dH ₂ O	1000 ml’ye tamamlandı

3.8. İMMÜNOLOJİK ANALİZLER

İmmünolojik analizlerde kullanılan farklı yöntemlere (elektrotransfer, Western blotlama ve “stripping” yöntemlerine) ait tüm tamponlar Tablo 3.7’de, kullanılan antikolar ise Tablo 3.8’de verildi.

SDS-PAGE yöntemine göre ayrıştırılan proteinler (Bölüm 3.7.4), transfer tamponu ve Trans-Blot® Turbo™ transfer sistemi kullanılarak polivinilidinden diflorür (PVDF) membrana aktarıldı. Membranın proteinler dışında kalan tüm boşlukları membran kapatma tamponu ile yaklaşık bir saat boyunca çalkalanarak bloke edildikten sonra, kapatma tamponu içinde hedeflenen stres proteinlerine özgü primer antikörlerle (Hsp27 ve Hsp70 monoklonal antikörlerle) +4°C’da gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Primer antikör kalıntılarını ortamdan uzaklaştırmak amacıyla membran, yıkama tamponu ile beşer dakika aralıklarla beş kez yıkandı. Daha sonra, yaban turbu peroksidazıyla (“Horse Radish Peroxidase”, HRP) işaretli sekonder antikör ile oda sıcaklığında yaklaşık 1 saat inkübasyona bırakıldı. Son olarak membran yıkama tamponu ile tekrar yıkandı ve antikörle etkileşime giren proteinler “Pierce™ ECL Western Blotting Substrate” kiti kullanılarak, ChemiDoc MP görüntüleme cihazında ImageLab yazılımı yardımıyla görüntülenerek değerlendirildi.

Elde edilen protein sonuçlarının normalizasyonu için membranlar stribe edildi. Bu amaçla öncelikle hazırlanan “stripping” tamponu 50°C’a ısıtıldı. Membranın üzeri tamponla kaplanarak 50°C’ta 45 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından ultrasaf su ile bir saat boyunca yıkanan membran, daha sonra beşer dakikalık periyotlarla beş kez TBST ile çalkalanarak yıkandı. Membran, kapatma tamponu içinde hazırlanan HRP işaretli Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz (“Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase”, GAPDH) antikörü ile +4°C’ta gece boyunca muamele edildikten sonra “Pierce™ ECL Western Blotting Substrate” kiti yardımıyla görüntüleme cihazında ImageLab yazılımı kullanılarak görüntülendi.

Tablo 3.7: İmmünolojik analizlerde kullanılan tamponlar ve içerikleri.

Tamponlar	Bileşenler	Gram / Hacim
Transfer Tamponu	Tris base (25 mM)	3.03 g
	Glisin (192 mM)	14.4 g
	Metanol (%20)	200 ml
	dH ₂ O	1000 ml’ye tamamlandı
Yıkama Tamponu (TBST)	Tris base (20 mM, pH: 7.5)	2.42 g
	NaCl (150 mM)	8.76 g
	Tween-20 (%0.1)	1 ml
	dH ₂ O	1000 ml’ye tamamlandı
Kapatma Tamponu	Yağsız süt tozu	5 g
	TBST	100 ml’ye tamamlandı
“Stripping” Tamponu	%10’luk SDS	20 ml
	Tris-HCl (0.5 M, pH: 6.8)	12.5 ml
	ddH ₂ O	67.5 ml
	β-Merkaptoetanol	0.8 ml

Tablo 3.8: İmmünolojik analizlerde kullanılan antikorlar ve özellikleri.

Antikor Adı	Tipi	Marka	Elde Edildiği Organizma	Dilüsyon Oranı
Hsp27	Monoklonal	Enzo Life Sciences	Fare	1:1000
Hsp 70 (Hsp72)	Monoklonal	Enzo Life Sciences	Fare	1:1000
GAPDH - HRP işaretli	Monoklonal	Thermo Fisher	Fare	1:2000
Keçi anti-fare IgG (Fab) - HRP işaretli	Poliklonal	Enzo Life Sciences	Keçi	1:5000

3.9. KASPAZ 3 AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Tez kapsamında hücrelere uygulanan ajanların apoptotik etkileri, kaspaz-3 enziminin aktivitesini değerlendiren “Caspase-3 Colorimetric Activity Assay” ticari kiti kullanılarak belirlendi. Üretici firmanın protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilen bu çalışmada sırasıyla şu aşamalar uygulandı: Deney ve kontrol grubuna ait hücreler, kit içinde bulunan lizis tamponunda süspanse edilerek 10 dakika buzda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücre lizatları 4°C’da 10000xg hızda 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatantlar 1 mM kaspaz-3 substratı (Ac-DEVD-pNA) ile 37°C’da 2 saat inkübe edilerek tüm örneklerin 405 nm dalga boyundaki absorpsansları ölçüldü. Standart grafik oluşturmak amacıyla kit içinde bulunan pNA standartları kullanıldı. Elde edilen grafik yardımıyla enzim aktivitesi karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Örneklerin kaspaz 3 aktivitesi protein konsantrasyonları dikkate alınarak normalize edildi ve hesaplandı. Kontrol grubuna ait veriler %100 olarak kabul edildi ve diğer sonuçlar kontrol grubuna oranlanarak belirlendi.

3.10. HÜCRE İÇİ REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN BELİRLENMESİ

Hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROT) seviyesi, 2',7'-diklorodihidrofloresin diasetatın klorometil türevi olan CM-H₂DCFDA aracılığıyla değerlendirildi. Bu amaçla 96 kuyucuklu siyah kültür kaplarında büyütülen hücrelere Bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi madde/ajan uygulamaları yapıldı. Uygulama sonrasında her bir deney grubuna ait besiyeri uzaklaştırılıp hücreler PBS ile yıkandı. Dengelenmiş tuz solüsyonu (“Hank’s balanced salt solution”, HBSS) içinde hazırlanan 5µM CM-H₂DCFDA her bir kuyucukta 200’er µl olacak şekilde hücrelere uygulandıktan sonra kültür kapları 37°C’da %5 CO₂ içeren etüvde 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda, madde/ajan uzaklaştırılarak hücrelerin üzerine 100’er µl HBSS eklendi. Spektroflorometrede 495 nm eksitasyon ve 525 nm emisyon dalga boylarında, 37°C’da 2 saat boyunca kinetik ölçüm alındı. Ölçümden sonra kuyucuklardaki hücreler sayılarak spektrofotometrik sonuçlar hücre sayılarına göre normalize edildi ve ROT oluşumu

hesaplandı. Kontrol grubuna ait veriler %100 olarak kabul edildi ve diğer sonuçlar kontrol grubuna oranlanarak belirlendi.

3.11. İNDİRGENMİŞ GLUTATYON (GSH) İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ

Glutasyon hücrede antioksidan özellik gösteren önemli moleküllerden biridir. İndirgenmiş glutasyon (GSH) içeriğinin belirlenmesini sağlayan yöntem, protein ekstresinde bulunan serbest sülfidril gruplarının Ellman belirteciyle oluşturduğu kompleksin 412 nm dalga boyundaki absorbans ölçümüne dayanmaktadır (Beutler, 1975). Bu analizde kullanılan solüsyonlar ve içerikleri Tablo 3.9’da verildi.

Tablo 3.9: İndirgenmiş glutasyon içeriğinin belirlenmesinde kullanılan solüsyonlar.

Solüsyonlar	Bileşenler
Proteinsizleştirme Solüsyonu	Meta-fosforik asit (0.2 M) Na ₂ EDTA (2.7 mM) NaCl (5 M)
Fosfat Çözeltisi	Na ₂ HPO ₄ (0.3 M)
Ellman Belirteci	%1’lik sodyum sitrat çözeltisi içinde hazırlanmış 5-5’-ditiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) (1 M)

Yöntem kısaca şu şekilde gerçekleştirildi: Bölüm 3.6 ve 3.7’de belirtilen şekilde hazırlanan protein ekstresinin üzerine 0.75 ml proteinsizleştirme solüsyonu eklenip karıştırıldıktan sonra 5 dakika buzda bekletildi. Örnekler 2000xg’de 4°C’da 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmından 0.5 ml alınarak üzerine 2 ml fosfat çözeltisi ile 0.5 ml Ellman belirteci eklendi ve 412 nm’de absorbansı ölçüldü. Standart grafik oluşturmak amacıyla farklı konsantrasyonlarda GSH içeren standartlar (5, 10, 12, 15, 17, 20, 22, 25, 30 µg) Ellman belirteciyle reaksiyona sokuldu ve 412 nm’deki absorbans değerleri belirlendi. Elde edilen standart grafik yardımıyla tüm örneklerin indirgenmiş glutasyon içerikleri belirlendi. GSH içeriği, protein konsantrasyonları da dikkate alınarak normalize edildi ve hesaplandı. Kontrol grubuna ait veriler %100 olarak kabul edildi ve diğer sonuçlar kontrol grubuna oranlanarak belirlendi.

3.12. COMET ANALİZİ İLE DNA HASARININ BELİRLENMESİ

Hücrel DNA hasarını belirleme yöntemlerinden biri olan Comet analizi (“Single cell gel electrophoresis”, Tek hücre jel elektroforezi) için Olive ve Banáth (2006) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı. Bu amaçla öncelikle Bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi 24 kuyucuklu kültür

kaplarına U-87 MG hücreleri için 0.5×10^5 h/ml, HEK 293 hücreleri için ise 1×10^5 h/ml olacak şekilde hücre ekimi yapıldı ve 24 saat sonra madde/ajan uygulandı. Negatif ve pozitif kontrol gruplarında ise 24 saat sonunda sadece besiyeri değiştirildi ve tüm kültür kapları karbondioksitli etüvde inkübe edildi. 48 saatlik madde uygulamasının sona ermesine 1 saat kala, pozitif kontrol hücrelerine DNA hasarı oluşturan 40 mM EMS uygulandı ve hücreler etüvde 1 saat daha inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı, kuyucuklar PBS ile yıkandı ve hücreler tripsinize edilerek her bir kuyucuktaki hücre sayısı belirlendi. Son aşamada Comet analizi için gereken hücre stokları 400 μ l PBS içinde 1.6×10^4 hücre olacak şekilde hazırlandı. Bu analiz kapsamında oluşturulan deney grupları ve kodları Tablo 3.10’da verildi.

Tablo 3.10: Comet analizi için oluşturulan deney grupları ve kodları.

Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	50 μ M TMZ	5 μ M RSV	TMZ+RSV
NK	PK	50T	5R	50T+5R

Bu analizde öncelikle her bir deney grubu için 3’er adet lam, 37°C’lık ısıtıcı üzerindeki %1’lik agaroz daldırılarak polimerize olması için bekletildi. Daha sonra Comet analizinin en önemli bölümünü oluşturan lamaları hazırlama aşamasında sırasıyla şu işlemler yapıldı: 400 μ l hücre stoğu üzerine 1200 μ l %1’lik düşük sıcaklıkta eriyen (low melting) agaroz eklenerek bir karışım hazırlandı. Bu karışımdan 1200 μ l alındı ve hazırlanmış lam üzerine yayılarak içinde hücreler olan slaytlar yapıldı. Polimerizasyonu tamamlanan slaytlar +4°C’a kaldırılarak 2-3 saat bekletildikten sonra her bir slayt şalelere yerleştirildi. Tablo 3.11’de içeriği verilen parçalama tamponu slaytların üzerini kaplayacak şekilde şalelere konuldu ve alüminyum folyo ile sarılarak +4°C’a kaldırıldı.

Tablo 3.11: Comet analizinde kullanılan tamponlar ve içerikleri.

Tamponlar	Bileşenler	Gram / Hacim
Parçalama tamponu (pH: 13)	NaCl	35.065 g
	Na ₂ EDTA	18.612 g
	%0,1 SLS*	0.5 g
	NaOH	5.199 g
	dH ₂ O (+4°C)	500 ml’ye tamamlandı
Yıkama ve yürütme tamponu (pH: ~ 12.3)	NaOH	3.6 g
	EDTA	2.235 g
	dH ₂ O (+4°C)	3000 ml’ye tamamlandı

*SLS: Sodyum Lauril Sarkozinat

Gece boyunca parçalama tamponu içerisinde +4°C'ta bekletilen slaytlar, karanlık odada ve slaytların üzeri alüminyum folyo ile kaplı olacak şekilde ayrı kaplara alınarak yıkandı. Slaytların yüzeyini örtecek kadar yıkama tamponu (Tablo 3.11) eklendi ve 3 kez 20'şer dakika bekleterek yıkama işlemi tamamlandı. Bu aşamadan sonra slaytlar 13V, 0.03A akım uygulanarak 25 dakika yatay elektroforez sisteminde yürütüldü. Elektroforez işleminden sonra 30 dakika boyunca soğuk saf su ile yıkanan slaytların boyanması için üzerine 100'er µl propidium iyodür (10 µg/ml) eklenerek yayıldı. Alüminyum folyo ile kapatılan slaytlar 20 dakika bekletildikten sonra süzüldü ve yıkama kaplarına dizilerek tekrar 30 dakika soğuk saf suda bekletildi.

Son olarak floresan mikroskop ile görüntülenen slaytlarda DNA hasarının birikmesinin göstergesi olan "Comet" kuyukları belirlendi. Elde edilen görüntüler Image J programı kullanılarak hesaplandı. Kontrol DNA'sı ile karşılaştırılarak kuyruk yoğunluğu ("% tail") belirlendikten sonra sonuçlar kontrole göre normalize edilerek değerlendirildi.

3.13. PROTEİN KARBONİLLERİNİN BELİRLENMESİ

Hücredeki protein hasarı, oksidatif stres sonucu ortaya çıkan karbonil gruplarının immünolojik olarak değerlendirildiği SDS-PAGE ve Western blotlama analizleri kullanılarak belirlendi (Levine ve diğ., 1994). Bu analizde "OxyBlot Protein Detection Kit" kullanıldı. Üretici firmanın önerilerine göre örnekten alınan 15 µg protein, dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile 15 dakika oda sıcaklığında bırakıldı. Daha sonra Bölüm 3.7.4'te anlatıldığı şekilde proteinler SDS-PAGE yöntemi ile ayrıştırıldı ve PVDF membrana aktarıldı. Bölüm 3.8'de belirtilen şekilde kapatılan (bloke edilen) membran, ilk olarak proteindeki DNP'lere özgü primer antikorla (anti-DNP antikor) oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından, primer antikor kalıntılarını ortamdan uzaklaştırmak amacıyla, membran Tablo 3.7'de içeriği verilmiş olan yıkama tamponu ile beşer dakika aralıklarla 5 kez yıkandı. Membran daha sonra, HRP işaretli sekonder antikor ile oda sıcaklığında yaklaşık 1 saat inkübasyona bırakıldı. Tekrarlanan yıkama işleminin ardından, sonuçlar "Pierce™ ECL Western Blotting Substrate" kullanılarak kemoluminesans görüntüleme sisteminde ImageLab yazılımı kullanılarak kalitatif olarak değerlendirildi.

3.14. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

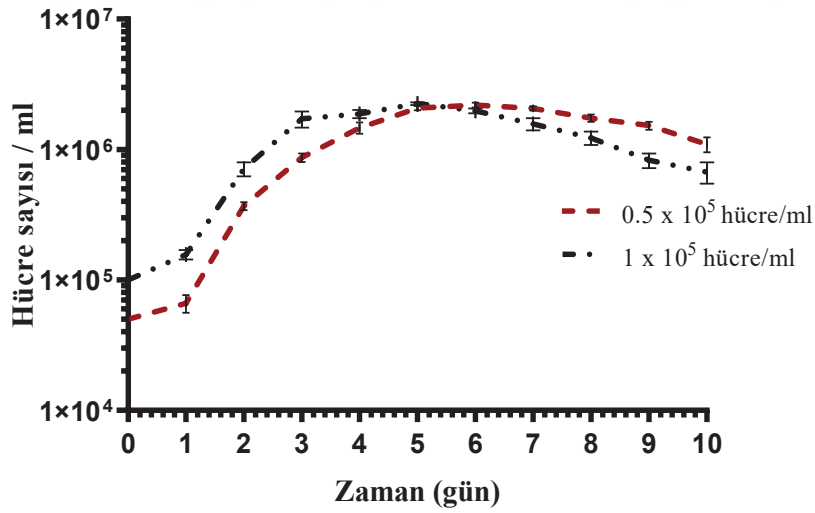
Deneysel çalışmalar en az üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Tüm istatistiksel işlemlerin analizi, grafiklerin çizilmesi, aritmetik ortalama ve standart sapma değerlerinin hesaplanması için “GraphPad Prism 7.0” yazılımı kullanıldı. Sitotoksik aktivite analizinde IC₅₀ değerini hesaplamak için, sigmoidal doz-cevap eğrisinin lineer olmayan regresyon analizi uygulandı. Ayrıca gruplar arasındaki farkların anlamlı olup olmadığını belirlemek için ANOVA (tek yönlü varyans analizi, “one-way ANOVA”) testi yapıldı ve üst testler olarak Dunnett’s veya Tukey testleri kullanıldı. İstatistiksel analizler için anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edildi.



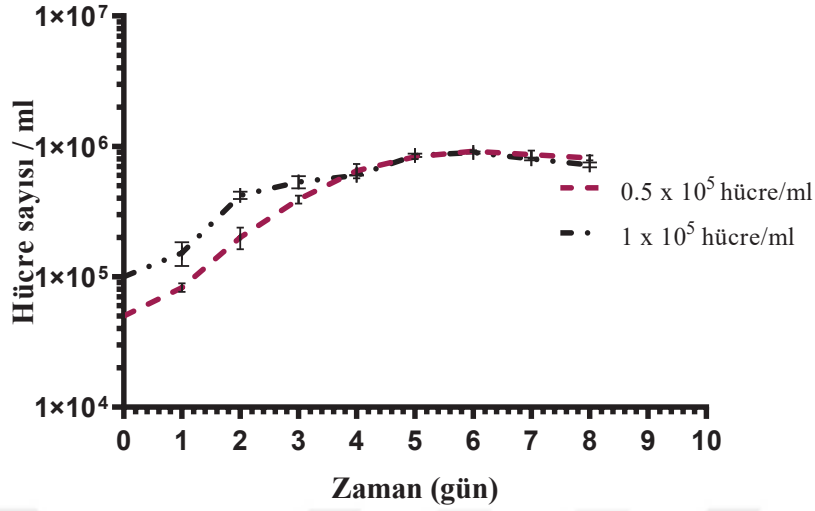
4. BULGULAR

4.1. U-87 MG VE HEK 293 HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA EĞRİLERİ

Başlangıç hücre sayıları 0.5×10^5 hücre/ml ve 1×10^5 hücre/ml olan U-87 MG ve HEK 293 hücrelerine ait çoğalma eğrileri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de verildi. U-87 MG hücreleri için başlangıç derişimi 0.5×10^5 hücre/ml olan hücrelerden elde edilen grafikte, hücrelerin logaritmik faza 1. gün girdikleri, 5. gün ise durağan faza geçtikleri saptandı. Başlangıç derişimi 1×10^5 hücre/ml olan hücrelerden elde edilen grafikte ise, hücrelerin logaritmik faza yine 1. gün girdikleri, durağan faza ise 3. gün geçtikleri saptandı. Elde edilen grafiklerden U-87 MG glioma hücrelerinin jenerasyon süresinin yaklaşık 20 saat olduğu belirlendi. HEK 293 hücreleri için ise başlangıç derişimi 0.5×10^5 hücre/ml ve 1×10^5 hücre/ml olan hücrelerden elde edilen grafikte, hücrelerin logaritmik faza 1. gün girdikleri, durağan faza ise 5. gün geçtikleri saptandı. Elde edilen grafiklerden HEK 293 hücrelerinin jenerasyon süresinin yaklaşık 32 saat olduğu belirlendi. Bu sonuçlar, hem U87-MG (Kato ve diğ., 2011) hem de HEK 293 (Van Eyk, 2015) hücreleri için literatür bilgileriyle uyum göstermektedir.



Şekil 4.1: Başlangıç hücre sayıları 0.5×10^5 hücre/ml ve 1×10^5 hücre/ml olan U-87 MG insan glioma hücrelerine ait çoğalma eğrileri (n=5).



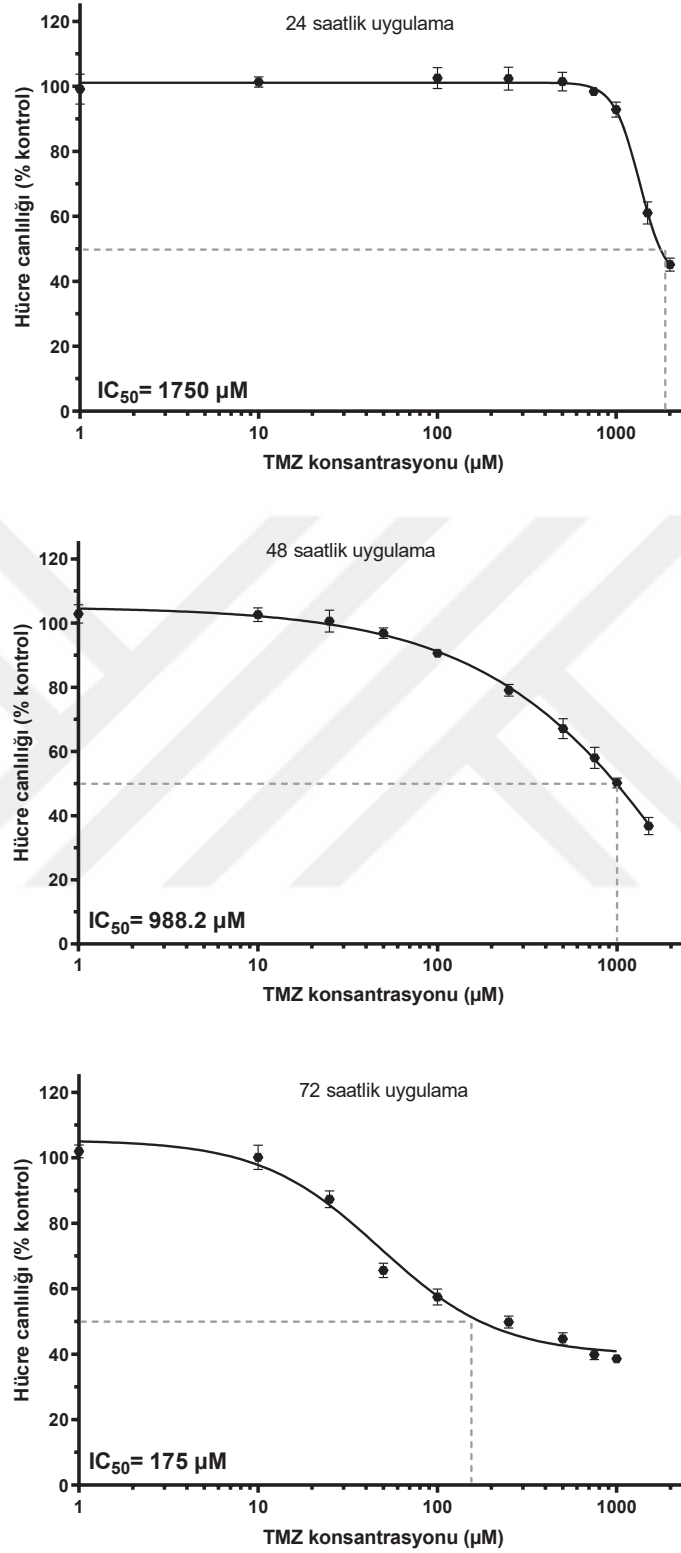
Şekil 4.2: Başlangıç sayıları 0.5×10^5 hücre/ml ve 1×10^5 hücre/ml olan HEK 293 insan embriyonik böbrek hücrelerine ait çoğalma eğrileri (n=4).

Hücrelerin çoğalma grafiklerinden elde edilen sonuçlara göre tez kapsamında yapılacak tüm deneylerle başlangıç hücre konsantrasyonu U-87 MG hücreleri için 0.5×10^5 hücre/ml, HEK 293 hücreleri için ise 1×10^5 hücre/ml olarak belirlendi.

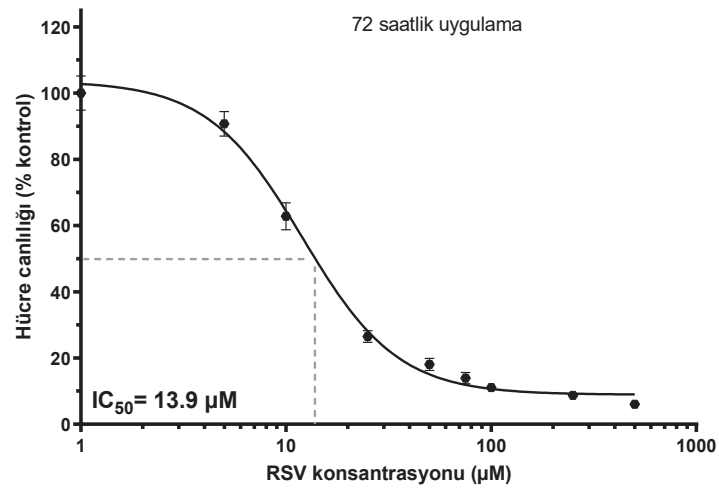
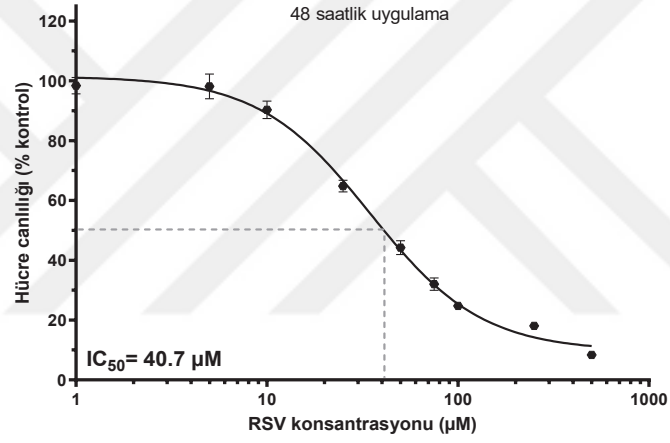
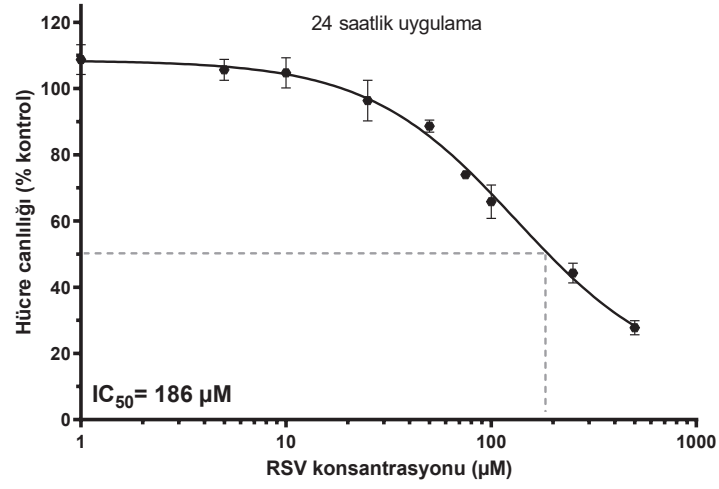
4.2. SİTOTOKSİSİTE ANALİZLERİ

4.2.1. Farklı Maddelerin U-87 MG Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkileri

Tez kapsamında U-87 MG hücrelerine uygulanan maddelerin sitotoksik etkileri 24., 48. ve 72. saatlerde MTT testi yapılarak değerlendirildi. Aynı maddeye farklı sürelerde maruz kalan hücrelerde, farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde farklı ölüm oranları saptandı. U-87 MG hücrelerine uygulanan TMZ için elde edilen grafikler Şekil 4.3'te, RSV için elde edilen grafikler ise Şekil 4.4'te verildi. U-87 MG hücrelerine uygulanan ajanların %50 inhibisyona neden olan konsantrasyon ("The Half Maximal Inhibitory Concentration", IC_{50}) değerleri Tablo 4.1'de verildi.



Şekil 4.3: 24, 48 ve 72 saatlik TMZ uygulamasının U-87 MG hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri (n=6) (Her bir uygulama için elde edilen R^2 değerleri sırasıyla 0.923, 0.915 ve 0.922'dir).



Şekil 4.4: 24, 48 ve 72 saatlik RSV uygulamasının U-87 MG hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri (n=6) (Her bir uygulama için elde edilen R^2 değerleri sırasıyla 0.947, 0.951 ve 0.958'dir).

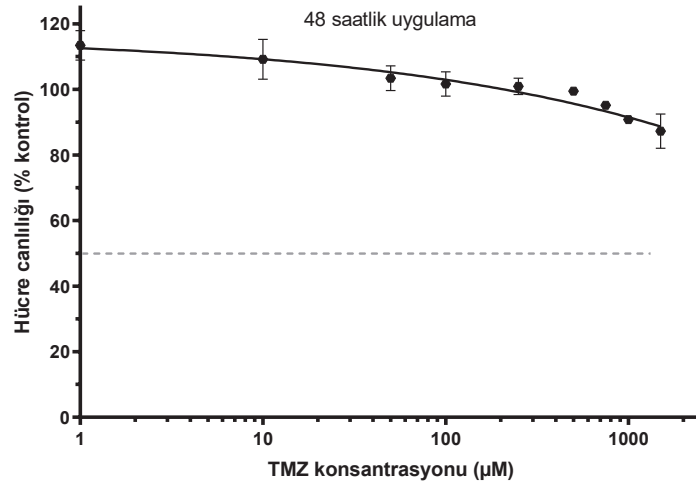
Tablo 4.1: U-87 MG insan glioma hücrelerine farklı sürelerde uygulanan madde/ajanların IC₅₀ değerleri.

Madde / Ajan	24. saat	48. saat	72. saat
Temozolomid (TMZ)	1750 μ M	988.2 μ M	175 μ M
Resveratrol (RSV)	186 μ M	40.7 μ M	13.9 μ M

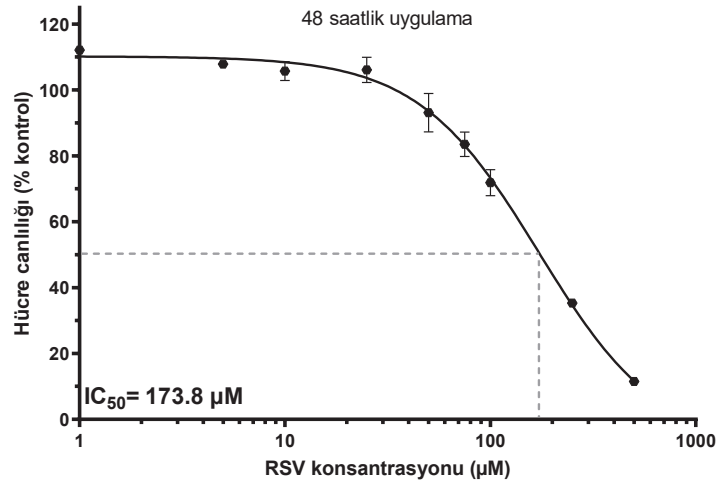
Çalışma kapsamında birbirinden bağımsız en az 3 deney tekrarı gerçekleştirildi. Sitotoksik aktivite analizlerinden elde edilen sonuçlara göre; U-87 MG hücrelerine maddelerin 48 saat süreyle, TMZ için 50 μ M (% 96.1 canlılık); RSV için 5 μ M (% 96.5 canlılık) konsantrasyonlarında uygulanmasına karar verildi.

4.2.2. Farklı Maddelerin HEK 293 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkileri

U-87 MG hücreleri üzerinde yapılan MTT analizleri sonucunda, TMZ ve RSV'nin uygulama süreleri 48 saat olarak belirlendiğinden, HEK 293 hücreleri için yapılacak tüm madde uygulamaları da 48 saat olarak gerçekleştirildi. HEK 293 hücrelerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki TMZ ve RSV'nin sitotoksik etkileri MTT yöntemiyle değerlendirildi ve sonuçlar Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verildi. 48 saatlik uygulama sonucunda TMZ için IC₅₀ değeri saptanamazken, RSV için IC₅₀ değeri 173.8 μ M olarak belirlendi.



Şekil 4.5: 48 saatlik TMZ uygulamasının HEK 293 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi (n=5).

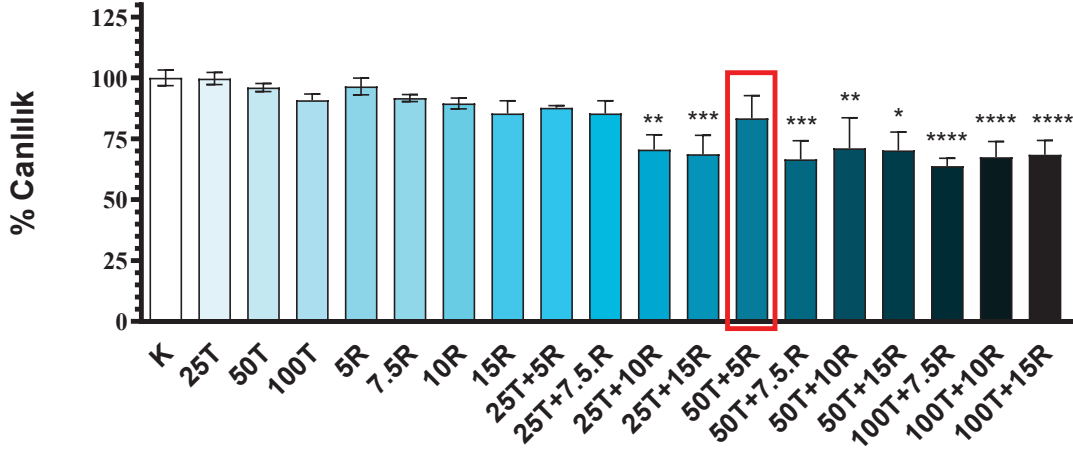


Şekil 4.6: 48 saatlik RSV uygulamasının HEK 293 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi ($R^2=0.975$) ($n=5$).

Sonuç olarak tez kapsamında, U-87 MG hücreleri üzerinde olduğu gibi HEK 293 hücreleri üzerinde de TMZ'nin 50 µM (% 105.3) ve RSV'nin 5 µM (% 109.5) konsantrasyonlarında uygulanarak incelenmesine karar verildi.

4.2.3. Kombine Madde Uygulamalarının U-87 MG ve HEK 293 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkileri

U-87 MG hücrelerine uygulanan her bir maddenin MTT sonuçlarına ilave olarak farklı konsantrasyonlarda maddelerin birlikte uygulandığı kombine gruplarda da toksik etkiler değerlendirildi. Kombine çalışmalarda hücre canlılığının korunduğu uygun dozları saptayabilmek amacıyla farklı dozlarda TMZ ve RSV kombinasyonları hücrelere uygulandı ve sonuçlar Şekil 4.7'de verildi. TMZ için 25, 50 ve 100 µM, RSV için ise 5, 7.5, 10 ve 15 µM konsantrasyonları tek veya kombine şekilde uygulanarak MTT analizi yapıldı.



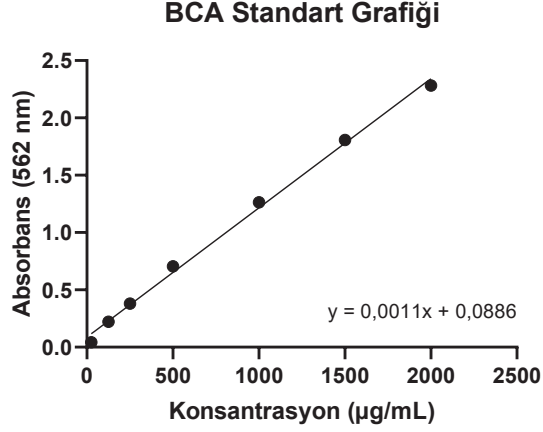
Şekil 4.7: Farklı konsantrasyonda TMZ ve RSV'nin birlikte ve ayrı ayrı U-87 MG hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$) ($n=3$) (TMZ ve RSV dozları μM olarak uygulanmıştır).

Farklı konsantrasyonlarda TMZ ve RSV'nin U-87 MG hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri belirlendikten sonra, kombine uygulamaların bu hücrelerdeki Hsp27 ve Hsp70 proteinlerinin anlatım seviyeleri ile apoptotik aktiviteleri üzerine etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Bu optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildikten sonra, tez çalışması süresince tüm hücresel uygulamaların 50 μM TMZ ve 5 μM RSV ile tamamlanmasına karar verildi. Yapılan bu çalışmada U-87 MG hücrelerine 50 μM TMZ ve 5 μM RSV'nin kombine şekilde uygulanmasının hücre canlılığında % 17.7 oranında bir azalmaya sebep olduğu, ancak bu düşüşün istatistik açıdan anlamlı olmadığı belirlendi.

HEK 293 hücrelerine uygulanan 50 μM TMZ ve/veya 5 μM RSV, hücre canlılığı üzerinde istatistik açıdan anlamlı bir farklılığa neden olmadığından sonuçları verilmedi.

4.3. PROTEİN ÖRNEKLERİNİN KONSANTRASYONLARI

Tez kapsamında oluşturulan tüm deney ve kontrol gruplarının protein konsantrasyonları BCA yöntemini kullanan bir kit aracılığıyla belirlendi. Bu amaçla öncelikle kit içinde bulunan sıgır serum albümini (BSA) farklı konsantrasyonlarda hazırlandı ve kit aracılığıyla değerlendirildi. Elde edilen absorbanlarla oluşturulan standart grafik (Şekil 4.8) ve denklemi kullanılarak örneklerin protein konsantrasyonları hesaplandı.

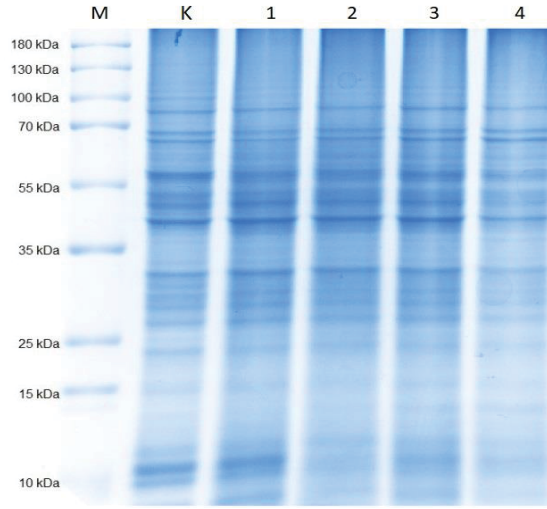


Şekil 4.8: Sığır serum albumini (BSA) standartları (25, 125, 250, 500, 100, 1500, 2000 µg/ml) kullanılarak oluşturulan standart grafik ($R^2=0.997$).

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan örneklerin protein konsantrasyon aralığı 1684 - 8226 µg/ml olarak belirlendi.

4.4. ELEKTROFORETİK ANALİZ SONUÇLARI

BCA yöntemi kullanılarak konsantrasyonları belirlenen protein örneklerinin elektroforetik analizleri SDS-PAGE yöntemi aracılığıyla gerçekleştirildi (Bkz. Bölüm 3.7.4). Tez kapsamında kullanılan her bir protein örneği, jele 50 µg olacak şekilde yüklendi. 200 V sabit voltta ayrımı gerçekleştirilen jeller Bölüm 3.7.5'te anlatıldığı şekilde Coomassie boyama yöntemine göre boyandı. Jeldeki proteinlerin molekül ağırlıkları, moleküler ağırlıkları bilinen protein karışımını içeren Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, 26619) kullanılarak belirlendi. Jelde boyama sonrasında ortaya çıkan protein bantları ChemiDoc MP görüntüleme cihazında ImageLab yazılımı yardımıyla görüntülendi. Çalışma kapsamında elde edilen örnek bir jel görüntüsü Şekil 4.9'da verildi.



Şekil 4.9: Coomassie boyama yöntemine göre boyanmış örnek bir jel görüntüsü.

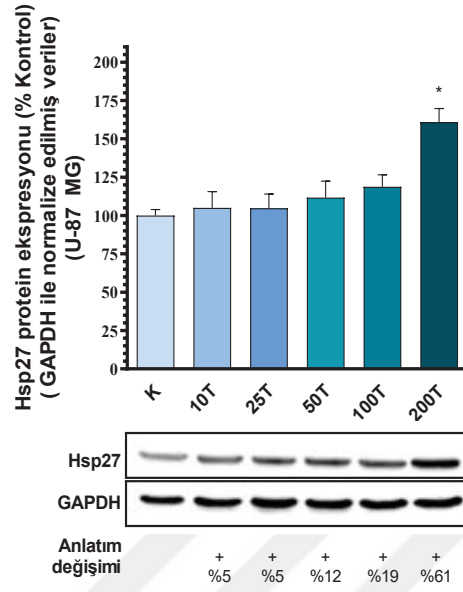
(**M:** Markir; **K:** Herhangi bir madde uygulaması yapılmamış, **1:** 25 µM TMZ uygulanmış, **2:** 50 µM TMZ uygulanmış, **3:** 2.5 µM RSV uygulanmış, **4:** 5 µM RSV uygulanmış U-87 MG hücrelerine ait protein örnekleri)

4.5. İMMÜNOLOJİK ANALİZ SONUÇLARI

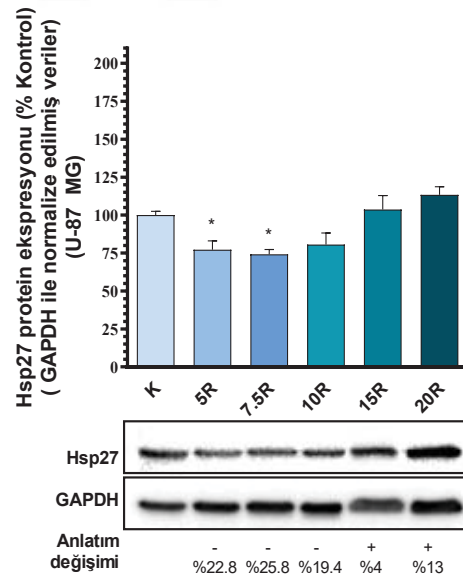
Elektroforez aracılığıyla ayrıştırılan farklı deney gruplarına ait proteinler Bölüm 3.8’de anlatıldığı şekilde PVDF membrana aktarıldıktan sonra hedef antikorlarla işleme sokuldu. Tez çalışması kapsamında yapılan tüm immünolojik analizler en az üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Değerlendirme aşamasında hiçbir uygulama yapılmayan kontrol grubundaki proteinlerin anlatım seviyesi %100 olarak kabul edildi. Diğer sonuçlar kontrol grubuna oranlanarak belirlendi.

4.5.1. Temozolomid ve Resveratrol Uygulamasına Ait İmmünolojik Analiz Sonuçları

U-87 MG hücresi üzerine farklı dozlarda TMZ ve RSV uygulanarak optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Elde edilen verilere göre, 10 µM ve üzerindeki TMZ konsantrasyonlarının kontrole kıyasla Hsp27 anlatımını arttırdığı, ancak 200 µM dışındaki dozların anlamlı bir farklılık oluşturmadığı gözlemlendi. Bununla birlikte, TMZ uygulanan/uygulanmayan hücrelerde Hsp70 anlatımı saptanmadı (Şekil 4.10). Resveratrolün ise 5 µM ve 7.5 µM olan dozlarının Hsp27 anlatımını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde baskıladığı gözlemlendi. TMZ uygulamasına benzer şekilde RSV uygulanan/uygulanmayan hücrelerde de Hsp70 anlatımı saptanmadı (Şekil 4.11).



Şekil 4.10: Farklı konsantrasyonda TMZ uygulanan U-87 MG hücrelerindeki Hsp27 ve GAPDH proteinlerinin anlatım seviyeleri (* $p < 0.05$) ($n=3$) (Kontrol veya deney gruplarında Hsp70 anlatımı görülmediğinden grafikte sonuçları verilmedi) (Şekilde görülen anlatım değişimi, kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplandı).

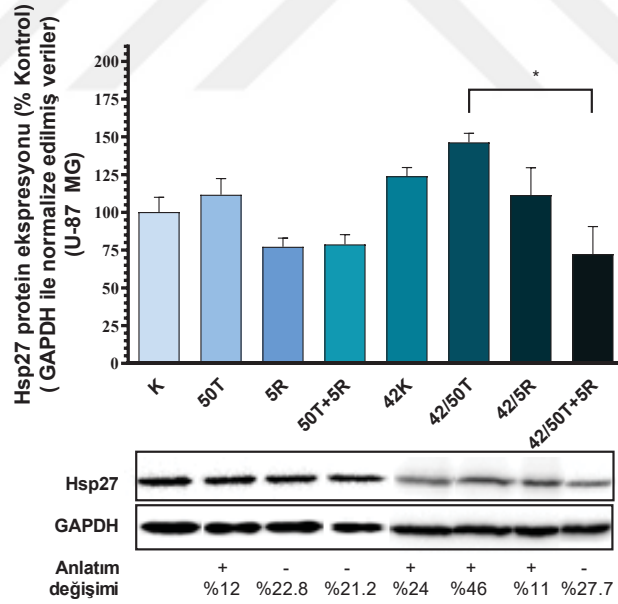


Şekil 4.11: Farklı konsantrasyonda RSV uygulanan U-87 MG hücrelerindeki Hsp27 ve GAPDH proteinlerinin anlatım seviyeleri (* $p < 0.05$) ($n=3$) (Kontrol veya deney gruplarında Hsp70 anlatımı görülmediğinden grafikte sonuçları verilmedi) (Şekilde görülen anlatım değişimi, kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplandı).

4.5.2. Kombine Terapi Uygulamasına Ait İmmünolojik Analiz Sonuçları

U-87 MG hücresi üzerine farklı dozlarda TMZ ve RSV uygulanarak gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucunda, TMZ için 50 μ M, RSV için 5 μ M konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi. Hücrelere kombine şekilde uygulanan TMZ ve RSV'nin, hem ısı şoku uygulaması yapılmadan hem de ısı şoku uygulaması yapıldıktan sonra Hsp27 ve Hsp70 proteinlerinin anlatımı üzerindeki etkileri incelendi. Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te TMZ ve RSV kombine uygulaması sonrasında, ısı şoku uygulanmış/uygulanmamış hücrelerdeki stres proteinlerine ait immünolojik analiz sonuçları yer almaktadır.

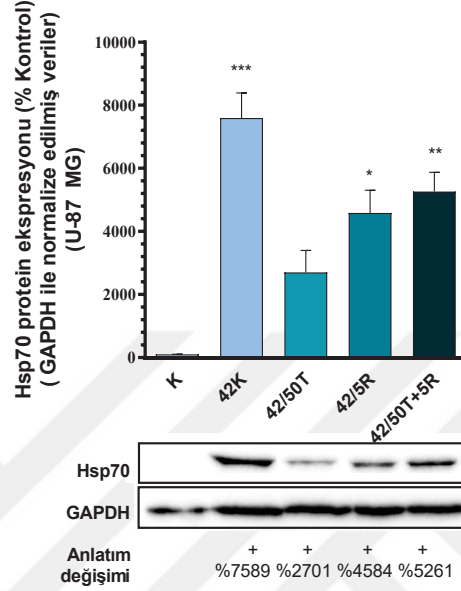
Elde edilen bulgulara göre, Hsp27 protein anlatımının U-87 MG hücrelerinde TMZ uygulaması ile arttığı, RSV ve TMZ+RSV uygulamasında ise azaldığı saptanmakla birlikte, bu farkın istatistik açıdan anlamlı olmadığı belirlendi. Isı şoku uygulanan gruplarda kombine terapinin, TMZ uygulanmış örneğe kıyasla Hsp27 anlatımında istatistiksel açıdan anlamlı bir inhibisyona neden olduğu saptandı.



Şekil 4.12: 50 μ M TMZ ve/veya 5 μ M RSV'nin ısı şoku uygulanmış ve uygulanmamış U-87 MG hücrelerindeki Hsp27 ve GAPDH proteinlerinin anlatımlarına etkileri (* $p < 0.05$) (n=3) (Şekilde görülen anlatım değişimi, kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplandı).

U-87 MG hücrelerindeki Hsp70 anlatım seviyeleri, ancak ısı şoku uygulaması yapıldıktan sonra belirlenebildi. Madde/ajan uygulamasını takiben ısı şoku uygulaması yapıldığından tüm deney

gruplarındaki Hsp70 anlatım seviyesinin, kontrole göre artış gösterdiği saptandı. Kombine uygulama sonuçları ısı şoku uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında Hsp70 anlatım seviyesinin belirgin bir şekilde azaldığı görüldü.

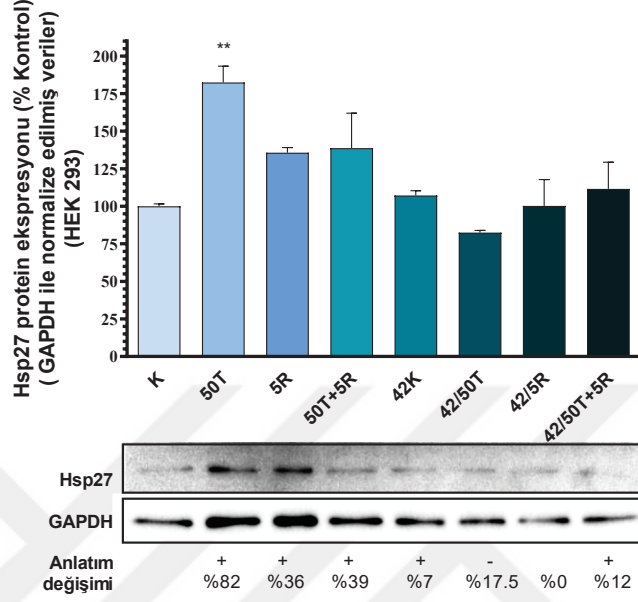


Şekil 4.13: 50 μ M TMZ ve/veya 5 μ M RSV'nin ısı şoku uygulanan U-87 MG hücrelerindeki Hsp70 ve GAPDH proteinlerinin anlatımlarına etkileri (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) ($n=3$) (Isı şoku uygulanmayan gruplarda Hsp70 anlatımı saptanmadığından grafikte sonuçları verilmedi) (Şekilde görülen anlatım değişimi, kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplandı).

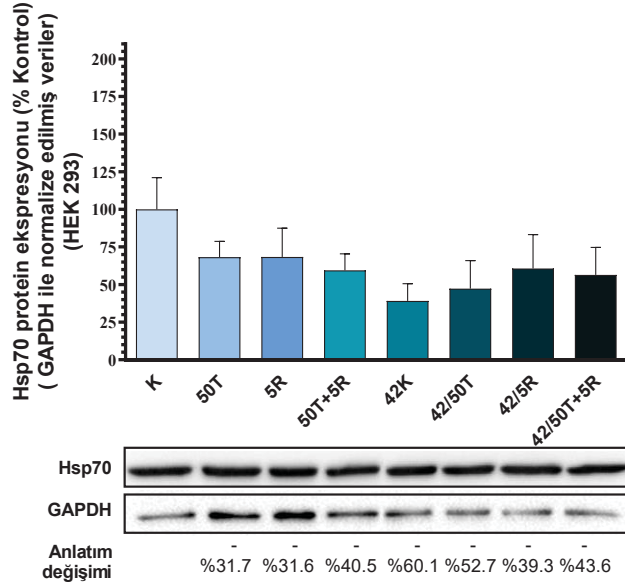
Aynı uygulamalar HEK 293 hücresi üzerinde de gerçekleştirildi. 50 μ M TMZ ve 5 μ M RSV ile birlikte ısı şoku uygulanan/uygulanmayan HEK 293 hücrelerindeki Hsp27 ve Hsp70 proteinlerinin anlatım seviyeleri incelendi. İmmünolojik analiz sonuçları Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te verildi.

Bu analizin sonuçlarına göre, ısı şoku uygulaması yapılan/yapılmayan HEK 293 hücrelerinde kontrole kıyasla Hsp27 proteinlerinin anlatımında artış (Şekil 4.14), Hsp70 proteinlerinin anlatımında ise azalma görüldü (Şekil 4.15). TMZ uygulanmış HEK 293 hücresinde Hsp27 proteininin anlatım seviyesinde istatistiksel açıdan anlamlı derecede artış görüldü, ancak ısı şoku uygulandığında Hsp27 anlatımının inhibe olduğu belirlendi. Kombine uygulamayı takiben ısı şoku uygulanmasının HEK 293 hücrelerindeki Hsp27 anlatımını, kontrole göre değiştirmedeği saptandı (Şekil 4.14). Yapılan uygulamaların Hsp70 proteininin anlatım

seviyelerine etkileri değerlendirildiğinde genel bir düşüş eğilimi saptanırken bu azalmanın istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yaratmadığı belirlendi (Şekil 4.15).



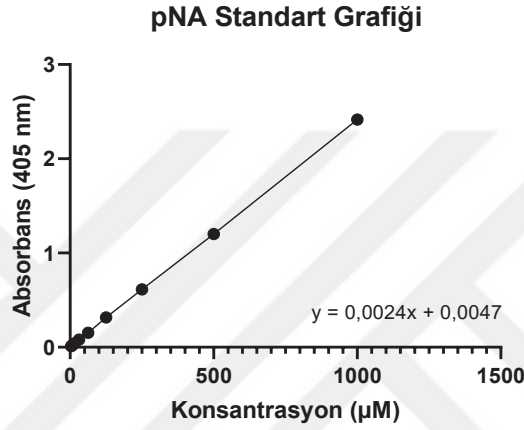
Şekil 4.14: 50 μ M TMZ ve/veya 5 μ M RSV'nin ısı şoku uygulanmış ve uygulanmamış HEK 293 hücrelerindeki Hsp27 ve GAPDH proteinlerinin anlatımlarına etkileri (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) (n=3) (Şekilde görülen anlatım değişimi, kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplandı).



Şekil 4.15: 50 μ M TMZ ve/veya 5 μ M RSV'nin ısı şoku uygulanmış ve uygulanmamış HEK 293 hücrelerindeki Hsp70 ve GAPDH proteinlerinin anlatımlarına etkileri (n=3) (Şekilde görülen anlatım değişimi, kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplandı).

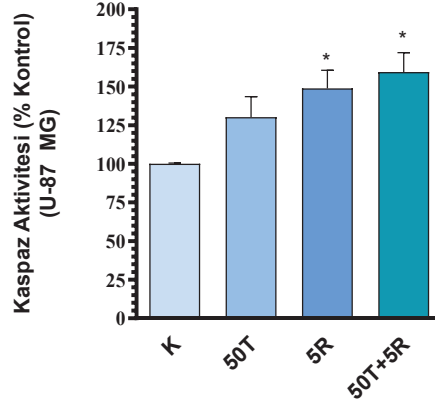
4.6. KASPAZ 3 AKTİVİTESİ SONUÇLARI

Bu tez çalışmasında, hücrelere uygulanan ajanların apoptotik etkileri, hücrelerdeki kaspaz-3 enziminin aktivitesi değerlendirilerek saptandı. pNA kullanılarak oluşturulan standart grafik Şekil 4.16'da verildi. Bu grafikten elde edilen denklem yardımıyla kontrol ve deney gruplarındaki kaspaz-3 enzim aktivitesi hesaplandı ve sonuçlar protein miktarlarına göre normalize edilerek değerlendirildi.

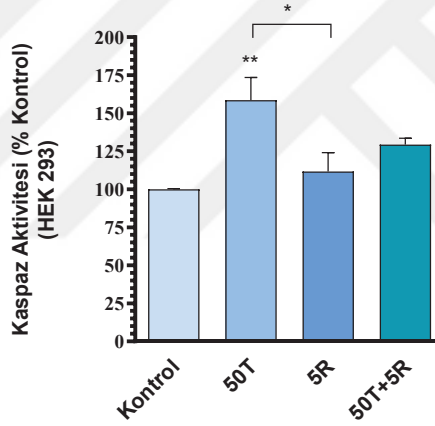


Şekil 4.16: pNA standartları (3.9, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µM) ile oluşturulan standart grafik ($R^2=1$).

U-87 MG hücreleri için elde edilen sonuçlar Şekil 4.17'de, HEK 293 hücreleri için elde edilen sonuçlar ise Şekil 4.18'de verildi. U-87 MG hücrelerinde 5 µM RSV'nin apoptozu indüklemeye etkili olduğu ve 5 µM RSV ile 50 µM TMZ kombinasyonunun ise istatistiksel açıdan anlamlı, daha iyi bir etki ortaya koyduğu belirlendi. Bununla birlikte HEK 293 hücrelerindeki kaspaz 3 aktivitesinin 50 µM TMZ uygulamasıyla birlikte anlamlı bir şekilde arttığı, ancak uygulanan TMZ ve RSV kombinasyonunun bu hücrelerde kontrole göre istatistik açıdan anlamlı bir fark yaratmadığı saptandı.



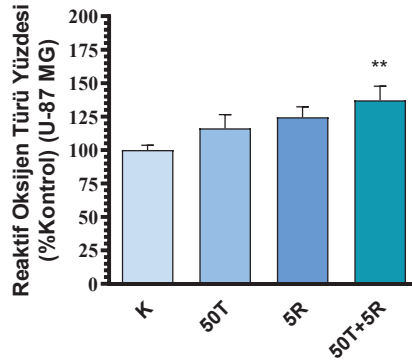
Şekil 4.17: 50 μ M TMZ ve/veya 5 μ M RSV uygulamasının U-87 MG hücrelerindeki kaspaz 3 enzim aktivitesine etkileri (* $p < 0.05$) (n=3).



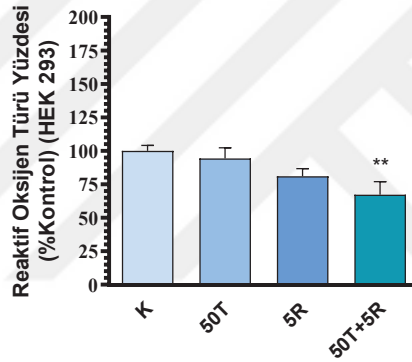
Şekil 4.18: 50 μ M TMZ ve/veya 5 μ M RSV uygulamasının HEK 293 hücrelerindeki kaspaz 3 enzim aktivitesine etkileri (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) (n=3).

4.7. HÜCRE İÇİ REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

CM-H₂DCFDA aracılığıyla değerlendirilen hücre içi reaktif oksijen türlerinin seviyesi U-87 MG ve HEK 293 hücreleri için farklı sonuçlar ortaya koydu. TMZ ve RSV'nin kombine uygulaması U-87 MG hücrelerinde ROT seviyelerini anlamlı derecede artırırken (Şekil 4.19), HEK 293 hücrelerinde, glioma hücrelerindeki durumun tam tersi şekilde ROT oluşumunu anlamlı derecede azalttığı saptandı (Şekil 4.20).



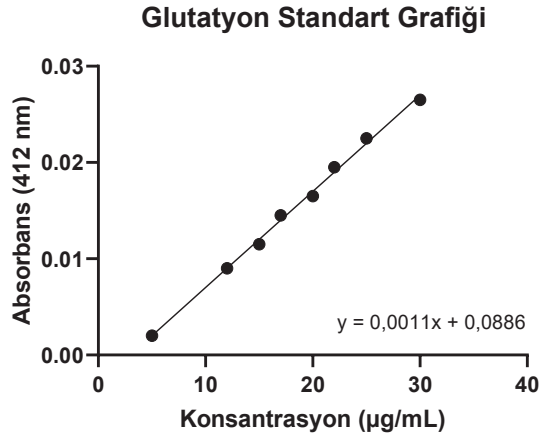
Şekil 4.19: 50 µM TMZ ve/veya 5 µM RSV uygulamasının U-87 MG hücrelerindeki reaktif oksijen türleri üzerine etkileri (**p<0.01) (n=12).



Şekil 4.20: 50 µM TMZ ve/veya 5 µM RSV uygulamasının HEK 293 hücrelerindeki reaktif oksijen türleri üzerine etkileri (**p<0.01) (n=12).

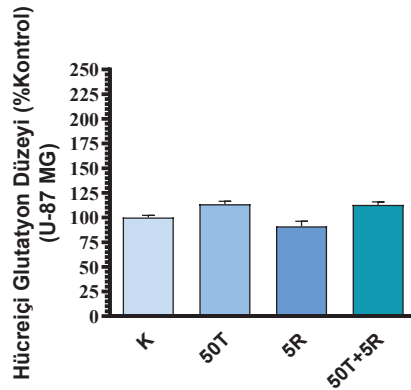
4.8. İNDİRGENMİŞ GLUTATYON İÇERİĞİ

Glutatyon (GSH, γ -Glu-Cys-Gly), radikal aracılı hasarın önlenmesinde önemli bir rol üstlenmekte ve antioksidan bir metabolit olarak hücrel savunmada görev almaktadır. Oksidatif strese maruz kalan hücrede, indirgenmiş glutatyon seviyesi azalırken, oksitlenmiş glutatyon (GSSG) seviyesinin arttığı bilinmektedir (Browne ve Armstrong, 1998). Bu çalışmada, yapılan uygulamalar sonrasında U-87 MG ve HEK 293 hücrelerindeki indirgenmiş glutatyon seviyeleri Şekil 4.21’de verilen standart grafik yardımıyla belirlendi.



Şekil 4.21: İndirgenmiş glutasyon kullanılarak oluşturulan standart grafik ($R^2=0.997$).

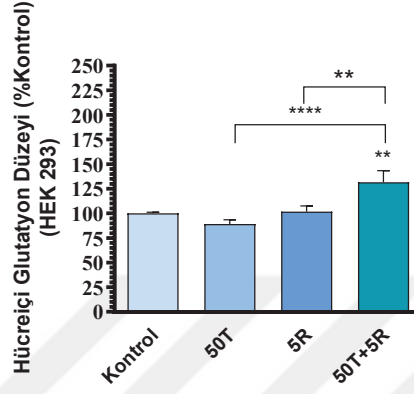
Elde edilen sonuçlar, resveratrolün U-87 MG hücrelerinde GSH seviyesini azalttığını (Şekil 4.22), HEK 293 hücrelerinde ise düşük oranda arttırdığını (Şekil 4.23), ancak bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını ortaya koydu. U-87 MG hücrelerinde tek başına ve/veya kombine şekilde uygulanan ajanların/maddelerin indirgenmiş glutasyon seviyesi üzerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yaratmadığı belirlendi (Şekil 4.22).



Şekil 4.22: 50 µM TMZ ve/veya 5 µM RSV uygulamasının U-87 MG hücrelerindeki indirgenmiş glutasyon seviyesi üzerine etkileri (n=12).

HEK 293 hücresinde ise TMZ ya da RSV'nin tek başına uygulanmasının kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede bir farklılık ortaya koymadığı, TMZ ve RSV kombinasyonunun ise kontrole kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı bir artış (%32

oranında) gösterdiği saptandı (Şekil 4.23). Bununla birlikte, HEK 293 hücrelerine kombine şekilde yapılan uygulamanın hücre içi indirgenmiş glutatyon seviyesi üzerinde, tek tek ajanların uygulanmasından daha etkili olduğu belirlendi. Kombine uygulama sonucunda görülen artışın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu saptandı.



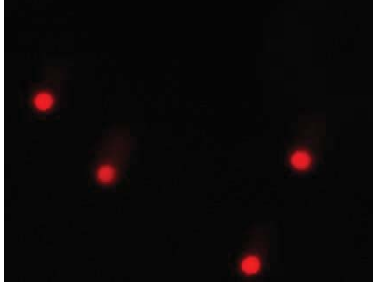
Şekil 4.23: 50 µM TMZ ve/veya 5 µM RSV uygulamasının HEK 293 hücrelerindeki indirgenmiş glutatyon seviyesi üzerine etkileri (n=12).

4.9. DNA HASARI

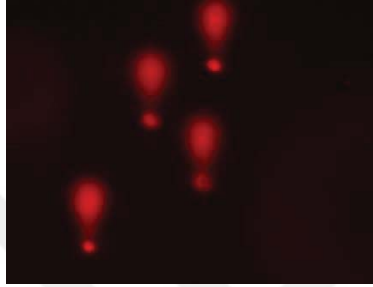
Tez kapsamında hücrelere TMZ ve/veya RSV uygulaması yapıldıktan sonra, her bir hücredeki DNA hasarını ve genotoksisiteyi değerlendirmek amacıyla Comet analizi uygulandı. Bu analizde herhangi bir hasarın oluşmadığı hücrelerde kuyruk yapısı gözlenmezken, hasarın olduğu hücrelerde baş kısmına ek olarak kuyruklu yıldız benzeyen bir kuyruk yapısı gözlemlenir.

DNA kırıklarının saptamaya yönelik bu analiz yönteminde negatif kontrol grubu hücrelerine sadece besiyeri uygulanırken, pozitif kontrol grubu hücrelerine DNA kırığına neden olan EMS uygulaması yapıldı. Analiz sonucunda negatif kontrol hücrelerinde kırık olmadığı, EMS'ye maruz bırakılmış hücrelerde ise yüksek oranda kırık olduğu saptandı. Hücrelere ait floresan görüntüler Şekil 4.24'te verildi.

A. U-87 MG - NK



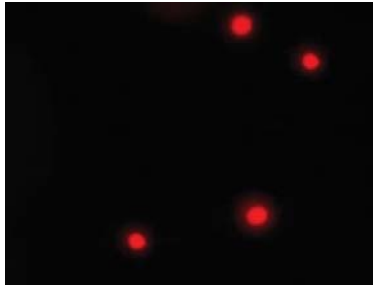
B. U-87 MG - PK



C. U-87 MG - 50T



D. U-87 MG - 5R



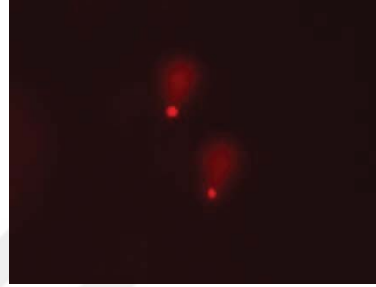
E. U-87 MG - 50T+5R



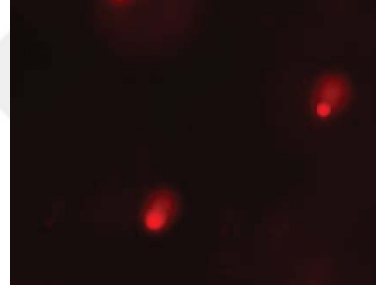
F. HEK 293 - NK



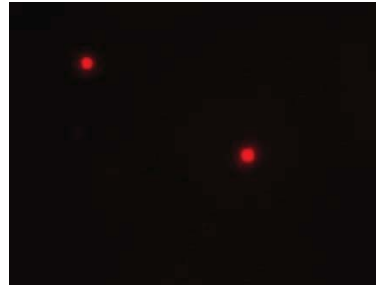
F. HEK 293 - PK



G. HEK 293 - 50T



H. HEK 293 - 5R



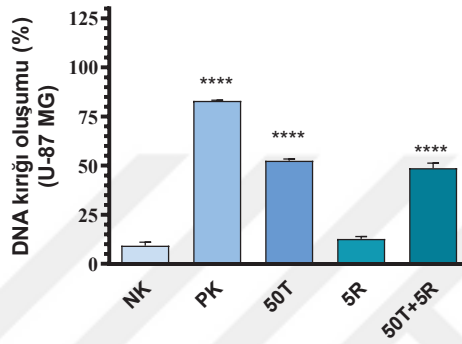
İ. HEK 293 - 50T+5R



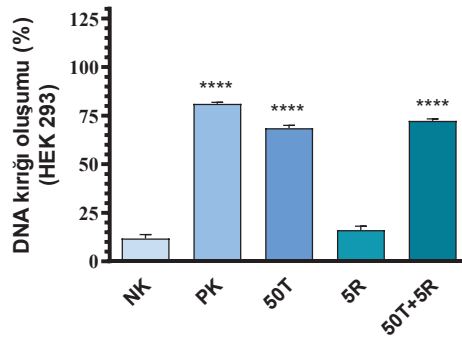
Şekil 4.24: Comet analizi sonucunda U-87 MG ve HEK 293 hücrelerine ait floresan mikroskop görüntüleri.

*Pozitif kontroller (PK) EMS ile DNA'sı hasara uğratıldı.

U-87 MG ve HEK 293 hücrelerinde yapılan Comet analizine ait grafiksel sonuçlar Şekil 4.25 ve Şekil 4.26’da verildi. Uygulanan 5 μ M RSV’nin hücrede DNA kırığına sebep olmadığı, 50 μ M TMZ’nin ise hücrelerdeki DNA’ya hasar vererek kırıklara yol açtığı belirlendi. Elde edilen bulgular her iki hücre türü için de benzer sonuçları ortaya çıkardı. 50 μ M TMZ ve 5 μ M RSV’nin kombine şekilde uygulanmasının hücrelerdeki DNA hasarını istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde arttırdığı görüldü.



Şekil 4.25: 50 μ M TMZ ve/veya 5 μ M RSV uygulamasının U-87 MG hücrelerinde DNA kırığı oluşumuna etkileri (****p<0.0001) (n>100).

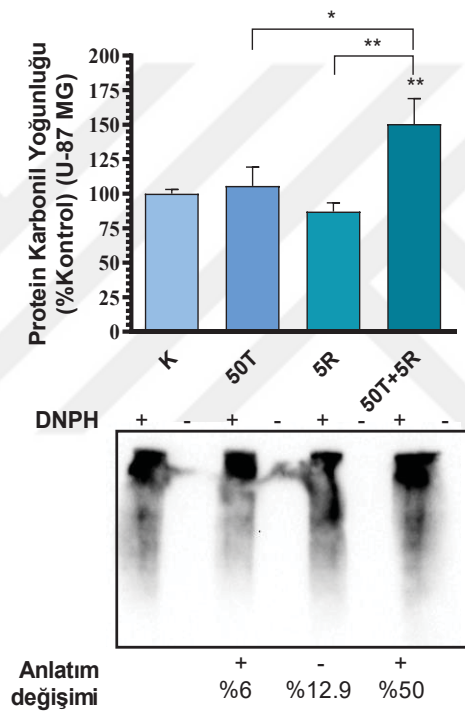


Şekil 4.26: 50 μ M TMZ ve/veya 5 μ M RSV uygulamasının HEK 293 hücrelerinde DNA kırığı oluşumuna etkileri (****p<0.0001) (n>100).

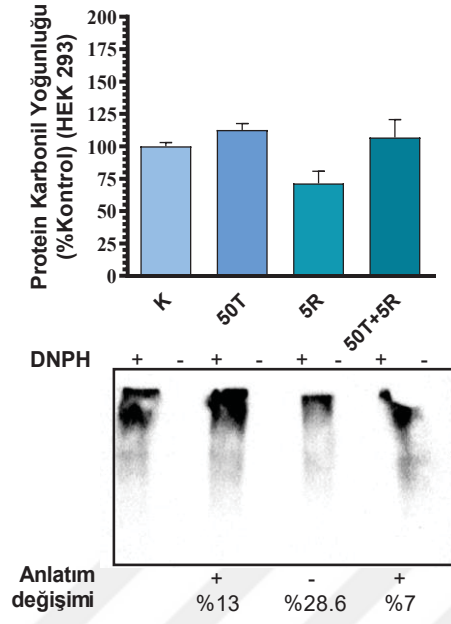
4.10. PROTEİN KARBONİLLERİ

Tez kapsamında yapılan uygulamalar sonrasında U-87 MG ve HEK 293 hücrelerinde ortaya çıkan protein karbonilleri “OxyBlot Protein Detection Kit” aracılığıyla belirlendi. Protein

hasarını ölçmeye yönelik gerçekleştirilen bu analizde kombine uygulamanın U-87 MG hücrelerinde protein karbonilini istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde (%50 oranında) arttırdığı (Şekil 4.27), HEK 293 hücrelerinde ise istatistiksel olarak değiştirmedeği ortaya konuldu (Şekil 4.28). U-87 MG hücrelerine uygulanan TMZ ve RSV kombinasyonunun sadece kontrole göre değil, tek başlarına TMZ veya RSV uygulanan örnekler göre de anlamlı bir artış gösterdiği belirlendi (Şekil 4.27). HEK 293 hücresine yapılan uygulamaların protein karbonili oluşumu açısından kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı bir değişime neden olmadığı saptandı (Şekil 4.28).



Şekil 4.27: 50 µM TMZ ve/veya 5 µM RSV uygulamasının U-87 MG hücrelerinde protein karbonil oluşumu üzerindeki etkileri (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) ($n=9$) (Şekilde görülen anlatım değişimi, kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplandı).



Şekil 4.28: 50 μ M TMZ ve/veya 5 μ M RSV uygulamasının HEK 293 hücrelerinde protein karbonil oluşumu üzerindeki etkileri (n=9) (Şekilde görülen anlatım değişimi, kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplandı).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda yer alan hastalıklardan biridir. 2018 ölüm istatistiklerine göre kanserden tahmini ölüm sayısı 9.6 milyon olarak açıklanmıştır. Beyin ve diğer sinir sistemi tümörleri, en sık görülen kanser tipleri arasında bulunmamasına rağmen, ölüm oranları açısından değerlendirildiğinde üst sıralarda yer almaktadır. En sık görülen malignant primer beyin tümörü olan glioblastoma multiforme (GBM), en saldırgan tümör tiplerinden biri olarak kabul edilmektedir. Bu hastalar için tedavi seçenekleri oldukça sınırlıdır ve tanı konulduktan kısa bir süre sonra, uygulanan tüm tedavilere rağmen, hasta yaşamını yitirmektedir (Stupp ve diğ., 2007; Siegel ve diğ., 2019; World Health Organization, 2018).

Merkezi sinir sisteminde genel olarak çok rastlanılan ve onkoterapik tedavi zorluğu bulunan glioblastoma tedavisinde, en sık tercih edilen ilaç temozolomid (TMZ)'dir (Filippi-Chiela ve diğ., 2013). TMZ bazlı kemoterapinin tedavide etkin olduğu bilinmesine rağmen, özellikle tümör hücrelerinde oluşan TMZ direnci nedeniyle bütün hastalar bu tedaviden aynı şekilde faydalanamamaktadır. Bu sebeple ilacın terapötik etkinliği sınırlı kalmaktadır (Huang ve diğ., 2012). Kanser terapisinde, antikanser ilaçların doğal ürünlerle kombine halde kullanılması, bu ilaçların etkilerini güçlendirmede ve ilaç dozlarının azaltılmasıyla sağlıklı hücreler üzerindeki yan etkilerinin minimize edilmesinde oldukça önemli bir strateji haline gelmiştir. Ancak doğal ürünlerin bu ajanlarla olan etkileşimine ilişkin sınırlı sayıda araştırma literatürde yer almaktadır (Ferreira ve diğ., 2018). Bazı çalışmalarda, doğal ürünlerin antikanser ilaçların etkilerine olumlu katkı sağladığı ve sağlıklı hücreler üzerindeki yan etkilerini azalttığı, kombine halde hücrelere uygulandığında sinerjistik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Fujiki ve Suganuma, 2012; Eid ve diğ., 2012). Kemoterapötik bir ajan olan TMZ'nin etkinliğini arttırabilmek için çeşitli maddelerle birlikte uygulandığı kombine tedavi çalışmaları bu açıdan umut vadetmektedir. Bu çalışmalardan birinde zerdeçalın etken maddesi olan kurkuminin, glioblastomayı TMZ tedavisine daha duyarlı hale getirdiği saptanmıştır. U-87 MG hücrelerinde yapılan bu çalışmada, TMZ'ye karşı oluşturulan terapötik yanıt ile birlikte apoptozun arttığı gözlenmiştir (Yin ve diğ., 2014). Bir florotannin bileşeni olan "eckol" maddesinin, glioma kök hücrelerine benzer yapıda bazı hücrelerde TMZ ve iyonize radyasyona karşı duyarlılığı arttırdığı saptanmıştır (Hyun ve diğ., 2011). T98G hücre hattında yapılan diğer bir çalışmada ise, tümör hücrelerinin apoptozunu sağlayan doğal bir antioksidan flavonoid olan kersetinin,

TMZ ile birlikte uygulandığında apoptozu indüklediği ve tek başına kullanımından daha etkili sonuçlar ortaya koyduğu gösterilmiştir (Jakubowicz-Gil ve diğ., 2013).

Resveratrol, başta üzüm olmak üzere birçok meyve türünde bulunan polifenol türevli bir maddedir. Bitkilerdeki fizyolojik fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, mantar enfeksiyonlarına ve diğer stres koşullarına karşı koruma sağladığı düşünülmektedir. U-87 MG ve GBM8401 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, resveratrolün TMZ ile birlikte kullanıldığında TMZ aracılığıyla indüklenen otofajiyi baskıladığı ve apoptozu indüklediği bildirilmiştir. Antioksidan özellikteki resveratrol ile temozolomidin etkileşim mekanizması halen belirsizliğini korumaktadır (Langcake ve Pryce, 1976; Lin ve diğ., 2012).

Temozolomid, glioblastoma tedavisinde yaygın olarak kullanılmakla birlikte, bu ilaca karşı oluşan direnç genellikle tekrarlayan glioblastomada ortaya çıkmaktadır. Bu durum tedavideki başarısızlığın ana nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. MGMT protein anlatım seviyesinin, TMZ direncinde etkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, MGMT ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin düzenlendiği ve bu proteinin anlatımının baskılandığı birçok çalışma yapılmıştır (Hegi ve diğ., 2005; Huang ve diğ., 2012). Yapılan bir çalışmada, doğal bir polifenol olan resveratrolün, nispeten yüksek MGMT aktivitesine sahip olan T98G glioblastoma hücrelerinin TMZ direncini tersine çevirebildiği gösterilmiş ve altta yatan mekanizmanın NF- κ B-bağımlı yolakla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada, TMZ ve resveratrol kombine tedavisinin, TMZ'nin antitümör potansiyelini arttırdığı ve TMZ'ye dirençli bu hücrelerde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Huang ve diğ., 2012).

Bu tez çalışması; U-87 MG insan glioma hücre hattı ve HEK 293 insan embriyonik hücre hattı kullanılarak, temozolomid ve resveratrol moleküllerinin birlikte uygulanması durumunda hücrelerde meydana gelen bazı değişimleri incelemeyi hedeflemiştir. Hücrelere uygulanan madde/ajanların sitotoksikite testleri tamamlanıp, tüm deney setlerinde toksik olmayan konsantrasyonlarda madde/ajanlar hücrelere uygulandıktan sonra; hücre içi ROT seviyeleri, çeşitli proteinler ve DNA üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Çalışma kapsamında öncelikle TMZ ve RSV'nin U-87 MG ve HEK 293 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT yöntemi uygulanarak belirlenmiş olup, her bir ajan/maddenin %50 inhibisyona neden olan konsantrasyon (IC₅₀) değerleri hesaplanmıştır. İlk aşamada, U-87 MG hücresinde 24, 48 ve 72 saatlik farklı madde uygulamaları yapılmış ve sonuçta TMZ için elde

edilen IC₅₀ değerleri sırasıyla 1750, 988.2 ve 175 µM; RSV için ise 186, 40.7 ve 13.9 µM olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1). Yapılan bu ön çalışmalar neticesinde TMZ ve RSV'nin U-87 MG hücrelerine 48 saat süreyle uygulanmasına karar verilmiştir. Bu bağlamda HEK 293 hücrelerine yapılan tüm uygulamalarda aynı şekilde 48 saat olarak gerçekleştirilmiştir. MTT sonuçlarına göre HEK 293 hücresi için TMZ uygulaması sonrasında IC₅₀ değeri belirlenememiştir, RSV için ise IC₅₀ değeri 173.8 µM olarak hesaplanmıştır (Bkz: Bölüm 4.2.2). Yapılan diğer çalışmaların sonuçları ile karşılaştırıldığında, U-87 MG hücrelerinde TMZ için IC₅₀ değerinin 864.1 µM (Ferretti ve diğ., 2013) ve 702.4 µM (Lan ve diğ, 2015) olduğu ve yine aynı hücrede resveratrol için IC₅₀ değerinin 32.5 µM olduğu (Önay Uçar ve Şengelen, 2019) bildirilmiştir. Sonuçta TMZ ve RSV uygulamasından elde edilen bulgular, literatür bilgisiyle uyumlu görünmektedir. HEK 293 hücrelerinde ise TMZ ve RSV uygulamasına ait herhangi bir literatür bilgisi bulunmamaktadır. Elde edilen verilere göre, her iki hücrede de temozolomidin IC₅₀ değerlerinin resveratrolle kıyaslandığında oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, HEK 293 hücrelerinde elde edilen IC₅₀ değerleri U-87 MG hücrelerindeki değerlere göre daha da yüksektir. Bu sonuç uygulanan maddelerin U-87 MG glioblastoma hücrelerinde, HEK 293 kontrol hücrelerine kıyasla, daha yüksek sitotoksik etki ortaya koyduğunu göstermektedir.

Toksisite testleri tamamlandıktan sonra, TMZ ve RSV'nin hücrelere uygulanacak konsantrasyonlarını belirleyebilmek amacıyla, ajan/maddelerin U-87 MG hücrelerindeki Hsp27 protein anlatım seviyesi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Yapılan ön çalışmalarda, farklı konsantrasyonlarda uygulanan TMZ'nin U-87 MG glioma hücrelerinde Hsp27 protein anlatımını arttırdığı, ancak 200 µM TMZ dışında bu artışın istatistiksel olarak anlamlı bir değişim ortaya koymadığı (Şekil 4.10); RSV'nin ise 5 ve 7.5 µM konsantrasyonlarında Hsp27 protein anlatımını anlamlı bir şekilde baskıladığı gözlenmiştir (Şekil 4.11). Bu ön çalışma ve sitotoksisite analizleri göz önüne alınarak, tüm hücrelere TMZ'nin 50 µM ve RSV'nin 5 µM konsantrasyonda uygulanmasına karar verilmiştir. Toksisite analizleri, 50 µM TMZ'nin %96.1 oranında, 5 µM RSV'nin %96.5 oranında, 50 µM TMZ ve 5 µM RSV kombine uygulamasının ise %82.3 oranında U-87 MG hücre canlılığına sebep olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.7). Hücrelere uygulanan bu ajan/maddeler istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermediği saptanmıştır.

Yapılan immünolojik analizler, U-87 MG hücrelerinde Hsp70'in indüklenebilir formunun anlatım yapmadığını göstermiştir (Bkz: Bölüm 4.5.1). Bu nedenle ısı şoku aracılığıyla

indüklendiği bilinen bu proteinlerin, anlatım seviyelerindeki değişimleri belirlemek amacıyla hücreler, ajan/madde uygulamasını takiben ısı şokuna maruz bırakılmıştır. Isı şoku uygulaması yapılan/yapılmayan tüm deney gruplarında (Tablo 3.3) Hsp27 ve Hsp70 proteinlerinin anlatım seviyelerindeki değişimler, hem U-87 MG hem de HEK 293 hücrelerinde immünolojik analizler ile değerlendirilmiştir. Bu bağlamda U-87 MG ve HEK 293 hücrelerine 50 μ M TMZ ve/veya 5 μ M RSV uygulamasını takiben 42°C'lık ısı şoku uygulaması yapılmıştır. Analizler, ısı şoku uygulaması yapılmayan 5 μ M RSV, 50 μ M TMZ ve 5 μ M RSV kombine uygulamalarında U-87 MG hücrelerindeki Hsp27 protein anlatım seviyesinin azaldığını göstermiştir. Ancak bu değişim istatistiksel açıdan anlamlı fark ortaya koymamaktadır (Şekil 4.12). Isı şokuna maruz bırakılan deney gruplarında ise sonuçlar değişkenlik göstermektedir, fakat bu değişimlerde de kontrolle kıyaslandığında anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir. Bu veriler kullanılarak gerçekleştirilen post testler, ısı şoku uygulanmış gruplarda anlamlı farklılık olduğunu ortaya koymuştur. TMZ uygulanan grup, TMZ ile RSV uygulanan grupla karşılaştırıldığında, Hsp27 anlatımında istatistiksel açıdan anlamlı bir inhibisyon saptanmıştır (Şekil 4.12). U-87 MG hücrelerindeki Hsp70 anlatım seviyeleri ise ısı stresi uygulandıktan sonra değerlendirilmiş, kontrol grubu ile kıyaslandığında Hsp70 anlatım seviyesinde belirgin bir artış saptanmıştır. Isı şoku uygulaması yapılan grup ile diğer gruplar kıyaslandığında tüm gruplarda Hsp70 anlatımının inhibe olduğu gözlemlenmiş, ancak bu düşüşün istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.13). U-87 MG hücreleri için yapılan tüm uygulamalar HEK 293 hücreleri için de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular HEK 293 hücrelerinde Hsp27 proteinlerinin anlatım seviyesi açısından, TMZ uygulaması dışında, anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymuştur (Şekil 4.14). HEK 293 hücrelerindeki Hsp70 protein anlatım seviyelerinin ise baskılandığını, ancak bu düşüşün yine anlamlı bir fark ortaya koymadığını göstermiştir (Şekil 4.15). Castro ve diğ. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, TMZ uygulamasının U-87 MG, DBTRG ve Gli36 glioma hücre hatlarında Hsp27 anlatımını arttırdığı; Hsp70 anlatımını Gli36 hücresinde arttırdığı, DBTRG hücresinde azalttığı ve U-87 MG hücresinde değiştirmedeği belirlenmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada, resveratrolün glioblastoma hücreleri üzerinde Hsp27 inhibisyonunu sağladığı bildirilmiştir (Önay Uçar ve Şengelen, 2019). Tümör gelişimi ve ilaç direnci ile yakından ilişkili Hsp27 proteini ile ilgili bir diğer çalışmada, U251 ve U87 insan glioblastoma hücrelerinde kersetinin TMZ tarafından indüklenen Hsp27 anlatımını inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Sang ve diğ., 2014). Paolini ve diğ. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, TMZ tedavisinin, U-87 MG

hücre hattındaki HSP70 anlatım seviyelerinde değişime neden olmadığı gösterilmiştir. Bu çalışmalar, temozolomidin farklı glioma hücrelerinde farklı tepkilere neden olduğunu ortaya koymuştur (Chorny ve diğ., 2000). Bu çalışma kapsamında elde ettiğimiz tüm sonuçlar, literatür bilgileriyle uyum göstermektedir.

Kanser hücrelerinin, uygulanan tedaviyle birlikte apoptoza yönlendirilmesi araştırmacıların en önemli hedefleri arasındadır. Bu bağlamda glioma ve kontrol hücrelerine yapılan uygulamaların apoptotik etkileri de tez kapsamında değerlendirilmiştir. Hücrelerin apoptoz eğilimleri ile ilgili olarak, uygulama yapılan U-87 MG ve HEK 293 hücrelerindeki kaspaz 3 enzim seviyeleri kontrol grubu ile kıyaslanarak incelenmiştir. TMZ ve RSV kombine terapi uygulamasının, U-87 MG hücrelerindeki kaspaz aktivitesini istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde arttırdığı ve apoptozu yaklaşık %60 oranında indüklediği saptanmıştır (Şekil 4.17). Ancak, aynı kombine terapi, HEK 293 hücrelerinin kaspaz aktivitesinde anlamlı bir değişime neden olmamıştır (Şekil 4.18). U-87 MG hücrelerine uygulanan RSV'nin apoptozu indüklediğini bildiren farklı çalışmalar literatürde bulunmaktadır (Jiang ve diğ., 2005; Sang ve diğ., 2014). Ayrıca TMZ ve RSV kombine terapisinin, T98G hücrelerinde apoptozu indüklediği (Huang ve diğ., 2012), benzer şekilde kersetin ve TMZ kombinasyonunun aynı hücrelerde apoptozu indüklediği ve TMZ'nin tek başına kullanımından daha etkili olduğu bilinmektedir (Jakubowicz-Gil ve diğ., 2013). Bu kapsamda, elde ettiğimiz sonuçların diğer literatür bulgularıyla uyumlu olduğu görülmektedir.

Reaktif oksijen türlerinin hücre içinde aşırı üretimi hücre ölümüne neden olmaktadır. U-87 MG glioma hücrelerinde yapılan bir çalışmada, hücre içi ROT seviyesinin Hsp27 susturumuyla birlikte % 45 oranında arttığı saptanmıştır (Ye ve diğ., 2016). Bu tez çalışmasında, U-87 MG hücrelerindeki TMZ ve RSV kombine uygulamasının, kontrol grubuna göre hücre içi ROT oluşumunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde, yaklaşık %40 oranında arttırdığı belirlenmiştir (Şekil 4.19). Kombine uygulama, HEK 293 hücrelerinde ise ROT seviyesinde yaklaşık %30 oranında ve istatistiksel olarak anlamlı derecede bir azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.20). Daha önce yapılan bir çalışmada, U-87 MG hücrelerinde TMZ uygulamasının ROT seviyesinde bir artışa yol açtığı, T98G ve GBM-N15 hücrelerinde ise anlamlı bir değişiklik yaratmadığı bildirilmiştir (Chen ve diğ., 2015). HEK 293 hücrelerinde resveratrolün, özellikle kersetinle kombine halde kullanıldığında, yüksek glukoz uygulanan hücrelere oranla ROT miktarını anlamlı ölçüde düşürdüğü, ancak kontrole kıyasla ROT oranını arttırmasına rağmen bu farkın

anlamli bir farklılık olmadığı belirtilmiştir (Zahra ve diğ., 2017). Ayrıca Raghubeer ve diğ. (2015), HEK 293 hücrelerinde RSV'nin ROT seviyesini 24 saatlik uygulamada düşürdüğünü, ancak 48 saatlik uygulamada istatistiksel açıdan bir fark oluşturmadığını göstermiştir. Sonuç olarak hücre içi ROT miktarlarına ilişkin elde ettiğimiz bulgular, hem U-87 MG hem de HEK 293 hücreleri için diğer literatür bilgileriyle uyum göstermektedir.

İndirgenmiş glutatyon, hücre savunmasında ve toksik maddelerin uzaklaştırılmasında görev alan önemli bir moleküldür. Antioksidan özelliğe sahip RSV'nin sıçanda hipokampal ve kortikal astrosit kültürlerinde GSH seviyesini arttırdığına dair çalışmalar bulunmaktadır (Bellaver ve diğ., 2014; de Almeida ve diğ., 2007). Hamster yumurtalık hücresinde yapılan bir çalışmada, glutatyonun HSP sentezinde yer almadığı, ancak GSH tükenmesinin, protein sentezinin spesifik olmayan inhibisyonu yoluyla, dolaylı olarak inhibe edebileceği vurgulanmaktadır (Freeman ve diğ., 1988). Bununla birlikte, karaciğer hepatoselüler karsinoma (Hep G2) hücrelerinde yapılan bir çalışmada, glutatyon seviyesi düşüklüğünde Hsp70 sentezinin arttığı ve dolayısıyla stres proteinlerinin sentezinin glutatyon konsantrasyonlarından etkilenebileceği bildirilmiştir (Freeman ve diğ., 1993). U-87 MG glioma hücresiyle yapılan bir çalışmada ise, GSH seviyesinin Hsp27 susturumuyla birlikte önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır (Ye ve diğ., 2016). HEK 293 hücresinde TMZ'nin glutatyon üzerindeki etkisine dair herhangi bir literatür bulunmamakla birlikte, resveratrolün GSH seviyesini arttırdığı bildirilmiştir (Zahra ve diğ., 2017; Raghubeer ve diğ., 2015). Bu tez kapsamında uygulama sonrası U-87 MG ve HEK 293 hücrelerindeki glutatyon seviyeleri incelendiğinde, özellikle RSV'nin U-87 MG hücrelerinde GSH seviyesini azalttığı (Şekil 4.22), HEK 293 hücrelerinde ise arttırdığı (Şekil 4.23) gözlenmiştir. Ancak bu değişimler istatistiksel açıdan anlamlı değildir. Kombine terapi uygulaması sonucunda, hem U-87 MG hem de HEK 293 hücrelerinde indirgenmiş glutatyon düzeylerinde bir artış saptanmış, bu artışın sadece HEK 293 hücresinde anlamlı bir fark ortaya koyduğu belirlenmiştir (Şekil 4.23).

Hücrelerde DNA hasar miktarını belirlemede bir ölçüt olan Comet analizi ile ilgili olarak, hem U-87 MG hem de HEK 293 hücrelerinde, tek başına TMZ ve kombine terapi (TMZ + RSV) uygulamaları istatistiksel olarak anlamlı derecede DNA kırıkları oluşturmalarına rağmen, tek başına RSV uygulamasında oldukça düşük miktarda bir hasar saptanmıştır. Yapılan kombine uygulama U-87 MG hücrelerinde kontrol grubuna göre kırık miktarını yaklaşık %40 oranında arttırmış (Şekil 4.25), HEK 293 hücrelerinde ise yaklaşık %60 oranında yükseltmiştir (Şekil

4.26). Bu değişimler istatistik açıdan anlamlı bir farklılık ortaya koymaktadır. U-87 MG, Gli36 ve DBTRG hücrelerinde TMZ'nin DNA hasarına sebep olduğu gösterilmiştir (Castro ve diğ., 2015). Ayrıca U-87 MG üzerinde yapılan bir çalışmada, RSV'nin iyododeoksiüridin ve radyasyonun oluşturduğu DNA hasarını arttırdığı bildirilmiştir (Firouzi ve diğ., 2015). HEK 293 hücresinde ise RSV'nin, okratoksin A adlı bir mikotoksin ile beraber kullanımında, oluşan DNA kırığı azalttığı gözlenmiştir (Raghubeer ve diğ., 2015). Bu çalışmalar ile bulgularımız karşılaştırıldığında uyumlu oldukları görölmektedir.

Hücrelerdeki protein hasar miktarını belirlemede bir ölçüt olan protein karbonil seviyelerinin belirlenmesine dayanan analiz sonuçlarına bakıldığında, kombine uygulamanın U-87 MG hücrelerinde protein karbonilini anlamlı bir şekilde arttırdığı (Şekil 4.27), HEK 293 hücrelerinde de arttırdığı ancak bu değişimin anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.28).

Temozolomide karşı hücrenin ortaya koyduğu dirençle ilişkili olduğu düşünölen stres proteinlerinin, normal hücrenin aksine malignant hücrede inhibisyonu, önem arz etmektedir. Bu bağlamda tez kapsamında gerçekleştirilen her bir değerlendirme, bu etkinin mekanizmasını ortaya çıkarmaya yardımcı olmaktadır. Hücrenin apoptoza gitmesi, hücre içinde ROT'ların artışı, DNA kırıklarının oluşumu, hücre içinde protein hasarını gösteren protein karbonillerinin artışı ve tüm bu değişimlerin ajan/maddenin tek başına kullanımından daha etkin bir şekilde kombine uygulama sayesinde gerçekleştiğini gösteren bulgular, birbirini ve hipotezimizi desteklemektedir. Bunun yanı sıra, normal hücrede bu kombine uygulamanın daha az toksik etki göstererek sağlıklı hücreye zarar vermemesi ve apoptoza gitmesini engellemesi, kombine terapinin sadece malignant hücreyi hedef alması sebebiyle umut vericidir.

Sonuç olarak, bu çalışmada antioksidan özellik gösteren RSV'nin TMZ ile kombine şekilde uygulanmasının, TMZ'nin kanser hücrelerindeki tedavi etkinliğini arttırdığı ve normal hücrelerdeki olumsuz etkilerini azalttığını gösteren anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Resveratrol, glioblastoma hücrelerindeki TMZ terapötik yanıtını arttırmakta ve tedavi için yeni yaklaşımlar denenmesi adına araştırmacılara farklı pencereler açmaktadır. Hücresel düzeyde kanser terapisine katkıları olan resveratrolün, klinik çalışmalar ile desteklenmesi durumunda gelecekte öneminin daha da artacağı düşünülmektedir. Özellikle beyin tümöründe ilaçla beraber resveratrol kullanımı, hastaya sağlayabileceği sağkalım avantajı göz önüne alındığında, klinik açıdan resveratrolün gelecek vadeden bir ajan haline gelmesine yardımcı olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Allen, M., Bjerke, M., Edlund, H., Nelander, S., Westermarck, B., 2016, Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news, *Science Translational Medicine*, 8 (354), 1-4.
- Arda, N., Önay Uçar, E., Ertan, H., 2018, *Tek boyutlu protein elektroforezi ve protein saptama yöntemleri*, Temel ve ileri moleküler biyoloji yöntemleri, In: Temizkan, G., Arda, N. (ed.), Bölüm 28, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, Türkiye, ISBN: 978-605-335-362-1, 523-570.
- Auffinger, B., Spencer, D., Pytel, P., Ahmed, A.U., Lesniak, M.S., 2015, The role of glioma stem cells in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence, *Expert Review Neurotherapeutics*, 15 (7), 741-752.
- Bądziul, D., Jakubowicz-Gil, J., Paduch, R., Głowniak, K., Gawron, A., 2014, Combined treatment with quercetin and imperatorin as a potent strategy for killing HeLa and Hep-2 cells, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 392, 213-227.
- Banerjee Mustafi, S., Chakraborty, P.K., Raha, S., 2010, Modulation of Akt and ERK1/2 pathways by resveratrol in chronic myelogenous leukemia (CML) cells results in the downregulation of Hsp70, *PLoS One*, 5, e8719.
- Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K., Mosser, D.D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Tailor, P., Morimoto, R.I., Cohen, G.M., Green, D.R., 2000, Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome, *Nature Cell Biology*, 2 (8), 469-475.
- Belda-Iniesta, C., Carpeño, Jde, C., Saenz, E.C., Gutiérrez M., Perona, R., Barón, M.G., 2006, Long term responses with cetuximab therapy in glioblastoma multiforme. *Cancer Biology & Therapy*, 5 (8), 912-914.
- Bellaver, B., Souza, D.G., Souza, D.O., Quincozes-Santos, A., 2014, Resveratrol increases antioxidant defenses and decreases proinflammatory cytokines in hippocampal astrocyte cultures from newborn, adult and aged Wistar rats, *Toxicology in Vitro*, 28, 479-484.
- Belot, N., Rorive, S., Doyen, I., Lefranc, F., Bruyneel, E., Dedeker, R., Micik, S., Brotchi, J., Decaestecker, C., Salmon, I., Kiss, R., Camby, I., 2001, Molecular Characterization of cell substratum attachments in human glial tumors relates to prognostic features, *Glia*, 36, 375-390.
- Belzile, J.P., Choudhury, S.A., Cournoyer, D., Chow, T.Y.K., 2006, Targeting DNA repair proteins: a promising avenue for cancer gene therapy, *Current Gene Therapy*, 6 (1), 111-123.
- Benjamin, I.J., McMillan, D.R., 1998, Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease, *Circulation Research*, 83, 117-132.

- Beutler, E., 1975, *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*, 2nd ed., Grune & Stratton, New York, ISBN: 978-0808908616.
- Bloch, O., Crane, C.A., Fuks, Y., Kaur, R., Aghi, M.K., Berger, M.S., Butowski, N.A., Chang, S.M., Clarke, J.L., McDermott, M.W., Prados, M.D., Sloan A.E., Bruce, J.N., Parsa, A.T., 2014, Heat-shock protein peptide complex-96 vaccination for recurrent glioblastoma: a phase II, single-arm trial, *Neuro-Oncology*, 16 (2), 274-279.
- Brennan, C.W, Verhaak, R.G., McKenna, A., Campos, B., Nounshmehr, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z. Berman, S.H., Beroukhir, R., Bernard, B., Wu, C.J., Genovese, G., Shmulevich, I., Barnholtz-Sloan, J., Zou, L., Vegesna, R., Shukla, S.A., Ciriello, G., Yung, W.K., Zhang, W., Sougnez, C., Mikkelsen, T., Aldape, K., Bigner, D.D., Van Meir, E.G., Prados, M., Sloan, A., Black, K.L., Eschbacher, J., Finocchiaro, G., Friedman, W., Andrews, D.W., Guha, A., Iacocca, M., O'Neill, B.P., Foltz, G., Myers, J., Weisenberger, D.J., Penny R., Kucherlapati, R., Perou, C.M., Hayes, D.N., Gibbs, R., Marra, M., Mills, G.B., Lander, E., Spellman, P., Wilson, R., Sander, C., Weinstein, J., Meyerson, M., Gabriel, S., Laird, P.W., Haussler, D., Getz, G., Chin, L.; TCGA Research Network, 2013, The somatic genomic landscape of glioblastoma, *Cell*, 155 (2), 462-477.
- Brower, V., 2011, Early-stage progress on glioma vaccines, *Journal of the National Cancer Institute*, 103 (18), 1361-1362.
- Browne, R.W., Armstrong, D., 1998, Reduced glutathione and glutathione disulfide, *Methods in Molecular Biology*, 108:347-352.
- Burger., P, Vogel., F, Green, S, Strike, T., 1985, Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma pathologic criteria and prognostic implications, *Cancer*, 56, 1106-1111.
- Calvert, P., Yao, K.S., Hamilton, T.C., O'Dwyer, P.J., 1998, Clinical studies of reversal of drug resistance based on glutathione, *Chemico-Biological Interactions*, 111-112:213–224.
- Castro, G.N., Cayado-Gutiérrez, N., Moncalero, V.L., Lima, P., De Angeli, s R.L., Chávez, V., Cuello-Carrión, F.D., Ciocca, D.R., 2012, Hsp27 (HSPB1): a possible surrogate molecular marker for loss of heterozygosity (LOH) of chromosome 1p in oligodendrogliomas but not in astrocytomas, *Cell Stress Chaperones*, 17, 779-790.
- Castro, N.C., Cayado-Gutierrez, N., Zoppino, F.C.M., Fanelli, M.A., Cuello-Carrion, F.D., Sotile M., Nadin, S.B., Ciocca, D.R., 2015, Effects of temozolomide (TMZ) on the expression and interaction of heat shock proteins (HSPs) and DNA repair proteins in human malignant glioma cells, *Cell Stress Chaperones*, 20 (2), 253-265.
- Chatterjee N., Walker, G.C., 2017, Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58 (5), 235-263.
- Chauhan, D., Li, G., Auclair, D., Hideshirna, T., Podar, K., Mitsiades, N., Mitsiades, C., Chen, B., Munshi, N., Saxena, S., Anderson, K.C., 2004, 2-Methoxyestadiol and bortezomib/proteasome-inhibitor overcome dexamethasone-resistance in multiple myeloma cells by modulating Heat Shock Protein-27, *Apoptosis*, 9, 149-155.

- Chen, L., Li, X., Liu, L., Yu, B., Xue, Y., Liu, Y., 2015, Erastin sensitizes glioblastoma cells to temozolomide by restraining xCT and cystathionine- γ -lyase function, *Oncology Reports*, 33, 1465-1474.
- Chorny, J.A., Evans, L.C., Kleinschmidt - DeMasters, B.K., 2000, Cerebral granular cell astrocytomas: a Mib-1, bcl-2, and telomerase study, *Clinical Neuropathology*, 19 (4), 170-179.
- Ciocca, D.R., Calderwood, S.K., 2005, Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications, *Cell Stress Chaperones*, 10 (2), 86-103.
- Cucciolla, V., Borriello, A., Oliva, A., Galletti, P., Zappia, V., Ragione, F.D., 2007, Resveratrol: from basic science to the clinic, *Cell Cycle*, 6, 2495-2510.
- Curtin, N. J., 2012, DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target, *Nature Reviews Cancer*, 12, 801-817.
- Dai, C., Dai, S., Cao, J., 2012, Proteotoxic stress of cancer: implication of the heat-shock response in oncogenesis, *Journal of Cellular Physiology*, 227 (8), 2982-2987.
- Datta, K., Rahalkar, K., Dinesh, D.K., 2017, Heat Shock Proteins (Hsp): Classifications and Its Involvement in Health and Disease, *Journal of Pharmaceutical Care & Health Systems*, 4, 175.
- Davies, M.J., 2016, Protein oxidation and peroxidation, *Biochemical journal*, 473, 805-825.
- de Almeida, L.M., Piñeiro, C.C., Leite, M.C., Brolese, G., Tramontina, F., Feoli, A.M., Gottfried, C., Gonçalves, C.A., 2007, Resveratrol increases glutamate uptake, glutathione content, and S100B secretion in cortical astrocyte cultures, *Cellular and Molecular Neurobiology*, 27 (5), 661-668.
- Deponte, M., 2013, Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 3216-3266.
- Dolecek, T.A., Propp, J.M., Stroup, N.E., Kruchko, C., 2012, CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro-Oncology*, 14 (5), 1-49.
- Dundas, S. R., Lawrie, L. C., Rooney, P. H., Murray, G.I., 2005, Mortalin is over-expressed by colorectal adenocarcinomas and correlates with poor survival, *The Journal of Pathology*, 205, 74–81.
- Eid, S.Y., El-Readi, M.Z., Wink, M., 2012, Carotenoids reverse multidrug resistance in cancer cells by interfering with ABC-transporters, *Phytomedicine*, 19, 977-987.
- Ekstrand, A.J., Sugawa, N., James, C.D., Collins, V.P., 1992, Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the Nand/or C-terminal tails, *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 89 (10), 4309-4313.

- Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S.N., Hidalgo, O.F., Vanaclocha, V., Baylin S.B., Herman, J.G., 2000, Inactivation of the DNA repair gene MGMT and the clinical response of gliomas, *The New England Journal of Medicine*, 343 (19), 1350-1354.
- Estrela, J.M., Ortega, A., Obrador, E., 2006, Glutathione in cancer biology and therapy, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 43, 143-181.
- Feng, J.T., Liu, Y.K., Song, H.Y., Dai, Z., Qin, L.X., Almofti, M.R., Fang, C.Y., Lu, H.J., Yang, P.Y., Tang, Z.Y., 2005, Heat-shock protein 27: A potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome analysis, *Proteomics*, 5, 4581-4588.
- Ferreira, J., Ramosa, A.A., Almeida, T., Azquetad, A., Rochaa, E., 2018, Drug resistance in glioblastoma and cytotoxicity of seaweed compounds, alone and in combination with anticancer drugs: A mini review, *Phytomedicine*, 48, 84-93.
- Ferretti, M., Fabbiano, C., Bari, M.D., Conte, C., Castigli, E., Sciacaluga, M., Ponti, D., Ruggieri, P., Raco, A., Ricordy, R., Calogero, A., Tata, A.M., 2013, M2 receptor activation inhibits cell cycle progression and survival in human glioblastoma cells, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17 (4), 552-566.
- Figueroa-González ve Pérez-Plasencia, 2017, Strategies for the evaluation of DNA damage and repair mechanisms in cancer, *Oncology Letters*, 13 (6), 3982-3988.
- Filippi-Chiela, E.C., Thomé, M.P., Bueno e Silva, M.M., Pelegrini A.L., Ledur, P.F., Garicochea, B., Zamin, L.L., Lenz, G., 2013, Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells, *BMC Cancer*, 13, 147.
- Firouzi, F., Khoei, S., Mirzaei, H.R., 2015, Role of resveratrol on the cytotoxic effects and DNA damages of iododeoxyuridine and megavoltage radiation in spheroid culture of U87MG glioblastoma cell line, *General Physiology and Biophysics*, 34, 43-50.
- Fogh, J., Wright, W.C., Loveless, J.D., 1977, Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors, *Journal of National Cancer Institute*, 58, 209-214.
- Freeman, M.L., Meredith, M.J., Laszlo, A., 1988, Depletion of glutathione, heat shock protein synthesis, and the development of thermotolerance in Chinese hamster ovary cells, *Cancer Research*, 48, 7033-7037.
- Freeman, M.L., Sierra-Rivera, E., Voorhees, G.J., Eisert, D.R., Meredith, M.J., 1993, Synthesis of hsp-70 is enhanced in glutathione-depleted Hep G2 cells, *Radiation Research*, 135 (3), 387-393.
- Fremont, L., 2000, Biological effects of resveratrol, *Life Sciences*, 66 (8), 663-673.
- Freshney, R.I., 2000, *Culture of animal cells: a manual of basic technique*, 4th ed., Wiley-Liss Press, New York, 978-0471348894.

- Friedman, H. S., Kerby, T., Calvert, H., 2000, Temozolomide and treatment of malignant glioma, *Clinical Cancer Research*, 6, 2585-2597.
- Friedman, H.S., Prados, M.D., Wen, P.Y., et al. 2009, Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma, *Journal of Clinical Oncology*, 27 (28), 4733-4740.
- Fujiki, H., Suganuma, M., 2012. Green tea: an effective synergist with anticancer drugs for tertiary cancer prevention, *Cancer Letters*, 324, 119-125.
- Gagliano, N., Moscheni, C., Torri, C., Magnani, I., Bertelli, A.A., Gioia, M., 2005, Effect of resveratrol on matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) on human cultured glioblastoma cells, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 59, 359-364.
- Gehrmann, M., Stangl, S., Foulds, G.A., Oellinger, R., Breuninger, S., Rad, R., Pockley, A.G., Multhoff, G., 2014) Tumor imaging and targeting potential of an Hsp70-derived 14-mer peptide, *PLoS One*, 9 (8), e105344.
- Gerszon, J., Rodacka, A., Puchala, M., 2014, Antioxidant properties of resveratrol and its protective effects in neurodegenerative diseases, *Advances in Cell Biology*, 4 (2), 97-117.
- Ghosh, D., Nandi, S., Bhattacharjee, S., 2018, Combination therapy to checkmate Glioblastoma: clinical challenges and advances, *Clinical and Translational Medicine*, 7, 33.
- Graner, M.W., Bigner, D.D., 2005, Chaperone proteins and brain tumors: potential targets and possible therapeutics, *Neuro-Oncology*, 7, 260-278.
- Graner, M.W., Cumming, R.I., Bigner, D.D., 2007, The heat shock response and chaperones/heat shock proteins in brain tumors: surface expression, release, and possible immune consequences, *The Journal of Neuroscience*, 27 (42), 11214-11227.
- Gupta, S.C., Sung, B., Prasad, S., Webb, L.J., Aggarwal, B.B., 2013, Cancer drug discovery by repurposing: teaching new tricks to old dogs, *Trends in Pharmacological Sciences*, 34 (9), 508-517.
- Günther, W., Pawlak, E., Damasceno, R., Arnold, H., Terzis, A., 2003, Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids, *British Journal of Cancer*, 88 (3), 463-469.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2003, *Free radicals in biology and medicine*, 3rd ed., Oxford University Press.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000, The hallmarks of cancer, *Cell*, 100 (1), 57- 70.
- Harikumar, K.B., Kunnumakkara, A.B., Sethi, G., Diagaradjane, P., Anand, P., Pandey, M.K., Gelovani, J., Krishnan, S., Guha, S., Aggarwal, B.B., 2010, Resveratrol, a multitargeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine in vitro and in

- orthotopic mouse model of human pancreatic cancer, *International Journal of Cancer*, 127, 257-268.
- Haslbeck, M., Weinkauff, S., Buchner, J., 2019, Small heat shock proteins: Simplicity meets complexity, *The Journal of Biochemistry*, 294 (6), 2121-2132.
- Hechtman, J.F., Abou-Alfa, G.K., Stadler, Z.K., Mandelker, D.L., Roehrl, M.H.A., Zehir, A., Vakiani, E., Middha, S., Klimstra, D.S., 2019, Somatic HNF1A mutations in the malignant transformation of hepatocellular adenomas: a retrospective analysis of data from MSK-IMPACT and TCGA, *Human Pathology*, 83, 1-6.
- Hegi, M.E., Diserens, A.C., Gorlia, T., Hamou, M.F., de Triboletti N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J.E.C., Hau, P., 2005, MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma, *The New England Journal of Medicine*, 352 (10), 997-1003.
- Heinrich, J.C., Donakonda, S., Haupt, V.J., Lennig, P., Zhang, Y., Schroder, M., 2016, New HSP27 inhibitors efficiently suppress drug resistance development in cancer cells, *Oncotarget*, 7 (42), 68156-68169.
- Huang, H., Lin, H., Zhang, X., Li, J., 2012, Resveratrol reverses temozolomide resistance by downregulation of MGMT in T98G glioblastoma cells by the NF- κ B-dependent pathway, *Oncology Reports*, 27 (6), 2050-2056.
- Hyun, K.H., Yoon, C.H., Kim, R.K., Lim, E.J., An, S., Park, M.J., Hyun, J.W., Suh, Y., Kim, M.J., Lee, S.J., 2011, Eckol suppresses maintenance of stemness and malignancies in glioma stem-like cells, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254:32-40.
- Iorns, E., Lord, C.J., Turner, N., Ashworth, A., 2007, Utilizing RNA interference to enhance cancer drug discovery, *Nature*, 6, 556–568.
- Jakubowicz-Gil, J., Langner, E., Badziul, D., Wertel, I., Rzeski, W., 2013, Apoptosis induction in human glioblastoma multiforme T98G cells upon temozolomide and quercetin treatment, *Tumour Biology*, 34, 2367-2378.
- Jakubowicz-Gil, J., Langner, E., Wertel, I., Piersiak, T., Rzeski, W., 2010, Temozolomide, quercetin and cell death in the MOGGCCM astrocytoma cell line, *Chemico-Biological Interactions*, 188, 190-203.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M., 1997, Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes, *Science*, 275:218–220.
- Jiang, H., Zhang, L., Kuo, J., Kuo, K., Gautam, S.C., Groc, L. ve diğ., 2005, Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells, *Molecular Cancer Therapeutics*, 4 (4), 554-561.
- Kamada, M., So, A., Muramaki, M., Rocchi, P., Beraldi, E., Gleave, M., 2007, Hsp27 knockdown using nucleotide-based therapies inhibit tumor growth and enhance

- chemotherapy in human bladder cancer cells, *Molecular Cancer Therapeutics*, 6, 299-308.
- Kang, S.H., Kang, K.W., Kim, K.H., Kwon, B., Kim, S.K., Lee, H.Y., Kong, S.Y., Lee, E.S., Jang, S.G., Yoo, B.C., 2008, Upregulated HSP27 in human breast cancer cells reduces Herceptin susceptibility by increasing Her2 protein stability, *BMC Cancer*, 8, 286.
- Kato, T.A., Tsuda, A., Uesaka, M., Fujimori, A., Kamada, T., Tsujii, H., Okayasu, R., 2011, In vitro characterization of cells derived from chordoma cell line U-CH1 following treatment with X-rays, heavy ions and chemotherapeutic drugs, *Radiation Oncology*, 6, 116.
- Kita, D., Yonekawa, Y., Weller, M., Ohgaki, H., 2007, PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas, *Acta Neuropathologica*, 113 (3), 295-302.
- Knaufl, F.M., Arreola-Ornelas, H., Mendez, O., Alsan, M., Seinfeld, J., Marx, A., Atun, R., 2014, *The global economic burden of cancer*, World cancer report 2014, In: Stewart, B.W., Wild, C.P. (ed.), Bölüm 6.7, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, ISBN: 978-92-832-0432-9, 576-583.
- Kregel, K.C., 2002, Molecular biology of thermoregulation invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance, *Journal of Applied Physiology*, 92, 2177-2186.
- Krex, D., Klink, B., Hartmann, C., Von Deimling, A., Pietsch, T., Simon, M., Sabel, M., Steinbach, J. P., Heese, O., Reifenberger, G., Weller, M., Schackert, G., German Glioma Network, 2007, Long-term survival with glioblastoma multiforme, *Brain*, 130 (10), 2596-2606.
- Kubota, T., Uemura, Y., Kobayashi, M., Tahuchi, H., 2003, Combined effects of resveratrol and paclitaxel on lung cancer cells, *Anticancer Research*, 23, 4039-4046.
- Kuramitsu, Y., Wang, Y., Taba, K., Suenaga, S., Ryozaawa, S., Kaino, S., Sakaida, I., Nakamura, K., 2012, Heat-shock protein 27 plays the key role in gemcitabine-resistance of pancreatic cancer cells, *Anticancer Research*, 32, 2295-2299.
- Kweon, S.H., Song, J.H., Kim, T.S., 2010, Resveratrol-mediated reversal of doxorubicin resistance in acute myeloid leukemia cells via downregulation of MRP1 expression, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 395, 104-110.
- Lan, F., Yang, Y., Han, J., Wu, Q., Yu, H., Yue, X., 2015, Sulforaphane reverses chemoresistance to temozolomide in glioblastoma cells by NF- κ B-dependent pathway downregulating MGMT expression, *International Journal of Oncology*, 48, 559-568.
- Langcake, P., Pryce, R.J., 1976, The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury, *Physiological Plant Pathology*, 9, 77-86.

- Lanneau, D., Brunet, M., Frisan, E., Solary, E., Fontenay, M., Garrido, C., 2008, Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12 (3), 743-761.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E., 1994, Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins, *Methods in Enzymology*, 233, 346-357.
- Li, H., Lei, B., Xiang, W., Wang, H., Feng, W., Liu, Y., Qi, S., 2017, Differences in Protein Expression between the U251 and U87 Cell Lines, *Turkish Neurosurgery*, 27 (6), 894-903.
- Lin, C.J., Lee, C.C., Shih, Y.L., Lin, T.Y., Wang, S.H., Lin, Y.F., Shih, C.M., 2012, Resveratrol enhances the therapeutic effect of temozolomide against malignant glioma in vitro and in vivo by inhibiting autophagy, *Free Radical Biology & Medicine*, 52, 377-391.
- Linton, S., Davies, M.J., Dean, R.T., 2001, Protein oxidation and ageing, *Experimental Gerontology*, 36 (9), 1503-1518.
- Louis, D., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., 2007, The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, *Acta Neuropathologica*, 114, 97-109.
- Louis, D.N., Holland E.C., Cairncross J.G., 2001, Glioma classification: A molecular reappraisal, *The American Journal of Pathology*, 159, 779-786.
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., Ellison, D.W., 2016, The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary, *Acta Neuropathologica*, 131 (6), 803-820.
- McFaline-Figueroa, J.R., Lee E.Q., 2018, Brain Tumors, *The American Journal of Medicine*, 131 (8), 874-882.
- Moat, A.G., 1979, *Microbial physiology*, John Wiley and Sons, New York, ISBN: 0-471-07258-3.
- Morimoto, R.I., 1998, Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators, *Genes & Development*, 12, 3788-3796.
- Mosmann, T., 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay, *Journal of Immunological Methods*, 65 (1-2), 55-63.
- Murakami, N., Kühnel, A., Schmid, T.E., Ilicic, K., Stangl, S., Braun, I.S., Gehrmann, M., Molls, M., Itami, J., Multhoff, G., 2015, Role of membrane Hsp70 in radiation sensitivity of tumor cells, *Radiation Oncology*, 10, 149.
- Mutter, N., Stupp, R., 2006, Temozolomide: a milestone in neuro-oncology and beyond?, *Expert Review of Anticancer Therapy*, 6 (8), 1187-1204.

- Narayanan, B.A., Narayanan, N.K., Stoner, G.D., Bullock, B.P., 2002, Interactive gene expression pattern in prostate cancer cells exposed to phenolic antioxidants, *Life Sciences*, 70, 1821-1839.
- National Cancer Institute, *Drugs approved for brain tumors*, <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/brain>, [Ziyaret Tarihi: 25 Mayıs 2019].
- Newlands, E.S., Stevens, M.F., Wedge, S.R., Wheelhouse, R.T., Brock, C., 1997, Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials, *Cancer Treatment Reviews*, 23 (1), 35-61.
- Nylandsted, J., Brand, K., Jaattela, M., 2000, Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 926, 122-125.
- Ohgaki, H., Kleihues, P., 2013, The definition of primary and secondary glioblastoma, *Clinical Cancer Research*, 19 (4), 764-772.
- Olive, P., Banáth, J.P., 2006, The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells, *Nature Protocols*, 1:23-29.
- Omuro, A.M.P., Faivre, S., Raymond, E., 2007, Lessons learned in the development of targeted therapy for malignant gliomas, *Molecular Cancer Therapeutics*, 6 (7), 1909-1919.
- Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J.S., 2015, CBTRUS Statistical Report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012, *Neuro-Oncology*, 17 (suppl 4), iv1-iv62.
- Önay Uçar, E. Heat shock proteins and cancer: Plant based therapy. Heat shock protein-based therapies, In: Asea A., Almasoud, N.N., Krishnan, S., Kaur, P. (ed.), Springer, Cham, 2015, 9, 27-48.
- Önay Uçar, E., Arda, N., Aitken, A., 2012, An extract from mistletoe, *Viscum album* L. reduces Hsp27 and 14-3-3 proteins expression and induces apoptosis in C6 rat glioma cells, *Genetics and Molecular Research*, 11, 2801-2813.
- Önay Uçar, E., Şengelen, A., 2019, Resveratrol and siRNA in combination reduces Hsp27 expression and induces caspase-3 activity in human glioblastoma cells, *Cell Stress Chaperones*, 1-13.
- Önay Uçar, E., Şengelen, A., Mertoğlu, E., Pekmez, M., Arda, E.Ş.N., 2018, *Suppression of HSP70 expression by quercetin and its therapeutic potential against cancer*, HSP70 in Human Diseases and Disorders, In: Asea, A., Kaur, P. (ed.), Springer, Cham, 361-379.
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I., 2011, Anti-oxidative action of resveratrol: Implications for human health, *Arabian Journal of Chemistry*, 4, 293-298.
- Paolini, A., Pasi, F., Facoetti, A., Mazzini, G., Corbella, F., Di Liberto, R., Nano, R., 2011, Cell death forms and HSP70 expression in U87 cells after ionizing radiation and/or chemotherapy, *Anticancer Research*, 31, 3727-3731.

- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.M., Gallia, G.L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B.A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D.A., Tekleab, H., Diaz, L.A., Hartigan, J., Smith, D.R., Strausberg, R.L., Marie, S.K., Shinjo, S.M., Yan, H., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W., 2008, An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme, *Science*, 321 (5897), 1807-1812.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, A.F., 2003, The changing faces of glutathione, a cellular protagonist, *Biochemical Pharmacology*, 66, 1499-1503.
- Pontén, J., Macintyre, E. H., 1968, Long term culture of normal and neoplastic human glia, *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 74, 465-486.
- Powers, M.V., Clarke, P.A., Workman, P., 2009, Death by chaperone: HSP90, HSP70 or both?, *Cell Cycle*, 8, 518-526.
- Premkumar, D., Arnold, B., Pollack, I.F., 2006, Cooperative inhibitory effect of ZD1839 (Iressa) in combination with 17-AAG on glioma cell growth, *Molecular Carcinogenesis*, 45, 288-301.
- Price, R.L., Chiocca, E. A., 2014, Evolution of malignant glioma treatment: From chemotherapy to vaccines to viruses, *Neurosurgery*, 61, 74-83.
- Price, R.L., Song, J., Bingmer, K., Kim, T.H., Yi, J.Y., Nowicki, M.O., Mo, X., Hollon, T., Murnan, E., Alvarez-Brackenridge, C., Fernandez, S., Kaur, B., Rivera, A., Oglesbee, M., Cook, C., Chiocca, E.A., Kwon, C.H., 2013, Cytomegalovirus contributes to glioblastoma in the context of tumor suppressor mutations, *Cancer Research*, 73 (11), 3441-3450.
- Purdel, N.C., Margina, D., Ilie, M., 2014, Current methods used in the protein carbonyl assay, *Annual research & review in biology*, 4 (12), 2015-2026.
- Quan, F., Pan, C., Ma, Q., Zhang, S., Yan, L., 2008, Reversal effect of resveratrol on multidrug resistance in KBv200 cell line, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62, 622-699.
- Raghubeer, S., Nagiah, S., Phulukdaree, A., Chuturgoon, A., 2015, The phytoalexin resveratrol ameliorates ochratoxin a toxicity in human embryonic kidney (HEK293) cells, *Journal of Cellular Biochemistry*, 116, 2947-2955.
- Rao, S.K., Edwards, J., Joshi, A.D., Siu, I.M., Riggins, G.J., 2010, A survey of glioblastoma genomic amplifications and deletions, *Journal of Neuro-Oncology*, 96 (2), 169-179.
- Rérole, A.L., Jegou, G., Garrido, C., 2011, Hsp70: anti-apoptotic and tumorigenic protein, *Molecular Chaperones*, 787, 205-230.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi M.M., Aggarwal, B.B., 2010, Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?, *Free Radical Biology & Medicine*, 49 (11), 1603-1616.

- Riemenschneider, M.J., Hegi, M.E., Reifenberger, G., 2010, MGMT promoter methylation in malignant gliomas, *Targeted Oncology*, 5 (3), 161-165.
- Safa, A.R., Saadatzaheh, M.R., Cohen-Gadol, A.A., Pollok, K.E., Bijangi-Vishehsaraei, K., 2015, Glioblastoma stem cells (GSCs) epigenetic plasticity and interconversion between differentiated non-GSCs and GSCs, *Genes & Diseases*, 2, 152-163.
- Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J. M., Venkatachalam, M.A., 1999, Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease, *The American Journal of Medicine*, 107, 489-506.
- Sanai, N., Polley, M.Y., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Berger, M.S., 2011, An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas, *Journal of Neurosurgery*, 115 (1), 3-8.
- Sang, D., Li, R., Lan, Q., 2014, Quercetin sensitizes human glioblastoma cells to temozolomide *in vitro* via inhibition of Hsp27, *Acta Pharmacologica Sinica*, 35, 832-838.
- Sanson, M., Marie, Y., Paris, S., Idhah, A., Laffaire, J., Ducray, F., El Hallani, S., Boisselier, B., Mokhtari, K., Hoang-Xuan, K., Delattre, J.Y., 2009, Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas, *Journal of Clinical Oncology*, 27 (25), 4150-4154.
- Schilling, D., Kuhnel, A., Konrad, S., Tetzlaff, F., Bayer, C., Yaglom, J., Multhoff, G., 2015, Sensitizing tumor cells to radiation by targeting the heat shock response, *Cancer Letters*, 360 (2), 294-301.
- Schulte-Hermann, R., Timmermann-Trosiener, I., Barthel, G., Bursch, W., 1990, DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion, *Cancer Research*, 50 (16), 5127-5135.
- Schultz, C.R., Golembieski, W.A., King, D.A., Brown, S.L., Brodie, C., Rempel, S.A., 2012, Inhibition of HSP27 alone or in combination with pAKT inhibition as therapeutic approaches to target SPARC-induced glioma cell survival, *Molecular Cancer*, 11, 20.
- Shenouda, G., Souhami, L., Petrecca, K., Owen, S., Panet-Raymond, V., Guiot, M.C., Corredor, A.G., Abdulkarim B, 2016, A Phase II trial of neo-adjuvant temozolomide followed by hypofractionated accelerated radiotherapy with concurrent and adjuvant temozolomide for patients with glioblastoma, *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 97 (3), 487-494.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2019, Cancer Statistics, 2019, *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 69, 7–34.
- Sies, H., 1991, Oxidative stress: from basic research to clinical application, *The American Journal of Medicine*, 91:31S-38S.
- Snoeckx, L.H., Cornelussen, R.N., Van Nieuwenhoven, F.A., Reneman, R.S., Van Der Vusse, G. J., 2001, Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology, *Physiological Reviews*, 81, 1461-1497.

- Soo, E.T.L., Yip, G.W.C., Lwin, Z.M., Kumar, S.D., Bay, B.H., 2008, Heat shock proteins as novel therapeutic targets in cancer, *In Vivo*, 22 (3), 311-315.
- Söderberg-Nauclér, C., Rahbar, A., Stragliotto, G., 2013, Survival in patients with glioblastoma receiving valganciclovir, *The New England Journal of Medicine*, 369 (10), 985-986.
- Squatrino, M., Holland, E.C., 2011, DNA damage response and growth factor signaling pathways in gliomagenesis and therapeutic resistance, *Cancer Research*, 71 (18), 5945-5949.
- Stupp, R., Hegi, M.E., Gilbert, M.R., Chakravarti, A., 2007, Chemoradiotherapy in malignant glioma: Standard of care and future directions, *Journal of Clinical Oncology*, 25 (26), 4127-4136.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, 2005, Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *The New England Journal of Medicine*, 352 (10), 987-996.
- Şengelen, A., Önay Uçar, E., 2018, Rosmarinic acid and siRNA combined therapy represses Hsp27 (HSPB1) expression and induces apoptosis in human glioma cells, *Cell Stress Chaperones*, 23 (5), 885-896.
- Takano, S., Wadhwa, R., Yoshii, Y., Nose, T., Kaul, S.C., Mitsui, Y., 1997, Elevated levels of mortalin expression in human brain tumors, *Experimental Cell Research*, 237, 38-45.
- TCGA Network, 2008, Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways, *Nature*, 455 (7216), 1061-1068.
- Thaker, N.G., Pollack, I.F., 2009, Molecularly targeted therapies for malignant glioma: rationale for combinatorial strategies, *Expert Review of Neurotherapeutics*, 9 (12), 1815-1836.
- Torgovnick, A., Schumacher B., 2015, DNA repair mechanisms in cancer development and therapy, *Frontiers in Genetics*, 6:157.
- Traverso, N., Ricciarelli, R., Nitti, M., Marengo, B., Furfaro, A.L., Pronzato, M., A., Marinari, U.M., Domenicotti, C., 2013, Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 972913.
- Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2018, *Türkiye Kanseri İstatistikleri 2015*, https://hsqm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2015.pdf, [Ziyaret tarihi: 30 Mayıs 2019].
- Udono, H., Srivastava, P.K., 1993, Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity, *The Journal of Experimental Medicine*, 178 (4), 1391-1396.

- Uzzaman, M., Keller, G., Germano, I.M., 2007, Enhanced proapoptotic effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand on temozolomide resistant glioma cells, *Journal of Neurosurgery*, 106, 646-651.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39 (1), 44-84.
- Van Eden, W., Bonorino, C., Van Der Zee, R., 2013, The immunology of cellular stress proteins, *Frontiers in Immunology*, 4, 153.
- Van Eyk A.D., 2015, The effect of five artificial sweeteners on Caco-2, HT-29 and HEK-293 cells, *Drug and Chemical Toxicology*, 38 (3), 318-327.
- Vidyasagar, A., Wilson, N.A., Djamali, A., 2012, Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target, *Fibrogenesis Tissue Repair*, 5 (1), 1-7.
- Visconti, R., Grieco, D., 2009, New insights on oxidative stress in cancer, *Current Opinion in Drug Discovery Development*, 12 (2), 240-245.
- Walker, J.M, 2002, SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins, The Protein Protocols Handbook, In: Walker, J.M (ed.), Bölüm 11, Humana Press Inc, USA, ISBN: 0-89603-940-4, 61-68.
- Walker, M.D., Alexander, E., Hunt, W.E., MacCarty, C.S., Mahaley, M.S., Mealey, J., Norrell, H.A., Owens, G., Ransohoff, J., Wilson, C.B., Gehan, E.A., Strike, T.A., 1978, Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial, *Journal of Neurosurgery*, 49 (3), 333-343.
- Walker, M.D., Green, S.B., Byar, D.P., Alexander, E., Batzdorf, U., Brooks, W.H., Hunt, W.E., MacCarty, C.S., Mahaley, M.S., Mealey, J., Owens, G., Ransohoff, J., Robertson, J.T., Sahpiro, W.R., Smith, K.R., Wilson, C.B., Strike, T.A., 1980, Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery, *The New England Journal of Medicine*, 303 (23), 1323-1329.
- Wang, Q., Xu, J., Rottinghaus, G.E., Simonyi, A., Lubahn, D., Sun, G.Y., Sun, A.Y., 2002, Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils, *Brain Research*, 958, 439-447.
- Wang, Y., Jiang, T., 2013, Understanding high grade glioma: molecular mechanism, therapy and comprehensive management, *Cancer Letters*, 331 (2), 139-146.
- Watanabe, K., Tachibana, O., Sata, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H., 1996, Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas, *Brain Pathology*, 6 (3), 217-223.
- Watson, W.H., Cai, J., Jones, D.P., 2000, Diet and apoptosis, *Annual Review of Nutrition*, 20, 485-505.

- Wen, P.Y., Kesari, S., 2008, Malignant gliomas in adults, *The New England Journal of Medicine*, 359 (5), 492-507.
- Wessel, D., Flügge, U.I., 1984, A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids, *Analytical Biochemistry*, 138, 141-143.
- Westphal, M., Hilt, D.C., Bortey, E., Delavault, P., Olivares, R., Warnke, P.C., Whittle, I.R., Jääskeläinen, J., Ram, Z., 2003, A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma, *Neuro-Oncology*, 5 (2), 79-88.
- World Health Organization, 2018, *Cancer*, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, [Ziyaret Tarihi: 30.05.2019].
- Wu, C., 1995, Heat shock transcription factors: structure and regulation, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 11, 441-469.
- Xia, Y., Liu, Y., Wan, J., Wang, M., Rocchi, P., Qu, F., Iovanna, J.L., Peng, L., 2009, Novel triazole ribonucleoside down-regulates heat shock protein 27 and induces potent anticancer activity on drug-resistant pancreatic cancer, *Journal of Medicinal Chemistry*, 52, 6083-6096.
- Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E., Vogelstein, B., Bigner, D.D., 2009, IDH1 and IDH2 mutations in gliomas, *The New England Journal of Medicine*, 360 (8), 765-773.
- Ye, H., Huang, H., Cao, F., Chen, M., Zheng, X., Zhan, R., 2016, HSPB1 enhances SIRT2-mediated G6PD activation and promotes glioma cell proliferation, *PLoS One*, 11 (10), e0164285.
- Yi, X., Luk, J.M., Lee, N.P., Peng, J., Leng, X., Guan, X.Y., Lau, G.K., Beretta, L., Fan, S.T., 2008, Association of mortalin (HSPA9) with liver cancer metastasis and prediction for early tumor recurrence, *Molecular & Cellular Proteomics*, 7, 315-325.
- Yin, H., Zhou, Y., Wen, C., Zhou, C., Zhang, W., X. Hu, Wang L., You, C., Shao, J., 2014, Curcumin sensitizes glioblastoma to temozolomide by simultaneously generating ROS and disrupting AKT/mTOR signaling, *Oncology Reports*, 32 (4), 1610-1616.
- Yuan, Y., Xue, X., Guo, R.B., Sun, X.L., Hu, G., 2012, Resveratrol Enhances the Antitumor Effects of Temozolomide in Glioblastoma via ROS-dependent AMPK-TSC-mTOR Signaling Pathway, *CNS Neurosciences and Therapeutics*, 18, 536-546.
- Zahra, M., Mina, H., Mohsen, K., Maryam, G., 2017, additive effects of resveratrol and resveratrol/quercetin in prevention of hyperglycemia-mediated cell death through downregulation of NADPH oxidase and RAGE expression, *Journal of the Pancreas*, 18 (1), 26-32.

- Zhang, W.L., Tsuneishi, S., Nakamura, H., 2001, Induction of heat shock proteins and its effects on glial differentiation in rat C6 glioblastoma cells, *Kobe Journal of Medical Sciences*, 47 (2), 77-95.
- Zhang, Z., Wu L., Wang, J., Li, G., 2014, Opposing Effects of PI3K/Akt and Smad-Dependent Signaling Pathways in NAG-1-Induced Glioblastoma Cell Apoptosis, *PLoS One*, 9 (4), e96283.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Elif MERTOĞLU
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	19.08.1988
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	elif.mertoglu@istanbul.edu.tr
Web Adresi	http://aves.istanbul.edu.tr/elif.mertoglu/

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Mezuniyet Yılı	23.06.2009

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Adli Tıp Enstitüsü
Anabilim Dalı	Fen Bilimleri Anabilim Dalı
Programı	Fen Bilimleri

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler	
SCI, SSCI, AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayımlanan Makaleler	
Kaçmaz, A., Deniz, N.G., Aydın, S.G., Sayıl, Ç., Öney Uçar, E., Mertoğlu, E. , Arda, N., 2019, Synthesis and antiproliferative evaluation of some 1,4-naphthoquinone derivatives against human cervical cancer cells, <i>Open Chemistry</i> , 17 (1), 337-345.	
Mertoğlu, E. , Filoğlu Tüfek, G., Zorlu, T., Bülbül Ercan, Ö., 2018, Estimation of the Y-chromosomal short tandem repeat (Y-STR) mutation rates in Turkey, <i>Turkish Journal of Biochemistry</i> , 43 (2), 142-150.	
Öney Uçar, E., Erol, Ö., Kandemir, B., Mertoğlu, E. , Karagöz, A., Arda, E.Ş.N., 2012, <i>Viscum album</i> L. Extracts Protects HeLa Cells against Nuclear and Mitochondrial DNA Damage, <i>Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine</i> , 2012, 958740.	

Diğer Dergilerde Yayımlanan Makaleler

Filoğlu Tüfek, G., Altunçul, H., Bülbül Ercan, Ö., **Mertoğlu, E.**, Zorlu, T. , Rayimoğlu, G., Salih, C., 2016, Polymorphism of 17 Y-chromosome STR markers in Türkiye", *Adli Tıp Dergisi*, 30 (3), 213-221.

Hakemli Kongre / Sempozyumların Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar

Kuşoğlu, S., **Mertoğlu, E.**, Yılancıoğlu, K., Önay Uçar, E., Arda, N., Chromatographic separation of peptides-proteins from *Microcystis aeruginosa*, *5th International Conference on Innovation in Science and Technology (ISTCONF)*, 7-9 Aralık 2018, Barselona, İspanya, 6.

Güngör, E., Önay Uçar, E., **Mertoğlu, E.**, An approach to apoptotic effects of *Viscum album* extracts growing on different host trees in Glioma, *1st International Symposium on Graduate Research in Science Focus on Entrepreneurship and Innovation (ISGRS 2018)*, 4-6 Ekim 2018, İstanbul, Türkiye, 74.

Mertoğlu, E., Önay Uçar, E., "Effects on stress proteins of *Viscum album* extracts in C6 glioma cells", *1st International Symposium on Graduate Research in Science Focus on Entrepreneurship and Innovation (ISGRS 2018)*, 4-6 Ekim 2018, İstanbul, Türkiye, 207.

Şengelen, A., **Mertoğlu, E.**, Önay Uçar, E., Rozmarinik Asit ve SiRNA-aracılı susturmanın glioma hücrelerinde Hsp27 anlatımı üzerine etkileri, *2. Ulusal Proteomik Kongresi*, 24-25 Kasım 2017, İstanbul, Türkiye, 16, 39.

Mertoğlu, E., Biltekin, S.N., Önay Uçar, E., *Viscum album* extracts downregulate the expression levels of Hsp27 in brain tumors, *EACR-AACR- SIC Special Conference 2017*, 24-27 Haziran 2017, Floransa, İtalya, 365, 108.

Önay Uçar, E., Pekmez, M., **Mertoğlu, E.**, Dalyan, L., Arda, E.Ş.N., Protective effects of *Sanicula europaea* extracts on nuclear DNA damage, *24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research*, 9-12 Temmuz 2016, Manchester, İngiltere, 61 (1), S37.

Filoğlu Tüfek, G., **Mertoğlu, E.**, Bülbül, Ö., Rayimoğlu, G., Altunçul, H., Determination of Y-STR mutations rates in father-son duos, *World Forensic Festival 2014*, 12-18 Ekim 2014, Seoul, Güney Kore, 06-11, 495.

Kitap ve Kitap Bölümleri

Mertoğlu, E., Şengelen, A., Kıyga, E., Önay Uçar, E., (Baskıda) *Therapeutic drugs and natural products: The effect of suppressing Hsps in brain tumors*, In: Heat Shock Proteins in Neuroscience, Asea A., Kaur P., (ed.), Springer, Cham.

Önay Uçar, E., Şengelen, A., Güngör, E., **Mertoğlu, E.**, Pekmez, M., Arda, N., (Baskıda), *Can Hsp targeted gene therapy be a new hope for gliomas?*, Heat Shock Proteins in Neuroscience, In: Asea, A., Kaur, P., (ed.), Springer, Cham.

Önay Uçar, E., Şengelen, A., **Mertoğlu, E.**, Pekmez, M., Arda, E.Ş.N., 2018, *Suppression of HSP70 expression by quercetin and its therapeutic potential against cancer*, HSP70 in Human Diseases and Disorders, In: Asea, A., Kaur, P. (ed.), Springer, Cham, 361-379.