

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

Emine YAZICI

YÜKSEK LİSANS

2024-ANTALYA

**TEMOZOLOMİD (TMZ) DİRENÇLİ VE NORMAL
GLİOBLASTOMA MULTİFORME (GBM) HÜCRE
HATLARINDA DONAFENİB VE RADYOTERAPİ
UYGULAMASININ HÜCRE SAĞKALIMI AÇISINDAN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Emine YAZICI

YÜKSEK LİSANS

2024-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

TEMOZOLOMİD (TMZ) DİRENÇLİ VE NORMAL
GLİOBLASTOMA MULTİFORME (GBM) HÜCRE
HATLARINDA DONAFENİB VE RADYOTERAPİ
UYGULAMASININ HÜCRE SAĞKALIMI AÇISINDAN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Emine YAZICI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2022-5990 proje numarası ve TÜBİTAK 1002-B Acil Destek Modülü tarafından 122Z788 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2024-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, Tıbbi Biyoteknoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 07/02/2024

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU
Ege Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Melike CENGİZ

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Emine YAZICI

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisansa başlarken bu yolun tüm güzelliklerini ve zorluklarını bana en baştan anlatarak yoluma ışık olan, desteğini ve sevgisini üzerimizden hiçbir zaman esirgemeyen, tüm olumsuzluklara bir çıkış kapısı bulup bizi motive eden danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER'e,

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoteknoloji Yüksek Lisans programı Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet Yılmaz Çoban'a; danışman hocam kadar bana destek olup, tecrübelerini tüm öğrencilerine açarak canı gönülden yardımcı olan Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK'e ve bu bölümde yer alan tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Aylin Fidan ŞAHİN KORCUM ve Dr. Ece ATAĞ'a,

Tüm sorularıma sabırla cevap verip bizi hep daha ilerisi için teşvik eden Orhan KOÇAK'a,

Yüksek lisans sürecimde her an yanımda olan Gizem TUTKUN'a

İyi günde kötü günde birbirimize destek olup yeri geldiğinde ağlayıp yeri geldiğinde güldüğümüz, hem bu yolda en büyük destekçilerim hem de G-Team çalışma arkadaşlarım; Aleyna ŞİŞANECİ, Merzuka KALAY, Sendegül YILDIRIM İLDEM ve Ece OYLUMLU'ya,

Tüm eğitim-öğretim hayatımda yanımda olan sıra arkadaşım Havva Nur KARADEMİR'e,

Beni tüm kalbiyle destekleyerek bu süreçte bana hep daha iyi hissettiren sevgili Semih DEMİR'e,

Dünyaya gözlerimi açtığım ilk andan itibaren bana asıl eğitimi verip bugünlere gelmeme yardımcı olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, tüm başarı ve başarısızlıklarına rağmen bana her zaman yürekten inanan annem Fatma YAZICI, babam İbrahim YAZICI ve kardeşim Orhan YAZICI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Glioblastoma Multiforme (GBM), merkezi sinir sisteminin (MSS) en agresif ve sık görülen malign beyin tümörüdür. Donafenib (DNF), küçük molekülü bir multikinaz inhibitörüdür. Çalışmamız, DNF'nin Raf/MEK/ERK sinyal yolağını kullanabileceği hipotezinden yola çıkarak; radyoterapi (RT) ve Temozolomid (TMZ) uygulamasıyla DNF'nin; tümör hücre sağkalımı ve bu yolak üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi üzerine kurgulanmıştır.

Yöntem: Çalışmamızda kullanılan GBM hücre hatları; TMZ'ye duyarlı U87MG ve dirençli T98G hücre hatları olarak belirlendi. Deney gruplarımız; Kontrol (K), Çözücü (Ç), TMZ, DNF, TMZ+DNF, TMZ+DNF+RT ve kliniği taklit etmek adına RT, TMZ+RT'ye ek olarak DNF+RT gruplarından oluşturuldu. TMZ ve DNF'nin proliferatif etkisini belirleyerek IC₅₀ değerlerini hesaplamak için MTT ile analiz yapıldı. RT uygulaması için hücrelere günlük 2 Gray (Gy) olmak üzere 5 gün boyunca toplam 10Gy ışınlı verildi. Yine aynı gruplarda tümör hücrelerinin hareket potansiyelleri, hücrelerde oluşturulan yara izi deneyi ile migrasyon analizi yapılarak yorumlandı. Ek olarak, deney gruplarında *p*-ERK 1/2 ve Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyon seviyeleri Western Blot analizi ile değerlendirildi.

Bulgular: DNF'nin GBM hücre hatlarında, IC₅₀ değeri çalışmamızla ilk kez belirlendi. DNF ve TMZ'nin bireysel ve kombine uygulamasının tümör hücre proliferasyonunu azalttığı görüldü. Aynı zamanda DNF, TMZ ve eş zamanlı RT uygulaması tümör hücre sağkalımını azalttı. Hücrelerde oluşturulan yara izi ile tümör hücrelerinde hareket potansiyellerinin kısıtlandığı gösterildi. Ayrıca DNF'nin, *p*-ERK 1/2 sinyal yolağını kullanıp kullanmadığı ve tümör hücrelerinin apoptoza gidip gitmediği ilk kez değerlendirildi.

Sonuç: Çalışmamız; klinikte uygulanan tedavilere (TMZ+RT) ek hem bireysel hem de kombine uygulanan ve daha önce hiç GBM hücrelerinde etkinliği değerlendirilmemiş olan DNF'nin, tümör hücrelerinde anti-proliferatif etkinliğinin olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma Multiforme, Temozolomid, Radyoterapi, Donafenib

ABSTRACT

Objective: Glioblastoma Multiforme (GBM) is the most common and aggressive malignant brain tumor of the central nervous system (CNS). Donafenib (DNF) is a small molecule multikinase inhibitor. Based on the hypothesis that DNF may use Raf/MEK/ERK signaling pathway, our study was designed to evaluate the effect of DNF on tumor cell survival and this pathway with radiotherapy (RT) and Temozolomide (TMZ) administration.

Method: The GBM cell lines used in our study were TMZ-sensitive U87MG and TMZ-resistant T98G cell lines. Our experimental groups consisted of Control (C), Vehicle (V), TMZ, DNF, TMZ+DNF, TMZ+DNF+RT and RT, TMZ+RT to mimic the clinical administration and DNF+RT. MTT assay was used to determine the proliferative effect of TMZ and DNF and to calculate IC₅₀ values. For RT application, the cells were irradiated with a total of 10Gy for 5 days, 2Gy each day. In the same groups, the movement potentials of tumor cells were interpreted by migration analysis with the scar created on the cells. In addition, *p*-ERK 1/2 and Cleaved Caspase3 protein expression levels in the experimental groups were also evaluated by Western Blot analysis.

Results: The IC₅₀ value of DNF in GBM cell lines was determined for the first time. Individual and combined application of DNF and TMZ decreased tumor cell proliferation. At the same time, DNF, TMZ and simultaneous RT application decreased tumor cell survival. It was shown that tumor cell movement potential was restricted by the scar created on the cells. In addition, it was evaluated for the first time whether DNF uses *p*-ERK 1/2 signaling pathway and whether tumor cells went to apoptosis.

Conclusion: Our study showed that DNF, which is administered both individually and in combination in addition to clinical treatments and whose efficacy on GBM cells has never been evaluated before, has anti-proliferative effects on tumor cells.

Key words: Glioblastoma Multiforme, Temozolomide, Radiotherapy, Donafenib

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	
SİMGELER ve KISALTMALAR	
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.2. Kanserde Apoptoz Direnci	5
2.3. Beyin Tümörleri	6
2.3.1. Gliomların Derecelendirilmesi ve Sınıflandırılması	6
2.4. Glioblastoma Multiforme (GBM)	8
2.4.1. GBM Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi	11
2.4.2. GBM Patofizyolojisi	12
2.5. GBM Tedavisi	12
2.5.1. GBM Tedavisinde Cerrahi Rezeksiyon	14
2.5.2. GBM Tedavisinde Radyoterapi	14
2.5.3. GBM Tedavisinde Kemoterapi	15
2.6. Temozolomid (TMZ)	17
2.6.1. TMZ Aktivasyon/Etki Mekanizması	17
2.6.2. TMZ'ye Karşı Direnç Oluşumu	18
2.7. DNA Onarımı ve TMZ Direnç Mekanizması	18
2.7.1. Metilguanin-DNA Metiltransferaz (MGMT)	19
2.7.2. Yanlış Eşleşme Onarımı (MMR)	20
2.7.3. Baz Eksizyon Onarımı (BER)	20
2.8. Ras/MAPK/ERK Sinyal Yolağı	21
2.9. Donafenib (DNF)	24

3. GEREÇ ve YÖNTEM	28
3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması	28
3.2. Hücrelerin Deneye Hazır Hale Getirilmesi-Pasajlanması	29
3.3. Hücrelerin Dondurulması	29
3.4. TMZ'nin Hazırlanması ve Deney Gruplarına Uygulanması	30
3.5. DNF'nin Hazırlanması ve Deney Gruplarına Uygulanması	31
3.6. Kültür Tabaklarına Radyasyon Uygulanması	33
3.7. Migrasyon Analizi	35
3.8. Western Blot	36
3.8.1. Hücrelerden Lizat Elde Edilmesi	37
3.8.2. Protein Miktarlarının Belirlenmesi	37
3.8.3. Kullanılan Solüsyonlar	38
3.8.4. Görüntüleme ve Değerlendirme	40
3.9. İstatistiksel Analizler	41
4. BULGULAR	42
4.1. TMZ'nin U87MG Hücrelerine Etkisinin Belirlenmesi	43
4.1.1. TMZ'nin U87MG Hücreleri İçin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi	44
4.2. TMZ'nin T98G Hücrelerine Etkisinin Belirlenmesi	44
4.2.1. TMZ'nin T98G Hücreleri İçin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi	45
4.3. DNF'nin U87MG Hücrelerine Etkisinin Belirlenmesi	46
4.3.1. DNF'nin U87MG Hücreleri İçin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi	47
4.4. DNF'nin T98G Hücrelerindeki Etkisinin Belirlenmesi	48
4.4.1. DNF'nin T98G Hücreleri İçin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi	49
4.5. Radyoterapi ve Kemoterapi Uygulaması	50
4.5.1. U87MG Hücrelerine Uygulanan DNF ve Kemoterapinin Değerlendirilmesi	50
4.5.2. U87MG Hücrelerine Uygulanan DNF, TMZ ve Radyoterapinin Değerlendirilmesi	52
4.5.3. T98G Hücrelerine Uygulanan DNF ve Kemoterapi Değerlendirilmesi	54

4.5.4. T98G Hücrelerine Uygulanan DNF, TMZ ve Radyoterapinin Değerlendirilmesi	55
4.6. Migrasyon Analizinin Değerlendirilmesi	57
4.6.1. U87MG Hücrelerindeki Hareket Potansiyelinin Değerlendirilmesi	57
4.6.2. T98G Hücreleindeki Hareket Potansiyelin Değerlendirilmesi	59
4.7. Western Blot Analizlerinin Değerlendirilmesi	60
4.7.1. <i>p</i> -ERK 1/2 Protein Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi	61
4.7.2. U87MG Hücrelerinde <i>p</i> -ERK 1/2 Proteinin Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi	61
4.7.3. T98G Hücrelerindeki <i>p</i> -ERK 1/2 Protein Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi	62
4.7.4. Aktif Kaspaz-3 Protein Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi	63
4.7.5. U87MG Hücrelerinde Aktif Kaspaz-3 Protein Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi	64
4.7.6. T98G Hücrelerinde Aktif Kaspaz-3 Protein Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi	65
4.8. İstatistiksel Analizler	67
5. TARTIŞMA	68
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	85

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	Kanser hücre hatlarında DNF'nin proliferatif etkisi gösterilmektedir (Li, Qiu et al. 2020).	25
Tablo 3.1.	U87MG ve T98G hücrelerine TMZ uygulanması için oluşturulan deney grupları gösterilmektedir.	30
Tablo 3.2.	U87MG ve T98G hücrelerine DNF uygulanması ile belirlenen deney grupları gösterilmektedir.	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1.** Kanserin temel özellikleri gösterilmektedir. Tümör hücrelerinin ayırt edici özellikleri, sağlıklı hücrelerin malign karakter kazanmasıyla ortaya çıkmaktadır. 3
- Şekil 2.2.** Gliomların, WHO (I-IV) derecelerine göre histolojik olarak sınıflandırılması gösterilmektedir. Glioblastoma Multiforme, Derece IV astrositom olarak da bilinmekle birlikte, en yaygın ve en agresif beyin tümörü tipini oluşturmaktadır. 7
- Şekil 2.3.** GBM'e ait alt gruplar ve klinik özellikleri gösterilmektedir. GBM'ler, birincil ve ikincil GBM olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadırlar. Birincil GBM'ler hastalık öncesi belirti göstermeden oluşurlarken; düşük dereceli astrositomaların zaman içerisinde gelişim göstermesi ile de ikincil GBM'ler oluşmaktadır. 8
- Şekil 2.4.** Kanseri Genom Atlas'ına göre GBM'in moleküler sınıflandırılması gösterilmektedir. Pronöral, nöral, klasik ve mezenkimal olmak üzere dört alt birime ayrılmaktadır. 9
- Şekil 2.5.** GBM hastalarına klinikte uygulanan tedaviler gösterilmektedir. GBM hastalarının tedavisinde cerrahi uygulamayı takiben radyasyon ve kemoterapi tedavisi uygulanmaktadır (Rosinska and Gavard 2021). 12
- Şekil 2.6.** GBM hücrelerinin proliferasyon oluşturmaya başlamasıyla birlikte tedavide karşılaşılan başlıca zorluklar gösterilmektedir. 13

- Şekil 2.7.** Klinikte uygulanan standart tedavinin (Radyoterapi+TMZ), tek başına uygulanan TMZ veya radyoterapi tedavisine göre daha etkili olduğu görülmektedir (Gawel, Singh et al. 2022). 15
- Şekil 2.8.** Beyine ilaç girişinin önündeki en büyük engellerden biri olan kan beyin bariyerinin yapısı gösterilmektedir. Bu bariyerin yapısını destekleyen ve korunmasını sağlayan; eozinofil, nötrofil, astrosit ve mikrogia gibi birçok farklı hücre grupları bulunmaktadır. 16
- Şekil 2.9.** Temozolomid'in aktif formu olan MTIC'ye dönüşmesiyle, tümör hücrelerinin apoptoza uğrayışı gösterilmektedir (MTIC, 5-(3-methyltriazen-1-yl) imidazole-4-carboximide). 17
- Şekil 2.10.** TMZ aktivasyonu ve sitotoksik etkisi gösterilmektedir. TMZ sulu çözeltide bazik değere ulaşp MTIC, AIC ve MC'ye hidrolize olmaktadır. Bunun sonucunda da TMZ, kan beyin bariyerinden rahatlıkla geçebilmektedir (Ramalho, Andrade et al. 2019) (TMZ, Temozolomid; MTIC, 5-(3-methyltriazen-1-yl) imidazole-4-carboximide; AIC, 5-aminoimidazole-4 carboxamide; MC, metildiazonyum iyonu). 18
- Şekil 2.11.** TMZ direncinin mekanizması gösterilmektedir. Tümör hücrelerinde, MGMT ve BER aktivasyonunun artması TMZ direncine neden olurken; MMR aktivasyonu ise TMZ tedavisini etkin kılmaktadır (Lee 2016) (TMZ, Temozolomid; MGMT, Metilguanin-DNA Metiltransferaz; MMR, Yanlış Eşleşme Onarımı; BER, Baz Eksizyon Onarımı). 19

Şekil 2.12. RTK aracılı sinyal yolları ve tümör hücrelerinde meydana gelen değişimler gösterilmektedir. Siyah oklar tümör hücrelerindeki aktivasyonu, kırmızı oklar ise inhibisyonu göstermektedir. RTK'ler, Ras/MEK/ERK ve PI3K/Akt/mTOR olmak üzere iki yolak üzerinden sinyal vermektedir. Bu yollar tümör hücrelerinde aşırı ekspres edilmektedir ve bunun sonucunda tümör hücreleri proliferasyon olarak migrasyon ve invazyona yönelmektedirler (Pearson and Regad 2017) 22

Şekil 2.13. Raf/MEK/ERK sinyal yolağı mekanizması ile meydana gelen hücrel değişimler gösterilmektedir. Reseptör ligand etkileşimi sonucu, GTP ve GDP'nin yer değiştirmesi ile bu sinyal yolağı tümör hücrelerinde aktive olmaktadır. Bunun sonucunda da tümör hücrelerinde; anjiyogenez, proliferasyon ve farklılaşma gibi çeşitli hücrel değişimler meydana gelmektedir (Kolch 2000). 23

Şekil 2.14. Sorafenib (A) ve DNF'nin (B) moleküler yapıları gösterilmektedir. Sorafenib'e tridöterasyonlu bir N-metil grubu eklenerek DNF geliştirilmiştir (DNF, Donafenib). 24

Şekil 2.15. DNF'nin inhibe ettiği sinyal yolları gösterilmektedir. DNF; PDGFR, VEGFR ve çeşitli tirozin kinazların aktivitesini inhibe eden, yeni bir multikinaz inhibitörüdür. Bu sayede tümör hücre proliferasyonu ve anjiyogenezini baskılamaktadır (Qin, Bi et al. 2021). 25

Şekil 2.16. DNF'nin devam eden klinik faz çalışmaları gösterilmektedir. DNF'nin klinik araştırmaları ilk olarak 2014 yılında başlamış ve 2021 yılında Çin'de hepatosellüler karsinomlu hastaların tedavisi için onay

almıştır. Tiroid, kolorektal ve nazofarenks kanserlerinde de klinik çalışmaları hala devam etmektedir (Keam and Duggan 2021). 26

Şekil 3.1. U87MG ve T98G insan GBM hücre hatlarında gerçekleştirilen deney grupları gösterilmektedir. 29

Şekil 3.2. MTT kitinin protokolüne göre doz taramaları için deney aşamaları gösterilmektedir. DNF/TMZ uygulamasından sonra, MTT reagent A hücrelere eklendi ve 3-4 saat etüvde inkübe edildi. Ardından MTT reagent B solüsyonu eklenip bir gece etüvde inkübe edilerek ELISA kit okuyucuda 580nm’de okundu. 31

Şekil 3.3. Steril kültür tabaklarında ekilen U87MG ve T98G hücrelerinin ışınlanması sırasında yan saçılmaları engellemek için kullanılan “pleksiglass” gösterilmektedir. 33

Şekil 3.4. GBM hücrelerine bireysel ve kombine uygulanan TMZ ve DNF’ye ek olarak radyoterapinin uygulandığı deney grupları gösterilmektedir (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib). 34

Şekil 3.5. U87MG ve T98G hücrelerine uygulanan TMZ ve DNF sonucu hücrelerde yara izi oluşturularak 0, 6, 12 ve 24. saatlerdeki hareket potansiyelleri görülmektedir. 36

Şekil 3.6. U87MG ve T98G insan GBM hücre hatlarında gerçekleştirilen Western Blot deney grupları gösterilmektedir. Deney grupları arasına hem TMZ’nin hem de DNF’nin çözücüsü DMSO da eklendi ve böylelikle hücrelerde oluşan etkinin TMZ/DNF’den mi yoksa çözücü grubundan mı kaynaklandığı değerlendirildi. 37

- Şekil 4.1.** U87MG insan glioblastoma hücre hattına uygulanan TMZ'nin; 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saatlik inkübasyon süreleri sonunda hücre canlılığına etkisi gösterilmektedir (TMZ, Temozolomid). 42
- Şekil 4.2.** MTT analizi sonucunda; U87MG hücrelerine uygulanan TMZ'nin, en etkili zaman aralığı 24 saat ve buna bağlı IC₅₀ değeri de 120µM olarak belirlendi (TMZ, Temozolomid). 43
- Şekil 4.3.** T98G insan glioblastoma hücre hattına uygulanan TMZ'nin; 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saatlik inkübasyon süreleri sonunda hücre canlılığına etkisi gösterilmektedir (TMZ, Temozolomid). 44
- Şekil 4.4.** MTT analizi sonucunda; T98G hücrelerine uygulanan TMZ'nin, en etkili zaman aralığı 24 saat ve buna bağlı IC₅₀ değeri de 160µM olarak belirlendi (TMZ, Temozolomid). 45
- Şekil 4.5.** U87MG insan glioblastoma hücre hattına uygulanan DNF'nin; 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saatlik inkübasyon süreleri sonunda hücre canlılığına etkisi gösterilmektedir (DNF, Donafenib). 46
- Şekil 4.6.** MTT analizi sonucunda; U87MG hücrelerine uygulanan DNF'nin, en etkili zaman aralığı 24 saat ve buna bağlı IC₅₀ değeri de 3.4µM olarak belirlendi (DNF, Donafenib). 47
- Şekil 4.7.** T98G insan glioblastoma hücre hattına uygulanan DNF'nin; 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saatlik inkübasyon süreleri sonunda hücre canlılığına etkisi gösterilmektedir (DNF, Donafenib). 48

- Şekil 4.8.** MTT analizi sonucunda; T98G hücrelerine uygulanan DNF'nin, en etkili zaman aralığı 24 saat ve buna bağlı IC₅₀ değeri de 4µM olarak belirlendi (DNF, Donafenib). 49
- Şekil 4.9.** U87MG hücrelerine uygulanan TMZ ve DNF'nin hem bireysel hem de kombine uygulamalarında; 24 (A), 48 (B), 72 (C), 96 (D) ve 120 (E) saatlerin sonunda hücre canlılığına etkisi görülmektedir (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib; K1/2/3, Kombine). 51
- Şekil 4.10.** U87MG hücrelerine uygulanan TMZ, DNF ve radyoterapinin; 24 (A), 48 (B), 72 (C), 96 (D) ve 120 (E) saatlerin sonunda hücre canlılığına etkisi görülmektedir (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib; K1/2/3, Kombine). 53
- Şekil 4.11.** T98G hücrelerine uygulanan TMZ ve DNF'nin, hem bireysel hem de kombine uygulamalarında; 24 (A), 48 (B), 72 (C), 96 (D) ve 120 (E) saatlerin sonunda hücre canlılığına etkisi görülmektedir (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib; K1/2/3, Kombine). 55
- Şekil 4.12.** T98G hücrelerine uygulanan TMZ, DNF ve radyoterapinin; 24 (A), 48 (B), 72 (C), 96 (D) ve 120 (E) saatlerin sonunda hücre canlılığına etkisi görülmektedir (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib; K1/2/3, Kombine). 56
- Şekil 4.13.** U87MG hücrelerine, TMZ ve DNF uygulamasının ardından hücrelerde oluşturulan yara izi ile hücrelerin hareket potansiyellerindeki değişimleri gösterilmektedir. Tümör hücrelerine uygulanan TMZ ve DNF'nin zamana bağlı hücre migrasyonunu geriletmediği görülmektedir. 58

Şekil 4.14. U87MG hücrelerinde 6, 12 ve 24. saatlerde; her grup kendi arasında kıyaslandığında hücre göçünde zamana bağlı bir gerilemenin meydana geldiği görülmektedir. Yapılan istatistiksel analizler sonucu, TMZ ve DNF'nin hem bireysel hem de kombine uygulamasının kontrole kıyasla yara izi mesafesini koruyarak migrasyonu anlamlı düzeyde yavaşlattığı gösterilmektedir. 58

Şekil 4.15. T98G hücrelerine uygulanan TMZ ve DNF'nin ardından hücrelerde oluşturulan yara izi ile hareket potansiyellerindeki değişimler gösterilmektedir. Tümör hücrelerine uygulanan TMZ ve DNF'nin zamana bağlı hücre migrasyonunu inhibe ettiği görülmektedir. 59

Şekil 4.16. T98G hücrelerine TMZ ve DNF uygulamasının ardından, her grup kendi arasında kıyaslandığında hücre göçünde zamana bağlı (6, 12 ve 24. saatler) azalma meydana geldiği görülmektedir. Yapılan istatistiksel analizler sonucu, TMZ ve DNF'nin hem bireysel hem de kombine uygulamasının kontrole kıyasla yara izi mesafesini koruyarak migrasyonu anlamlı düzeyde azalttığı görülmektedir. 60

Şekil 4.17. U87MG hücrelerine TMZ ve DNF uygulamasının ardından, Vinculin ve *p*-ERK protein miktarları görülmektedir (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib). 62

Şekil 4.18. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda *p*-ERK protein miktarlarında, DNF (3.4µM) ve TMZ'nin (120µM) hem bireysel hem de kombine uygulandığı gruplarda artış olduğu tespit edildi (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib). 62

- Şekil 4.19.** T98G hücrelerine TMZ ve DNF uygulamasının ardından Vinculin ve *p*-ERK 1/2 protein miktarları görülmektedir (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib). 63
- Şekil 4.20.** U87MG hücrelerine uygulanan TMZ ve DNF sonrası, gruplardaki Vinculin ve Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyon miktarları görülmektedir (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib). 64
- Şekil 4.21.** U87MG hücrelerinde Aktif Kaspaz-3 protein seviyesi için, her grup kendi internal kontrolü (Vinculin) ile oranlandığında; özellikle TMZ grubunda Aktif Kaspaz-3 protein seviyesinde artış görüldü. DNF ve kombine uygulanan grupların da TMZ'ye duyarlı olan bu hücreleri apoptoza uğrattığı tespit edildi (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib). 65
- Şekil 4.22.** T98G hücrelerine TMZ ve DNF uygulamasının ardından, Vinculin ve Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyon miktarları görülmektedir (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib). 66
- Şekil 4.23.** T98G hücrelerinde Aktif Kaspaz-3 protein seviyesi için, her grup kendi internal kontrolü (Vinculin) ile oranlandığında; özellikle TMZ ve DNF'nin kombine uygulandığı grupta Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyon seviyesinde artış tespit edildi. TMZ'nin anlamlı bir sonuç ifade etmemesine rağmen DNF'nin apoptozu indüklediği görüldü (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib). 66

SİMGELER ve KISALTMALAR

AIC	:5-aminoimidazole-4 carboxamide
APS	:Amonyum Persülfat
BCA	:Bicinchoninic Asit
BER	:Baz Eksizyon Onarımı
BSA	:Bovin Serum Albumin
DMSO	:Dimetil sülfoksit
DNF	:Donafenib
dH₂O	:Distile Su
DSÖ/WHO	:Dünya Sağlık Örgütü/World Health Organization
EGFR	:Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri
FGFR	:Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörleri
FSR	:Franksiyone Stereostatik Radyoterapi
Gr	:Gray
HCl	:Hidroklorik Asit
HRP	:Horseradish Peroksidaz
HGFR	:Hepatosit Büyüme Faktörü Reseptörleri
IGFR	:İnsülin ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörleri
IDH	:İzositrat Dehidrojenaz
KBB	:Kan Beyin Bariyeri
KH₂PO₄	:Mono Potasyum Fosfat
IgG	:İmmünoglobulin G
MMR	:Yanlış Eşleşme Onarımı

MGMT	:Metilguanin-DNA Metiltransferaz
MTIC	:5-(3-methyltriazen-1-yl) imidazole-4-carboximide
MC	:Metildiazonyum İyonu
MSS	:Merkezi Sinir Sistemi
Na₂HPO₄	: Disodyum Fosfat
NaCl	:Sodyum Klorür
PARP1	:Poli ADP-Riboz Polimeraz 1
PDGFR	:Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü
PIK	:Proteaz İnhibitör Kokteyli
PBS	:Fosfat Tuzu Tamponu
RT	:Radyoterapi
RTK	:Reseptör Tirozin Kinaz
SDS	:Sodyum Dodesil Sülfat
SR	:Stereostatik Radyocerrahi
TBR	:Tüm Beyin Radyoterapisi
TEMED	:N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TMZ	:Temozolomid
VEGFR	:Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü

1. GİRİŞ

Glioblastoma Multiforme (GBM), özellikle yetişkinlerde meydana gelen MSS'deki en agresif primer beyin tümörü olarak bilinmektedir (Wen and Kesari 2008, Strickland and Stoll 2017, Huang, Li et al. 2020, Bosio and Lombardi 2023). Hücrel heterojenliği nedeniyle GBM, son derece invazif ve hızlı ilerleme potansiyeline sahiptir (Louis, Ohgaki et al. 2007, Li, Zhang et al. 2021). Klinikteki tedavi, cerrahi uygulamayı takiben eş zamanlı uygulanan radyoterapi ve Temozolomid'i (TMZ) içermektedir (Stupp, Hegi et al. 2009, Ortiz, Cabeza et al. 2019, Pant and Lim 2023). GBM hastalarında radyoterapi uygulaması nörolojik yaşam kalitesini arttırmakta ve TMZ ile kombine uygulandığında da hasta sağkalımını desteklemektedir (Omay and Vogelbaum 2009). Ancak bu tedavilere rağmen hastaların sağkalımı 12-15 ay ile sınırlı kalmaktadır (Pant and Lim 2023). Daha ileri gitmek bilinen bu tedavilerle henüz mümkün değildir. Bu yüzden hastaların sağkalım süresini uzatmak için günümüzde çok sayıda çalışma planlanmaktadır.

TMZ; oral yolla alınan, DNA metilleyici/alkilleyici ve lipofilik özellikli küçük molekülü kemoterapötik bir ajandır (Stupp, Gander et al. 2001, Fukushima, Takeshima et al. 2009, Wesolowski, Rajdev et al. 2010, Karachi, Dastmalchi et al. 2018). TMZ, asidik pH'lardayken kan beyin bariyerinden (KBB) geçememektedir. Oral uygulamadan sonra TMZ, bazik pH koşullarına ulaşp heterosiklik halkanın açılmasıyla 5-(3-methyltriazene-1-yl) imidazole-4-carboximide (MTIC) ve CO₂'i serbest bırakmaktadır. (Ramalho, Andrade et al. 2019). Bu farmakolojik özellikler, TMZ'yi MSS malignitelerinin tedavisi için ideal bir ajan yapmaktadır. Bu nedenle 2005 yılından bu yana GBM tedavisi için en etkili kemoterapötik ajan olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Stupp, Hegi et al. 2014).

TMZ tedavisinin etkinliği bilinmesine rağmen hastaların %50'sinden fazlası zaman içerisinde bu tedaviye karşı direnç geliştirmektedirler (Louis, Ohgaki et al. 2007, Giotta Lucifero and Luzzi 2021). TMZ direncinin en temel sebebi, spesifik moleküler yolların düzensizliği olarak bilinmektedir (Singh, Miner et al. 2021). Reseptör tirozin kinazlar (RTK); büyüme faktörleri, hormonlar, sitokinler, nörotrofik faktörler ve diğer hücre dışı sinyal molekülleri için reseptör görevi gören hücre yüzeyi reseptörleri ailesidir. Özellikle tümörogenik yanıtlarda RTK'lerin etkilendiği ve alt yollarında birçok mekanizmayı

çalıştırdığı bilinmektedir (Pearson and Regad 2017). Bunlardan her biri ayrı bir öneme sahipken özellikle tümörün anjiyogenezini tetikleyen ve tümörü migrasyona yönlendiren Raf/MEK/ERK sinyal yolağı en önemlisidir (Roskoski 2018).

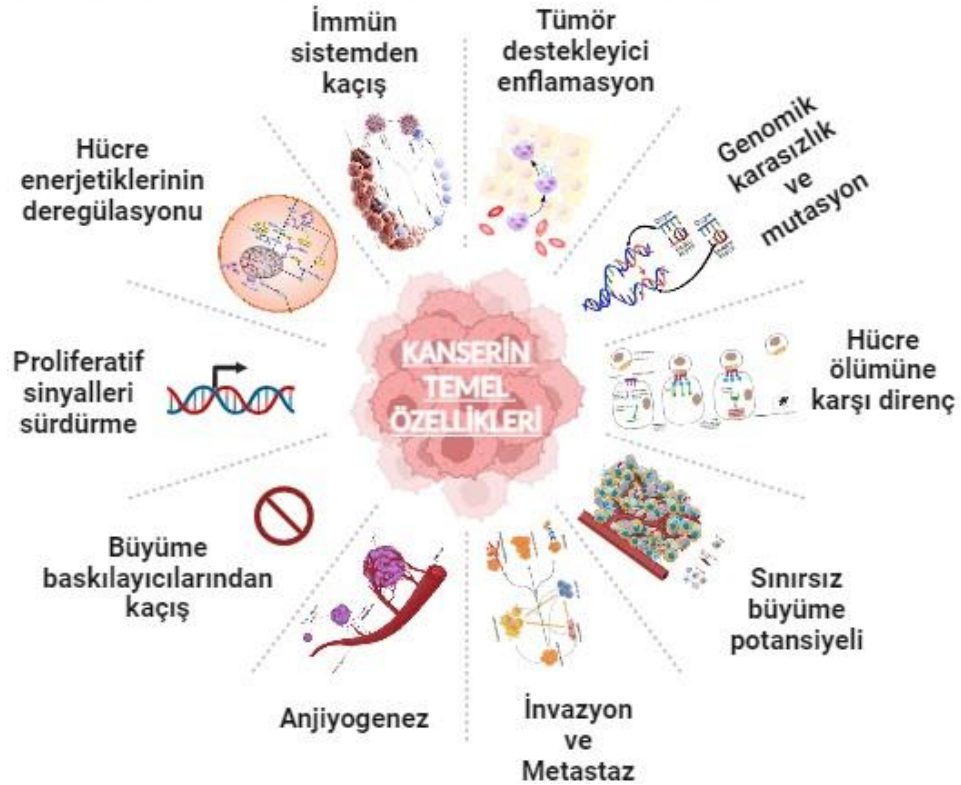
İşte bu durum, TMZ tedavisinin en sınırlayıcı kısmını oluşturmakta ve bir süre sonra bu hastalarda tedavi, etkinliğini maalesef ki yitirmektedir. Son çalışmalar, TMZ ile kombine yeni tedavi seçeneklerinin ortaya konulabilmesi için ilaç hedefli araştırmalarının ön planda olduğunu göstermektedir (Chinot, Wick et al. 2014). Bu nedenle günümüzde yeni ve etkin tedavi seçenekleri aranmakta olup ilaca gidilebilecek potansiyele sahip yeni bir ajanın elde edilmesi için çalışılmaktadır. Durum bu şekilde olduğu için projemizi zamanla TMZ tedavisine direnç geliştirmiş hastaları da göz önünde bulundurarak klinikteki bu standart tedaviye ek; yeni bir ajanın etkinliğini değerlendirmek üzerine kurguladık. Çalışmamızla etkinliğini araştırmak istediğimiz DNF; oral yolla alınan, Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü (VEGFR), Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü (PDGFR) ve çeşitli Raf kinazlar gibi çoklu reseptör tirozin kinazın aktivasyonunu inhibe eden, böylelikle tümör hücresi proliferasyonu ve anjiyogenezini baskılayan küçük molekülü yeni bir multikinaz inhibitörüdür (Niu, Yi et al. 2021).

Çalışmamızda, GBM hücrelerine DNF ve TMZ'nin hem bireysel hem de kombine uygulanmasıyla *in vitro* ortamdaki etkileri açıklanmaya çalışıldı. Bu uygulamalara, radyoterapinin ek tedavi olarak uygulanması da tümör hücrelerindeki etkisini değerlendirmemizi sağladı. Tümör hücrelerinin hareket potansiyelleri, hücrelere uygulanan DNF ve TMZ'nin ardından hücrelerde yara izi oluşturarak migrasyon analizi ile test edildi. Ayrıca GBM hücrelerinde bu uygulamalar sonucu, *p*-ERK 1/2 ve Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyon seviyeleri değerlendirildi. Literatürde DNF uygulamasıyla GBM hücrelerinde *p*-ERK 1/2 proteinin düzeyini gösteren bir çalışma olmadığından; çalışmamızdan elde edilen veriler literatüre ilk kez kazandırılacaktır. Ek olarak, tümör hücrelerinin apoptoza gidip gitmediği Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyon seviyesi ile ilk kez gösterildi. DNF ve TMZ'nin kombine uygulamasıyla yeni terapötik hedeflere gidilme olasılığı da çalışmamızın sonuçları arasında yer almaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlar, GBM tedavisinde yeni bir terapötik yaklaşım için bilgi sunabileceğinden yeni projelerin kurgulanmasına öncülük edebilecek niteliktedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, farklı organlarda hücrelerin kontrolsüz çoğalarak yayılması ile meydana gelen; klinik görünümü, tedavisi ve yaklaşımları kişiden kişiye farklılık gösterebilen hastalık grubu olarak tanımlanmaktadır (Kyriakou, Yarandi et al. 2021). Kanserın günümüzde ayırt edici on temel özelliğı vardır (Senga and Grose 2021). Bu özellikler, tümör oluşumu/gelişimi sırasında hücrenin malign karakter kazanmasıyla ortaya çıkmaktadır. Son zamanlarda tümör hücrelerinin en çok araştırılan özelliğı immün sistem tarafından tanınarak, bu sistemde yer alan hücrelerden kaçabilmeleridir. Ayrıca, tümör mikroçevresinde oluşan inflamasyon, hücrelerin mutasyona uğrama eğilimi ve genomik kararsızlığı; tümörün çoğalabilme, hücre ölüm mekanizmalarına karşı direnç geliştirme ve yeni kan damarları oluşturup tümör hücrelerinin beslenmesine katkı sağlayarak invazyon ve metastaz yapabilme kabiliyetini arttırmaktadır (Senga and Grose 2021, Hanahan 2022) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kanserın temel özellikleri gösterilmektedir. tümör hücrelerinin ayırt edici özellikleri, sağlıklı hücrelerin malign karakter kazanmasıyla ortaya çıkmaktadır.

Tümör hücreleri sürekli proliferasyon olarak çevre dokulara yayılım göstermektedirler. Sağlıklı hücrelerin tümör hücrelerine dönüşmesi genellikle kanser öncesi bir lezyondan tümöre ilerleyen kademeli bir süreçtir (Roy and Saikia 2016). Kişinin genetik faktörleri, iyonlaştırıcı radyasyon, tütün dumanının bileşenleri ve bazı virüs, bakteri veya parazitlerden kaynaklanan enfeksiyonlar gibi çeşitli dış etkenler tümör hücrelerinin oluşumuna yol açmaktadır (WHO, 2018) (Kyriakou, Yarandi et al. 2021). Alkol tüketimini azaltmak, düzenli egzersiz yapmak ve sağlıklı vücut ağırlığına sahip olmak kanser sebepli ölümleri %30-50 oranında azaltabilmektedir (WHO, 2018) (Kyriakou, Yarandi et al. 2021). Kanser dünya çapında en önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almakta (Kyriakou, Yarandi et al. 2021) ve ülkemizde kalp ve damar hastalıklarından sonra meydana gelen ikinci ölüm nedenini oluşturmaktadır. Günümüzde kanser tanısı alan hastaların insidansı günden güne artmakta ve erken tanı, hasta sağkalımının artması için büyük önem taşımaktadır (Roy and Saikia 2016). Bu nedenle kanser sebebinin belirlenerek kontrol altına alınması son derece önemlidir. Fakat kanser türlerinin yarısı teşhis edildiğinde maalesef ki artık ileri evrededir. Eğer kanser erken teşhis edilemez ve hücrelerin yayılımı kontrol altına alınamazsa ciddi hayati tehlike oluşturmaktadır (Crosby, Bhatia et al. 2022)

Kanser birçok sebepten ortaya çıkabilen bir hastalık olarak bilinmekle birlikte, tümör hücrelerinin büyümesi, invazyonu ve metastazı kişiden kişiye farklılık gösterebilmektedir. Tümör hücrelerinin proliferasyon olmasını engellemek için;

1. Tümörlü dokunun alınması/küçültülmesi için cerrahi rezeksiyon,
2. Kemoterapötik ajan veya hormon tedavisi ve
3. Radyoterapi uygulaması yapılmaktadır.

Cerrahi rezeksiyon, kanser tedavisinde ilk olarak başvuru olan tedavi yöntemidir. Amaç tümörlü dokuyu ameliyatla almak ya da boyutlarının küçültülmesini sağlamaktır. Kemoterapi, tümör hücreleri üzerinde sitotoksik bir etki yaratıp bu hücrelerin proliferasyonu, invazyonu ve metastazını önleyerek tümör hücrelerinin ölmesine neden olmaktadır. Radyoterapi ise direkt tümörlü organa ışıma yaparak tümör hücrelerinin çoğalmasını engellemektedir (Kyriakou, Yarandi et al. 2021).

2.2. Kanserde Apoptoz Direnci

Apoptoz, programlanmış hücre ölüm mekanizmalarının başında gelir ve çok hücreli organizmalarda homeostazın korunmasını sağlar. Bu yüzden apoptoz mekanizmasının anlaşılması birçok hastalık için son derece önemlidir. Bazı hastalıklarda apoptozun artmasına rağmen, kanserde apoptozun azalması büyük bir sorun teşkil etmektedir (Bernard, Chevrier et al. 2019). Kanser tedavisinde hasta sağkalımının artması ve yaşam kalitesinin/süresinin iyileştirilmesi için yeni terapötik yaklaşımlara her geçen gün daha çok ihtiyaç vardır. Çoğu kanser türünde apoptoza karşı direncin gelişmesi adjuvan olarak uygulanan radyoterapi ve kemoterapi tedavisinden kaynaklanmaktadır. Bu sebeple kanser tedavisinin temel hedeflerinden biri, apoptotik sinyal yollarının hedeflenmesi ve hücrelerin bu yola yönlendirilmesidir (Mortezaee, Salehi et al. 2019). Apoptoz sinyalleri, kaspazların aracılık ettiği içsel (mitokondriyal yol) veya dışsal (ölüm reseptörü yolu) olmak üzere iki farklı yolla kontrol edilmektedir (Yin, Zhang et al. 2014, Bhat, Thapa et al. 2023). İçsel yol, mitokondri hasarı ile tetiklenir ve kaspaz-9'un aktivasyonu ile apoptozu tetikler. Dışsal yol ise, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinden gelen sinyallerle aktive edilir ve kaspas-8'in aktivasyonuna yol açar (Bhat, Thapa et al. 2023). Kaspazlar apoptozda önemli rol oynayan sistein proteazlardır. İşlevlerine göre on dört kaspaz tanımlanmış olup bunlar başlatıcı ve efektör kaspaz olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9 ve -10) protein kompleksi oluşumunun bir sonucu olarak aktive edilir. Kaspaz -3, -6 ve -7 cellat görevi görür. Kaspaz-3, apoptozla ilgili çeşitli substratları parçalayan önemli bir enzimdir ve tümör hücrelerinde ekspresyonu apoptozun indüklenmesine yardımcı olur. Kanser başlangıcından sonra apoptozun indüklenmesi, tümör hücrelerinin proliferasyonuna karşı koyan ilk süreçtir (Yin, Zhang et al. 2014). Çeşitli çalışmalar, kanser gelişimi ve ilerlemesi sırasında farklı apoptotik bileşiklerin serbest bırakıldığını göstermektedir. Bu nedenle karsinogenezde ekspresyonların altında yatan apoptotik süreçlerin araştırılması, hastalığın ilerlemesini kısıtlayabilir (Kashyap, Garg et al. 2021). Tüm bu bilgiler ışığında kanser tedavisinde önemli hedeflerden biri, malign tümörlerde apoptozu indüklemek olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.3. Beyin Tümörleri

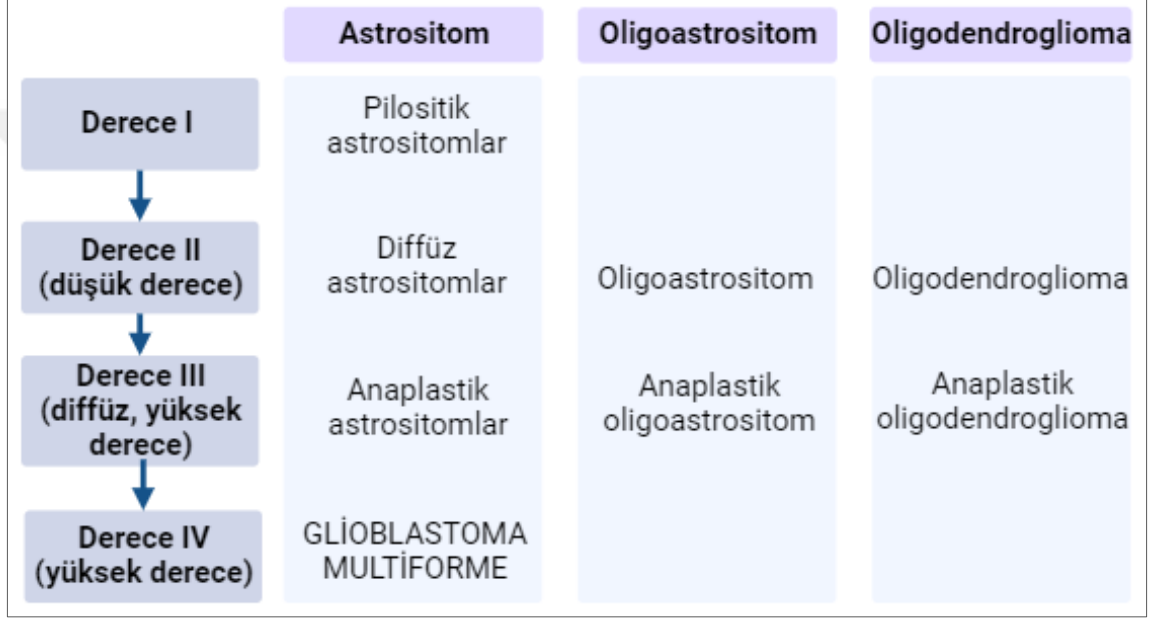
Beyin tümörleri, MSS'de kontrolsüz şekilde çoğalan bir yığın hücre topluluğundan oluşmaktadır. Tüm kanser türlerinin %1,5'ini oluşturup; kansere bağlı ölümlerin de %2'sinden sorumludur (Barnholtz-Sloan, Ostrom et al. 2018). Beyin tümörleri, birincil (primer) ve ikincil (sekonder) beyin tümörleri olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. Primer beyin tümörü, beynin kendisinden köken alan ve o bölgede yayılım gösteren malign karakterli tümördür. Bu tümör invazif olmasına rağmen metastaz yapma yeteneğine sahip değildir. Beyinde oluşan tümörler, beyinde bulunan glial doku ve nöronlardan kaynaklanırlar. Yetişkinlerde en sık karşılaşılan primer beyin tümörü gliomlardır. Sekonder beyin tümörü ise vücudun başka bölgesinden kaynaklanabilen metastaz yapma yeteneğine sahip ve hızlı bir şekilde yayılım gösteren beyin tümörü tipini oluşturmaktadır. Her iki tümör grubu içinde tedavide belli başlı zorluklar bulunmaktadır. Tedavi planı tümörün heterojen yapısından dolayı bireysel olarak uygulanmaktadır.

2.3.1. Gliomaların Derecelendirilmesi ve Sınıflandırılması

"Gliom" terimi, astrositler, oligodendrositler ve ependimal hücreler gibi normal glial hücrelerden köken alabilen; MSS'nin solid tümörlerini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Arcella, Limanaqi et al. 2020). Çok sayıda histolojik tip ve farklı biyolojik malignite derecelerine sahip tümör alt tiplerini içermektedir (Ostrom, Bauchet et al. 2014). Gliomların sınıflandırılması ve derecelendirilmesi için en yaygın kullanılan sınıflandırma, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ/WHO) tarafından yapılmaktadır. Bu sınıflandırmaya göre gliomlar, histolojik özelliklerine göre dört kategoriye ayrılırlar (Arcella, Limanaqi et al. 2020). Gliomlar; hem astrositik, oligodendrogial veya ependimal hücrelerin özelliklerini gösterip göstermediklerine göre hem de malignite derecelerine göre I ile IV arasında bir ölçekte derecelendirilerek sınıflandırılırlar (Ostrom, Bauchet et al. 2014) (Şekil 2.2).

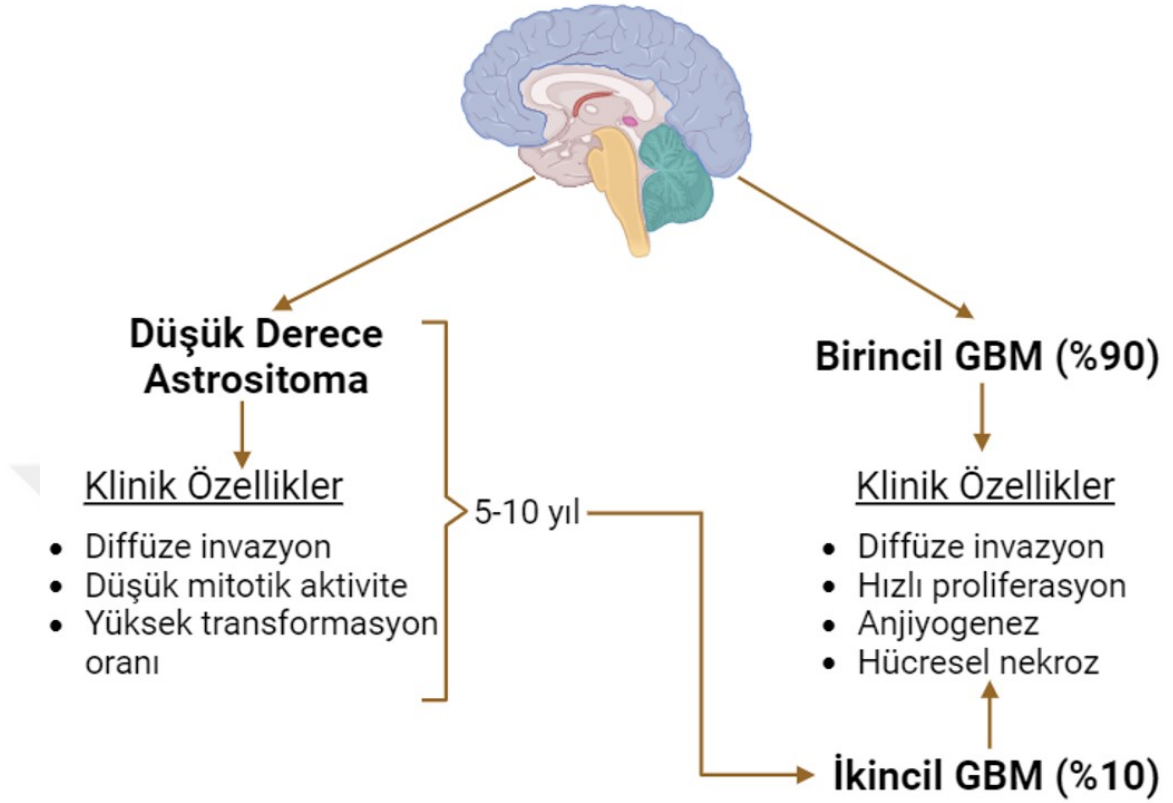
Gliomlar, diğer solid tümörlerin aksine nadiren MSS dışına tohumlanırlar (seeding) ve bu nedenle tümör derecesi, klinik sonucun birincil belirleyicisidir. Derece I, benign karakterde tümörlerdir ve bu tümörler solid ve infiltratif olmadığı (pilositik astrositomlar) için cerrahi tedavisi mümkündür. Derece II tümörler, uzun klinik seyirler izlemekte ve genellikle düşük dereceli gliomları oluşturmaktadırlar (Ohgaki and Kleihues 2013).

Derece III gliomlar oldukça invazif ve agresif olup, hızla ilerleme potansiyeline sahiptir. “Glioblastoma” olarak da bilinen derece IV tümörler en yaygın ve ölümcül yetişkin beyin tümörleridir (Vigneswaran, Neill et al. 2015, Arcella, Limanaqi et al. 2020). Bu hastalar zamanla tedavide kullanılan kemoterapiye direnç geliştirirler ve hasta sağkalımı bu yüzden 12-15 ay ile sınırlıdır. Derece II gliomların %70’i, tanıdan sonraki 5-10 yıl içinde derece III-IV gliomlara dönüşerek kötü prognoz sergilemektedirler.



Şekil 2.2. Gliomların, WHO (I-IV) derecelerine göre histolojik olarak sınıflandırılmaları gösterilmektedir. Glioblastoma Multiforme, Derece IV astrositom olarak da bilinmekle birlikte, en yaygın ve en agresif beyin tümörü tipini oluşturmaktadır.

GBM’ler *de novo* ortaya çıkan birincil GBM’ler ve düşük dereceli astrositomlardan oluşan ikincil GBM’ler olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır (Ohgaki and Kleihues 2013). GBM’lerin %90’ını birincil GBM grubu oluştururken; %10’luk kısmını da ikincil GBM grubu oluşturmaktadır (Krakstad and Chekenya 2010). Birincil GBM’ler hastalık öncesi herhangi bir belirti göstermeden gelişirlerken; var olan daha düşük dereceli astrositomun uzun zamanda oluşması ile ikincil GBM’ler akut *de novo* olarak gelişim göstermektedirler. Birincil GBM hücreleri oldukça hızlı gelişip yayılabilmekte ve GBM’lerin çoğu bu grupta yer almaktadır. İkincil GBM’ler ise daha düşük dereceli tümörün gelişmesi ile oluşarak daha yavaş büyümektedirler (Maher, Furnari et al. 2001, Ohgaki and Kleihues 2013) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. GBM'e ait alt gruplar ve klinik özellikleri gösterilmektedir. GBM'ler, birincil ve ikincil GBM olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadırlar. Birincil GBM'ler hastalık öncesi belirti göstermeden oluşurlarken; düşük dereceli astrositomaların zaman içerisinde gelişim göstermesi ile de ikincil GBM'ler oluşmaktadır.

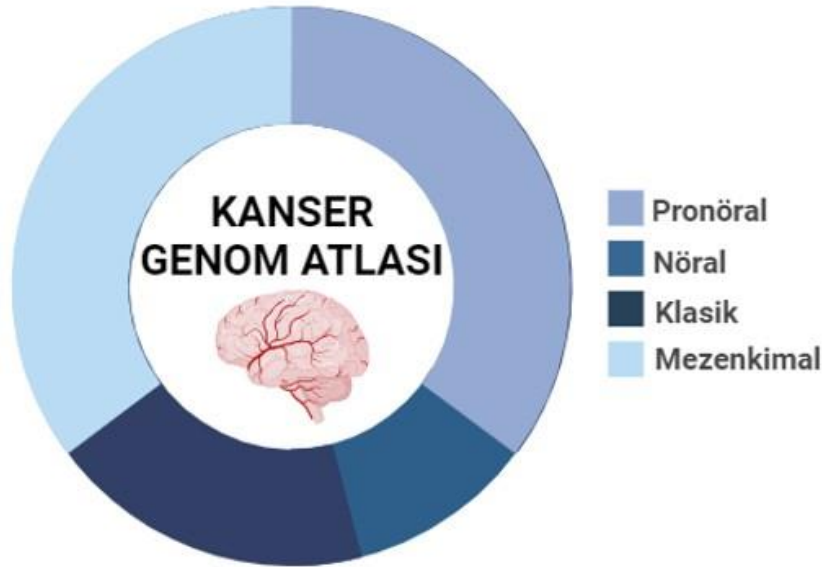
2.4. Glioblastoma Multiforme (GBM)

GBM, yıllık 100.000 popülasyonda 3.19 insidans ile MSS'de en yaygın görülen primer beyin tümörüdür (Ostrom, Gittleman et al. 2013, Strickland and Stoll 2017, Martin, Bianchi et al. 2021). Aynı zamanda hücrelerin kontrolsüz bir şekilde proliferasyonu ile birlikte lokal infiltrasyon, anjiyogenez, nekroz eğilimi ve tedavi direnci ile karakterize olan GBM, derece IV astrositomdur (DeCordova, Shastri et al. 2020). DSÖ, GBM'i İzositrat Dehidrojenaz (IDH)-vahşi tip astrositik tümör olarak tanımlamaktadır. 2021 yılı DSÖ verilerine göre bu tümör her 100 kişiden birinde görülmekle birlikte, erkeklerde kadınlara göre daha sık rastlanmaktadır. Yaşla birlikte artan insidansı hastaların sağkalım süresini de bir o kadar azaltmaktadır.

GBM, nöronların destek hücreleri olarak bilinen glia hücrelerinin malign karakter kazanmasıyla ortaya çıkmakta ve yıldız şeklinde ışınlımsal karakterde büyüyerek beyin dokusuna yayılım göstermektedir. GBM tümörlerinin bu düzensiz/yıldızlımsı karakterdeki

yapısı ve yayılmaları, normal beyin dokusu içine saçaklı bir şekilde ilerlemesine neden olmakta, bu durum da cerrahi rezeksiyonu bir o kadar zorlaştırmaktadır. Bu yayılımı ile metastaz yapmadan sadece primer tümör olarak beyin dokusunda yayılım göstermektedir. GBM'in oluşum/gelişim göstermesi, genetik ve epigenetik değişimlerle ilişkilendirilmiştir. GBM'in moleküler profilleri Kanser Genom Atlas'ına göre nöral, pronöral, klasik (proliferatif) ve mezenkimal olmak üzere dört alt tipe ayrılmaktadır (Herrera-Oropeza, Angulo-Rojó et al. 2021) (Şekil 2.4). GBM'in bu moleküler alt tipleri tümörün heterojenite ve agresifliği ile ilişkilidir (Huse and Holland 2010). Nöral ve pronöral alt tipler düşük dereceli gliomlarda meydana gelirken, klasik ve mezenkimal alt tipler ise yüksek dereceli gliomlarda daha sık görülmektedir. Yapılan çalışmalarla dört alt tipin sağkalım analizleri sonucunda; pronöral tipin iyi bir prognoz sergilediği, nöral alt tipin genel sağkalım ile orta düzeyde bir korelasyonda olduğu, klasik ve mezenkimal alt tiplerin ise en kötü klinik sonuçlara sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca pronöral alt tip genellikle genç hastalarda ortaya çıktığı, mezenkimal ve klasik alt tiplerin ise yetişkinlerde ortaya çıkarak daha agresif yüksek dereceli gliomlarla bağlantılı olduğu bilinmektedir (Lin, Yan et al. 2014, Herrera-Oropeza, Angulo-Rojó et al. 2021).

GBM'in Moleküler Sınıflandırılması



Şekil 2.4. Kanser Genom Atlas'ına göre GBM'in moleküler sınıflandırılması gösterilmektedir. Pronöral, nöral, klasik ve mezenkimal olmak üzere dört alt birime ayrılmaktadır.

GBM; histopatolojik olarak farklılaşmış veya farklılaşmamış tümör hücrelerinden ziyade morfoloji ve prolifer olma özelliğinden dolayı heterojen bir hücre popülasyonuna sahiptir (DeCordova, Shastri et al. 2020, Delello Di Filippo, Hofstatter Azambuja et al. 2021). Klinikte kullanılan standart tedavi; cerrahi rezeksiyon sonrası uygulanan eş zamanlı kemoterapi ve radyoterapiyi içermektedir. Fakat bu tedavilere rağmen hastalarda oluşan tümör nüksü nedeniyle hastalar kötü bir prognoza sahiptir (Cha, Kang et al. 2020). GBM, ortalama 15 aylık sağkalım süresi ile zor bir tedavi sürecini kapsamakta ve hastaların sadece %5,5'i teşhis edildikten sonra beş yıl hayatta kalabilmektedir. Moleküler açıdan bu kötü prognoza ve genomik mutasyonlara bağlı tümör hücre sağkalımı, proliferasyonu ile apoptozun işlemeyişi gibi birçok sinyal yolağının aktive olmasıyla ortaya çıkmaktadır (DeCordova, Shastri et al. 2020). GBM ekstrakraniyal olarak metastaz yapmamakla birlikte oldukça invaziftir ve beynin anatomik yapısından dolayı net sınırlardan yoksundur. Bu nedenle hastalarda tam cerrahi rezeksiyon zordur ve rezeksiyon sonrası alınamayan mikroskopik bir tümör kalıntısı bile hastalarda nüks meydana getirebilmektedir. Tümör genellikle beynin frontal ve temporal loblarına yerleşmekle birlikte nadiren beyin sapı, beyincik ve omurilikte de görülmektedir (Kanu, Mehta et al. 2009, DeCordova, Shastri et al. 2020).

Hastalığı oluşturan risk faktörlerine dair literatürde kesin bir bilgi yer almamasına rağmen iyonlaştırıcı radyasyonun ilk sırada olduğu bilinmektedir (Delello Di Filippo, Hofstatter Azambuja et al. 2021). Klinik belirtiler, tümörün yeri ve boyutuna göre değişebilmekle birlikte hastalarda genellikle baş ağrısı, nörolojik defisit, konfüzyon, hafıza kaybı, havale ve davranış/kişilik değişiklikleri gibi farklılıklar görülmektedir. Bu belirtiler tümörün hızla büyümesi sonucunda beyinde artan basınç nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Tümör büyüdükçe bası yaptığı yerin özelliğine göre bazı beden işlevlerinde kayıplar ortaya çıkabilmektedir. Teşhis ve tedavi yanıtı, manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve fonksiyonel MRG, difüzyon ağırlıklı görüntüleme, difüzyon tensör görüntüleme, dinamik kontrastlı MRG, perfüzyon görüntüleme, proton manyetik rezonans spektroskopisi ve pozitron emisyonu gibi ek teknolojilerin kullanılmasıyla tanı konulmaktadır.

2.4.1. GBM Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi

GBM, tüm beyin tümörlerinin yaklaşık %15'ini oluşturmakta ve çoğunlukla 55-65 yaş arası yetişkinlerde görülmektedir (Khabibov, Garifullin et al. 2022). Çocuklarda çok nadir görülmekle birlikte insidansı genellikle yaşla birlikte artmaktadır. Hastalığın görülme olasılığı 75-84 yaşlarda zirve yapar ve 85 yaştan sonra azalır. Hastaların sağkalım sürelerini artırmaya yönelik çok sayıda çalışma mevcuttur. Klinikte standart tedavi olarak eş zamanlı uygulanan radyoterapi ve TMZ'nin 14,6 ay ile hastalarda en yüksek sağkalım oranına sahip tedavi olduğu bilinmektedir (Stupp, Hegi et al. 2009). Bu tedavi eş zamanlı uygulandığında 5 yıllık ortalama sağkalım süresi %9,8 iken; tek başına uygulanan radyoterapide ise bu süre %1,9'a kadar düşmektedir (Khabibov, Garifullin et al. 2022).

GBM erkeklerde daha fazla rapor edilmekte ve görülme oranı kadınlara göre %1,57 daha artış göstermektedir (Ostrom, Gittleman et al. 2013). Birincil GBM'ler erkeklerde, ikincil GBM'ler ise kadınlarda daha sıktır (Ohgaki, Dessen et al. 2004). Literatürde GBM insidansının, beyaz ırkta diğer etnik kökenlere göre arttığı görülmektedir. GBM'ler sıklıkla supratentoriyal bölgede görülmekte ve çok nadir serebellum ve omurilikte ortaya çıkmaktadır.

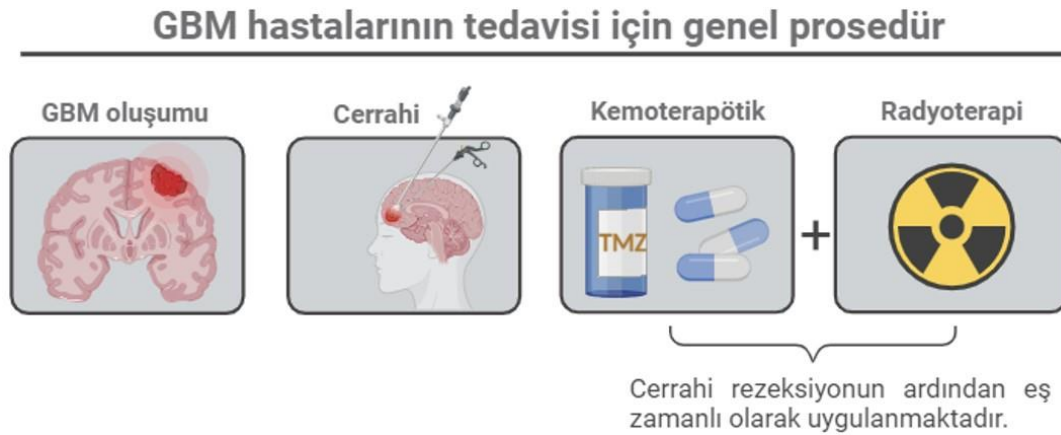
Bugüne kadar, GBM gelişimi için kesin bir risk faktörü veya altta yatan kanserojen neden bilinmemekle birlikte en önemli risk faktörünün, yüksek düzeyde iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalmaktan kaynaklandığı düşünülmektedir (Hanif, Muzaffar et al. 2017, Khabibov, Garifullin et al. 2022). Çevresel risk faktörleri arasında iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma dışında; vinil klorür, böcek ilaçları, sigara içme, petrol arıtma veya üretim işi ve sentetik kauçuk imalatında istihdam gibi faktörler yer almaktadır (Alifieris and Trafalis 2015). Yapılan çalışmalarda, alerji ve atopik hastalıkları olan hastalarda gliom riskinin daha düşük olduğu açıklanmıştır (Tamimi and Juweid 2017). Ayrıca 10 yıldan daha az bir sürede anti-inflamatuvar ilaç kullanımının GBM üzerinde koruyucu bir etkisi olduğu bildirilmiştir (Amirian, Ostrom et al. 2019). Sigara, alkol tüketimi ve uyuşturucu kullanımı gibi yaşam tarzı faktörleriyle GBM ilişkisine dair önemli bir kanıt henüz bulunmamıştır.

2.4.2. GBM Patofizyolojisi

Malign hücreler, mutasyonlar nedeniyle kontrolsüz proliferasyon, büyüme ve anjiyogenez gibi özelliklere sahiptirler. GBM'in çok sayıda genetik ve epigenetik mutasyona sahip olduğu bilinmektedir. Klinik seyri boyunca tümör davranışı ve tedavi direncini anlamak için mutasyonların tanımlanması ve sınıflandırılması gerekmektedir. Bu sınıflandırmaya göre GBM tümörlerindeki mutasyonların tanımlanması, birincil ve ikincil tümörler olarak iki kategoriye ayrılmaktadır. Birincil tümörler, hem GBM kök hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu hem de bu mutasyonlara ek farklı mutasyonların görülmesi ile oluşmaktadırlar. İkincil tümörler ise nöral hücrelerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Sağlıklı beyin hücrelerindeki genlerin fizyolojik seviyelerine göre ekspresyonu ve inhibisyonuna neden olan genetik bilgilerdeki değişiklik hem hücresel hem de hücre dışı matris değişikliklerine neden olarak çok sayıda biyokimyasal değişime yol açmaktadır. Bu durum genotipik çeşitliliğe sebep olduğu için glioblastoma tümörleri “multiforme” ismini almıştır.

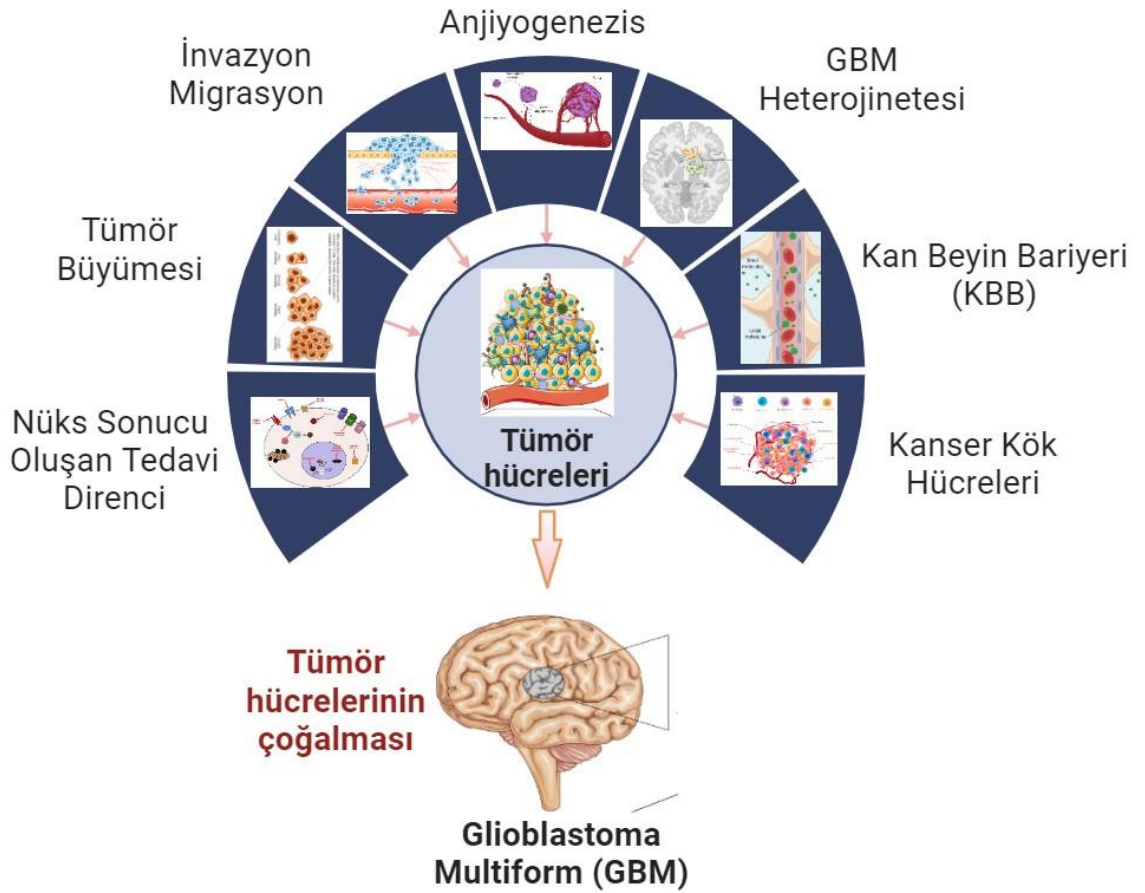
2.5. GBM Tedavisi

Beyin tümörlerinin tedavisi; tümörün tipi, büyüklüğü, derecesi ve sağlam beyin dokusuna zarar verme korkusunun yanı sıra; hastanın yaşı, tıbbi öyküsü, semptomları ve hastada oluşabilecek yan etkilere göre değişim gösterebilmektedir (Owonikoko, Arbiser et al. 2014). Günümüzde klinikte kullanılan standart tedaviyi, cerrahi rezeksiyonun ardından eş zamanlı TMZ ve radyoterapi uygulaması takip etmektedir (Stupp, Hegi et al. 2009, Roskoski 2018) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. GBM hastalarına klinikte uygulanan tedaviler gösterilmektedir. GBM hastalarının tedavisinde cerrahi uygulamayı takiben radyasyon ve kemoterapi uygulanmaktadır (Rosinska and Gavard 2021).

Fakat önerilen tüm bu tedavi seçeneklerine rağmen, uzun süreli TMZ kullanımının fayda sağlamaması ve tümörün nüks etmesi nedeniyle hastalar bu tedaviye zamanla direnç geliştirmektedirler (Bastiancich, Danhier et al. 2016). GBM hastalarının %50'sinden fazlası gelişen bu dirençle birlikte tedaviye etkili yanıtı verememektedir (Dymova, Kuligina et al. 2021). Günümüzde TMZ'ye direnç geliştiren bu hastaların klinikteki tedavi seçenekleri sınırlıdır. Bu nedenle, TMZ direncinin biyolojik temelini araştırılarak bu direncin önüne geçilmesi ve üstesinden gelinmesi için yeni hedeflerin belirlenmesi gerekmektedir (Liu, Guo et al. 2023). Ayrıca GBM tedavisindeki çeşitli engeller hastanın tedavisini kısıtlamaktadır. MSS'deki tümör mikroçevresi, konumu, KBB'nin varlığı, heterojen hücre popülasyonu, invaziv yapı, glioblastoma kök hücreleri, hipoksi ve kemorezistans/radyodirenç; tedavi önündeki en büyük zorlukları oluşturmaktadır (Şekil 2.6) (Jnaidi, Almeida et al. 2020).



Şekil 2.6. GBM hücrelerinin proliferasyonla birlikte tedavide karşılaşılan başlıca zorluklar gösterilmektedir.

2.5.1. GBM Tedavisinde Cerrahi Rezeksiyon

GBM için kullanılan tedavi stratejileri, tümörü çıkarmayı veya küçülterek kanser belirtilerinden bir an önce kurtulmayı amaçlamaktadır (Shah and Kochar 2018). GBM'in maksimum cerrahi rezeksiyonu zordur çünkü bu tümörler sıklıkla invaziftir ve genellikle beynin konuşmayı, motor fonksiyonunu ve duyularını kontrol eden alanlarında oluşmaktadır. Yüksek derecede invazif olması nedeniyle, birincil tümör kitlesinin radikal rezeksiyonu tedavi edici değildir ve invazif tümör hücreleri beyinde kalarak hastalığın ilerlemesine/nüksüne neden olmaktadır (Davis 2016). Ayrıca GBM hücrelerinin çevre yapılarına infiltre olması, anatomik pozisyonu, karmaşık damar sistemi, tümörün yeri ve sağlam beyin dokusuna zarar verme korkusu da tam rezeksiyonu zorlaştırmaktadır (Bastiancich, Da Silva et al. 2020). Tümör rezeksiyonu sonrasında alınamayan mikroskopik bir tümör kalıntısı bile hastalığın rekürrensine neden olabilmektedir. Bu yüzden total cerrahi sonrası kalan tümör hücrelerinin proliferasyonu önlemek için hastalara eş zamanlı kemoterapi ve radyoterapi uygulanmaktadır.

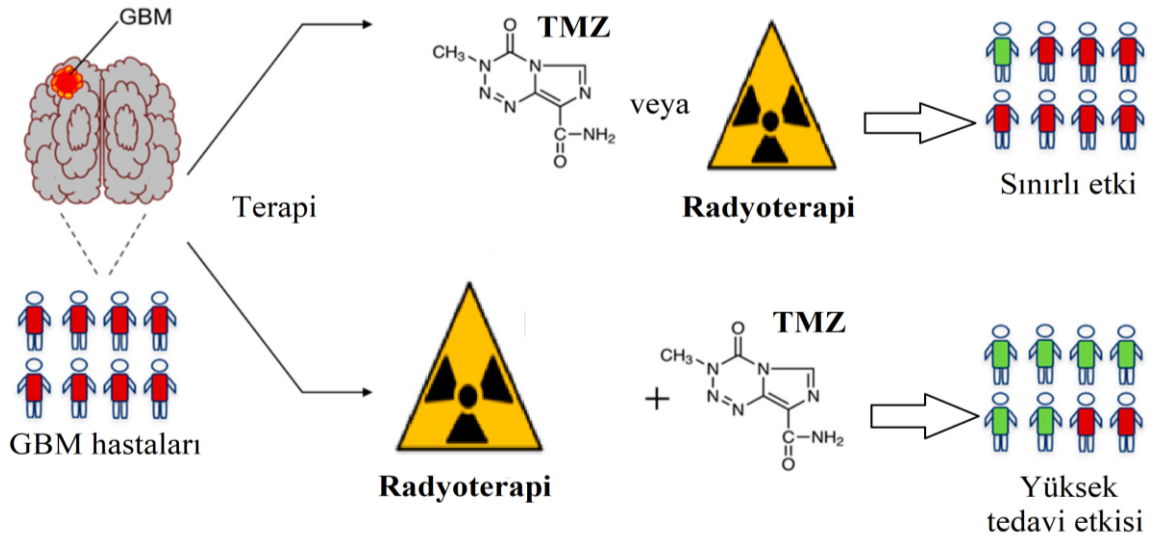
2.5.2. GBM Tedavisinde Radyoterapi

Radyoterapi veya radyasyon tedavisi; hücreyi öldürmek için x, gama ve proton ışınlarını kullanarak beyin tümörünün küçülmesini amaçlamaktadır. Genellikle cerrahi yöntemle çıkarılamayan veya rezeksiyon sonrası tümöral bölgede kalan canlı tümör hücrelerinin ortadan kaldırılması için kullanılmaktadır (Herholz, Langen et al. 2012, Perkins and Liu 2016). Maksimum cerrahi rezeksiyondan sonra hastalara ilk olarak radyoterapi uygulanmaktadır (Minniti, Niyazi et al. 2021). Özellikle GBM'de nüks eden tümör için, ikinci basamak tedavide de önemli bir girişim olarak bilinmektedir. Yeniden ışınlama, nüks eden GBM'de en etkili ve güvenli bir tedavi seçeneğini oluşturmaktadır (Kazmi, Soon et al. 2019).

Radyoterapi tedavisi genellikle eksternal ve internal olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. İnternal radyoterapi tedavilerini, implant tabanlı radyasyon tedavisi veya brakiterapi oluştururken; eksternal radyasyon tedavilerini ise, Franksiyone Stereostatik Radyoterapi (FSR), Stereostatik Radyocerrahi (SR) ve Tüm Beyin Radyoterapisi (TBR) oluşturmaktadır. FSR, her tedavide daha düşük dozda; SR, tek bir tedavide yüksek miktarda (Bunevicius and Sheehan 2021, Minniti, Niyazi et al. 2021) ve TBR ise tüm

beyin dokusuna radyasyon verilmesini içermektedir (Gondi 2021). GBM radyoterapisindeki güncel yaklaşım; günde 2Gy fraksiyonda, haftada 5 gün olmak üzere toplam 60Gy olacak şekilde 6 haftalık bir tedavi planı içermektedir (Alfouzan 2021, Guevara, Cullison et al. 2023).

GBM hastalarında radyoterapi uygulamasının nörolojik yaşam kalitesini artırdığı bilinmektedir (Omay and Vogelbaum 2009). Bu sebeple radyoterapi, glioma için önemli bir terapötik tedavi olarak kabul edilmektedir. Fakat hastaların yaşam kalitesini iyileştirmek için tek başına uygulanan radyoterapi tedavisi yerine kemoterapötik ajan TMZ ile kombine tedavi hastalarda daha uzun sağkalım ile sonuçlanmaktadır (Navarria, Minniti et al. 2019, Gawel, Singh et al. 2022) (Şekil 2.7). Bu bağlamda hastaların sağkalımını artırmak ve tümör nüksünü önlemek için yeni kombine radikal tedavi seçeneklerine ihtiyaç vardır (Wu, Muroski et al. 2019).

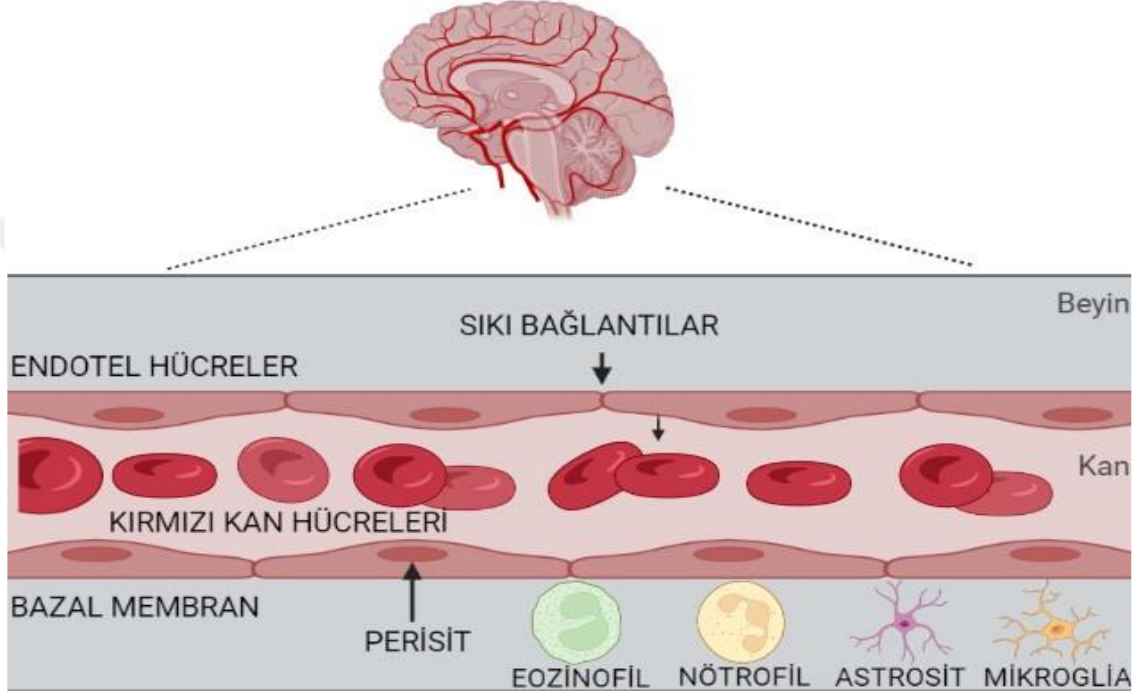


Şekil 2.7. Klinikte uygulanan standart tedavinin (Radyoterapi+TMZ), tek başına uygulanan TMZ veya radyoterapi tedavisine göre daha etkili olduğu görülmektedir (Gawel, Singh et al. 2022).

2.5.3. GBM Tedavisinde Kemoterapi

Kemoterapi, kanser tedavisinin ilk seçenekleri arasında yer almakta olup cerrahi rezeksiyon ve radyoterapi uygulamasının ardından adjuvan tedavi olarak kullanılmaktadır. GBM hastaları için kemoterapi, günümüzde kullanılan en etkili ve standart tedavi olmasına rağmen KBB nedeniyle beyinde etki gösterebilen ilaç sayısı çok azdır (Dymova, Kuligina et al. 2021). KBB, GBM hastalarını tedavi etmek için ilaçların

MSS'ye girmesini önleyen ana engeldir (Wang, Wang et al. 2019). Bu bariyer sıkı bağlantılarla birbirine bağlanan endotel hücrelerden oluşmaktadır. Astrositler, mikrogliya, perisitler, perivasküler makrofajlar gibi nöronlar ve glial hücreler de KBB yapısının oluşumunu desteklemektedirler (Jnaidi, Almeida et al. 2020) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Beyine ilaç girişinin önündeki en büyük engellerden biri olan kan beyin bariyerinin yapısı gösterilmektedir. Bu bariyerin yapısını destekleyen ve korunmasını sağlayan; eozinofil, nötrofil, astrosit ve mikrogliya gibi birçok farklı hücre grupları bulunmaktadır.

Bu seçici geçirgen bariyer, GBM hastaları için tedavi seçeneğini ve etkinliğini azaltmaktadır. İlaçların KBB'den geçebilmeleri için genellikle 500kDa'dan küçük ve lipofilik yapıda olmaları gerekmektedir (Dymova, Kuligina et al. 2021). KBB sadece büyük molekülü ilaçların değil aynı zamanda düşük moleküler ağırlıklı kanser ilaçlarının da beyine nüfuz etmesini kısıtlamaktadır.

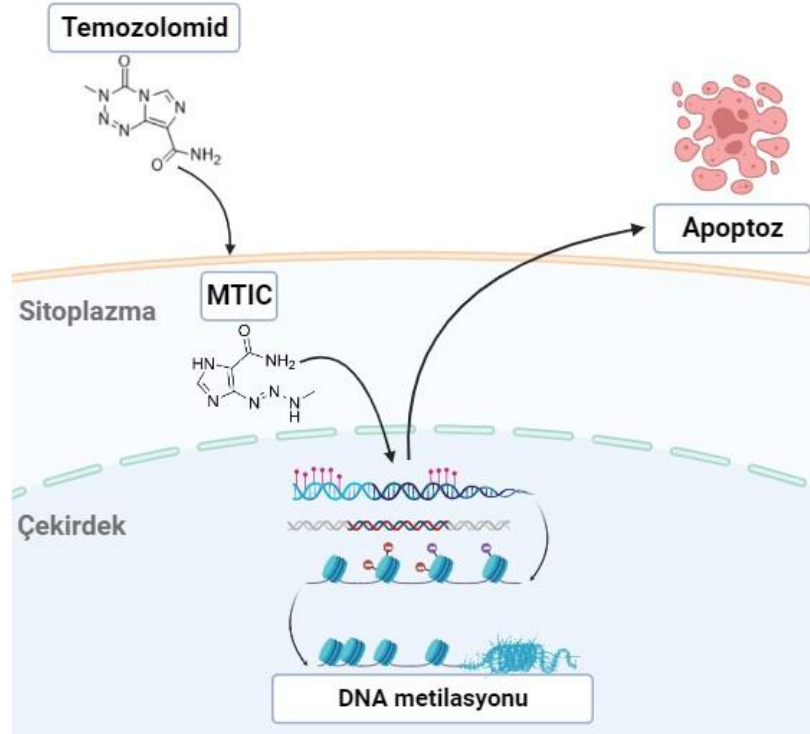
Sonuç olarak, kullanılan kemoterapötik ajanlar beyindeki tümörlü bölgeye etkili bir şekilde ulaşamamaktadır (Schaffenrath, Wyss et al. 2021). Kemoterapi, malign gliomların tedavi sürecinde primer ve nükseden tümörler için kullanılmaktadır. Klinikte GBM tedavisinde kullanılan ve metabolitlerine ayrılarak KBB'den geçen en etkili kemoterapötik ajan ise TMZ'dir.

2.6. Temozolomid (TMZ)

TMZ, 2005 yılında ilk FDA onayından sonra GBM tedavisinde kemoterapötik olarak kullanılan DNA metilleyici/alkilleyici bir ajandır. TMZ, alkilleyici ajan dakarbazinin bir imidazotetrazin türevi ve kanser önleyici ilaç Temodar'ın bir ön ilacıdır. Kimyasal adı 3-metil-4-oksoimidazo[5,1-d] [1,2,3,5] tetrazin-8-karboksamid'dir. Molekül ağırlığı 194kDa boyutunda, lipofilik bir moleküldür ve bu sayede KBB engeline takılmadan metabolitlerine parçalanıp aktif hale gelerek beyine kolaylıkla nüfuz edebilmektedir (Agarwala and Kirkwood 2000, Wesolowski, Rajdev et al. 2010).

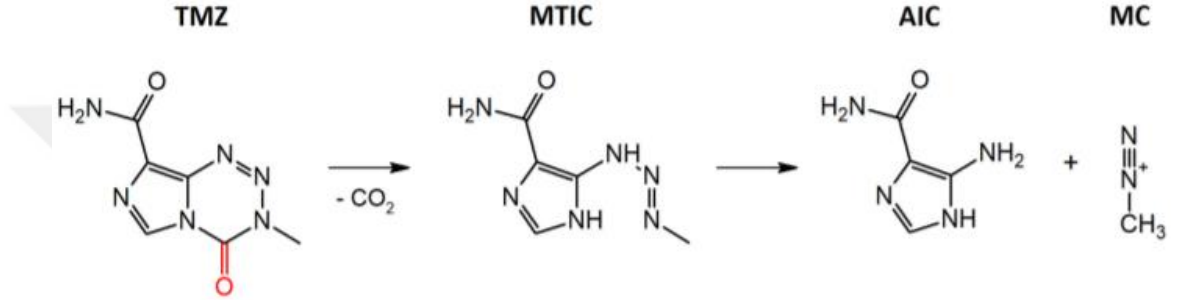
2.6.1. TMZ Aktivasyon/Etki Mekanizması

TMZ, asidik pH'larda sabit formdayken KBB'den geçememektedir. Oral uygulamadan sonra TMZ, gastrointestinal sistemden hızlıca emilerek su içerisinde bazik pH koşullarına ulaştığında heterosiklik halkanın açılmasıyla 5-(3-methyltriazen-1-yl) imidazole-4-carboximide (MTIC) ve CO₂'i serbest bırakmaktadır. MTIC, DNA hasarını tetikleyerek hücre döngüsünün G2/M fazında kalmasına ve hücrenin ölüm yolağına girmesine neden olmaktadır (Hotchkiss and Sampson 2021) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Temozolomid'in aktif formu olan MTIC'ye dönüşmesiyle, tümör hücrelerinin apoptoza uğrayışı gösterilmektedir (MTIC, 5-(3-methyltriazen-1-yl) imidazole-4-carboximide).

MTIC, hızlıca yüksek derecede reaktif metildiazonyum katyonu ve 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AIC)'e yıkılarak KBB'den etkili bir şekilde geçip tümöre ulaşmaktadır (Şekil 2.10) (Ramalho, Andrade et al. 2019). Aktif metilleyici ajan olan metildiazonyum katyonları DNA'daki nükleotidlere nükleofilik atakla metil grubunu transfer ederek metillenmiş DNA eklentileri oluşturmaktadır (Karachi, Dastmalchi et al. 2018, Hotchkiss and Sampson 2021).



Şekil 2.10. TMZ aktivasyonu ve sitotoksik etkisi gösterilmektedir. TMZ sulu çözeltide bazik değere ulaşp MTIC, AIC ve MC'ye hidrolize olmaktadır. Bunun sonucunda da TMZ, kan beyin bariyerinden rahatlıkla geçebilmektedir (Ramalho, Andrade et al. 2019) (TMZ, Temozolomid; MTIC, 5-(3-methyltriazen-1-yl) imidazole-4-carboximide; AIC, 5-aminoimidazole-4 carboxamide; MC, metildiazonyum iyonu).

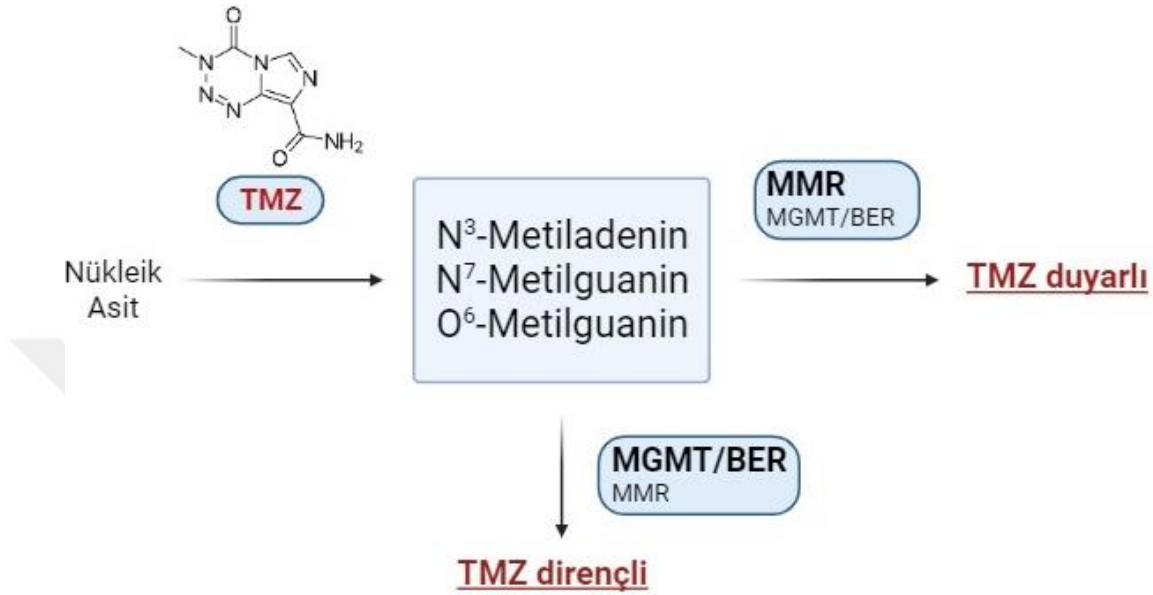
2.6.2. TMZ'ye Karşı Direnç Oluşumu

TMZ, GBM tedavisinde kullanılan en etkili kemoterapötik ajan olmasına rağmen hastalar zamanla bu tedaviye zamanla direnç geliştirmektedirler. Hastaların, TMZ'ye yaygın olarak maruz kalması ve GBM'in mutasyona eğilimli yapısından dolayı da bu öldürücü tümörlerin TMZ'ye direnç geliştirmesi oldukça yaygın olarak karşımıza çıkmaktadır (Jiapaer, Furuta et al. 2018, Singh, Miner et al. 2021). Bu durum GBM tedavisinde aşılması gereken önemli bir klinik engeli teşkil etmektedir. Bu nedenle direnci yönlendiren heterojen hücre popülasyonları ve tümör gelişiminin altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılması/aydınlatılması büyük önem taşımaktadır.

2.7. DNA Onarımı ve TMZ Direnç Mekanizması

TMZ direnç mekanizmasının açığa kavuşturulması, ilaç etkinliğini artırarak yeni tedavi seçenekleri için adım atılmasında son derece önemlidir. Literatürde yer alan mevcut araştırmalar doğrultusunda; TMZ direncinin hem Metilguanin-DNA Metiltransferaz (MGMT), Yanlış Eşleşme Onarımı (MMR) ve Baz Eksizyon Onarımı (BER) gibi DNA onarım mekanizmaları hem de otofaji ve gliom kök hücrelerinin bir sonucu olarak ortaya

çıktığı bilinmektedir (Şekil 2.11) (Wesolowski, Rajdev et al. 2010, Lee 2016, Singh, Miner et al. 2021).



Şekil 2.11. TMZ direncinin mekanizması gösterilmektedir. Tümör hücrelerinde, MGMT ve BER aktivasyonu TMZ direncine neden olurken; MMR aktivasyonu ise TMZ tedavisini etkin kılmaktadır (Lee 2016) (TMZ, Temozolomid; MGMT, Metilguanin-DNA Metiltransferaz; MMR, Yanlış Eşleşme Onarımı; BER, Baz Eksizyon Onarımı).

Normal hücresel fonksiyon için genetik kodun korunmasını sağlayan çok sayıda DNA tamir mekanizması vardır. Bu tamir mekanizmaları yetersiz kaldığında hücre döngüsü kontrol noktaları, bu döngünün durmasına yol açarak apoptoza neden olmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan birçok alkilleyici ajan, DNA hasarı oluşturarak hücre ölümünü sağlamaktadır. DNA tamir yolları ise bu tedavide kullanılan ilaçlara karşı direnç geliştirmektedirler.

2.7.1. Metilguanin-DNA Metiltransferaz (MGMT)

TMZ gibi alkilleyici ajanlar DNA’da çift sarmal kırıkları oluşturarak hücrenin ölüm yolağına girmesine neden olmaktadır. Alkilleyicinin yarattığı bu hasar ise MGMT tarafından onarılmaktadır. MGMT, DNA hasarını tamir eden bir enzimdir ve TMZ’nin neden olduğu DNA hasarını nötralize ederek TMZ direncinin artmasına neden olmaktadır (Singh, Miner et al. 2021). TMZ tedavi koşulları altında, MGMT 0-6 metilguanin’deki metil grubunu kaldırarak ilaca bağlı DNA hasarını nötralize etmektedir. Bu durum da TMZ’nin genel etkinliğini azaltarak TMZ direncinin artmasına neden olmaktadır. MGMT

metilasyonu, GBM tedavisinde direnci yönlendirebilen nadir moleküler belirteçlerden biri olmasına rağmen bu belirtecin mekanizması hakkındaki bilgilerimiz hala kısıtlıdır (Rao, Quddusi et al. 2018). MGMT promotörünün hipermetilasyonu, MGMT protein ekspresyonunun azalmasına neden olarak GBM hastalarında sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (Wu, Li et al. 2021). Buna karşılık metillenmemiş tümörler (artmış MGMT aktivitesi ile) genellikle TMZ tedavisine karşı direnç geliştirmektedir. 75 yaş üstü hastalarda radyoterapi ve eş zamanlı kemoterapi yerine, MGMT metile olmayan (MGMT aktive olan) hastalarda yalnızca radyoterapi; MGMT metile olan hastalarda ise radyoterapi ve TMZ tedavisi önerilmektedir. Çünkü artmış MGMT aktivasyonu, TMZ tedavisinde dirence sebep olmakta ve direnç geliştiği bilinen bu hastalarda, tedavi etkinliğini kaybetmektedir.

2.7.2. Yanlış Eşleşme Onarımı (MMR)

MMR, yanlış baz eşleşmesini düzelterek çalışan bir DNA onarım mekanizmasıdır. Normal koşullar altında, MMR aktive olup yeni sentezlenen DNA zincirinde kırılmalar oluşturmaktadır. Bu işlem DNA sentezi sırasında gerçekleşir. TMZ'nin neden olduğu DNA hasarını ortadan kaldırmak için geri dönüşü olmayan DNA kırıkları oluşturmakta ve tümör hücrelerinin apoptozuna neden olmaktadır (Higuchi, Nagashima et al. 2020). MMR sisteminin inhibe edilmesi sadece mutasyon riskini artırmakla kalmayıp aynı zamanda apoptozu azaltarak, tümör hücrelerinin sağkalımını da artırmaktadır. Bu yüzden MMR sisteminin TMZ direncini önlemesi için aktif halde kalması gerekmektedir (Yoshimoto, Mizoguchi et al. 2012). Bu mekanizma TMZ'nin neden olduğu sitotoksosite için sağlam MMR mekanizmalarına olan ihtiyacı ortaya koymaktadır.

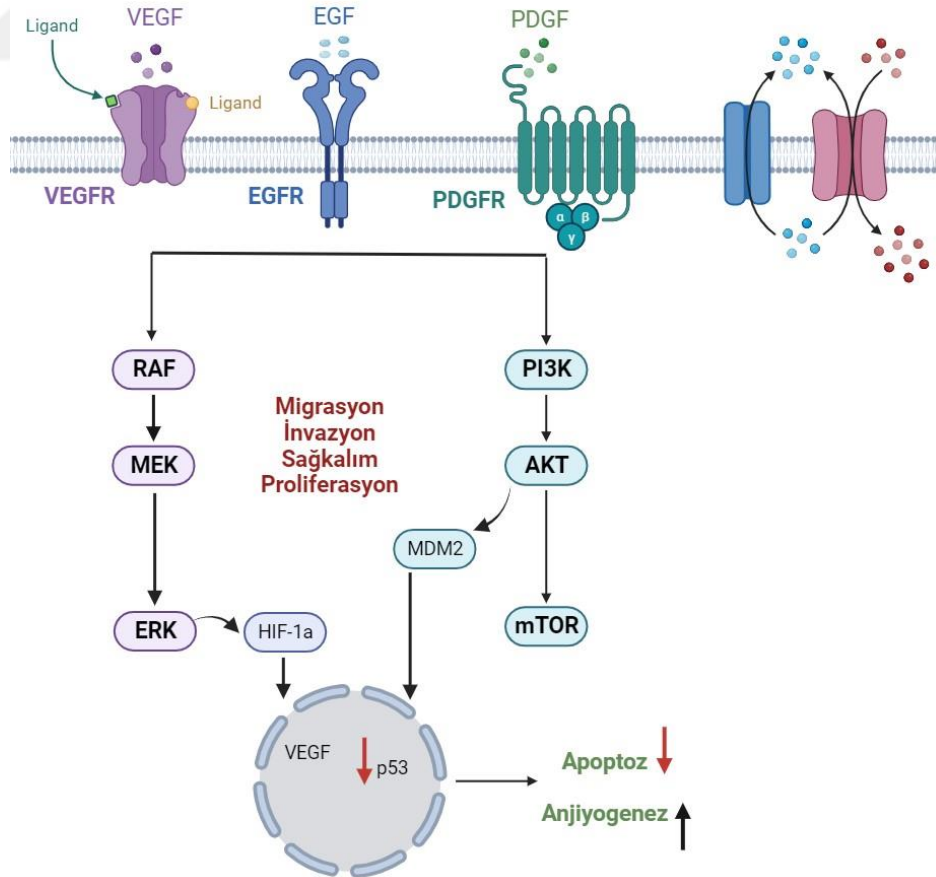
2.7.3. Baz Eksizyon Onarımı (BER)

BER, tek nükleotid modifikasyonlarının onarılmasından sorumlu DNA onarım mekanizmasıdır. TMZ tarafından indüklenen N⁷-guanin ve N³-adenin metilasyonunun büyük çoğunluğu BER mekanizmaları tarafından tanınmakta ve hızlıca onarılmaktadır. BER yolunda yer alan birkaç protein, TMZ'ye karşı direnci artırmakla ilişkilendirilmiştir (Higuchi, Nagashima et al. 2020). BER mekanizmasında yer alan PARP1 (poli ADP-Riboz polimeraz 1), ökaryot hücrelerde bol miktarda bulunan ve DNA hasarına cevap olarak aktifleşen bir proteindir (Wu, Li et al. 2021). PARP1 tek zincir DNA kırıklarını,

BER mekanizmasıyla onarmakta ve DNA tamiri, apoptoz, hücre regülasyonu, bölünmesi ve farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır.

2.8. Ras/MAPK/ERK Sinyal Yolağı

TMZ direncinin en temel sebebi, spesifik moleküler yolların düzensizliği olarak bilinmektedir (Singh, Miner et al. 2021). Reseptör tirozin kinazlar (RTK); büyüme faktörleri, hormonlar, sitokinler, nörotrofik faktörler ve diğer hücre dışı sinyal molekülleri için reseptör görevi gören hücre yüzey reseptörleri ailesidir. Ligandlar tarafından aktive edilen RTK'ler, Ras/MAPK/ERK ve Ras/PI3K/Akt olmak üzere iki yolak üzerinden sinyal vermektedir (Pearson and Regad 2017) (Şekil 2.12). Bu yollar, hücre proliferasyonu, farklılaşması, sağkalımı ve anjiyogenezin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar (Lemmon and Schlessinger 2010). Özellikle PI3K/Akt yolağı, RTK'lerin yaygın mutasyonu ve amplifikasyonu nedeniyle GBM'de kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır (Pearson and Regad 2017).

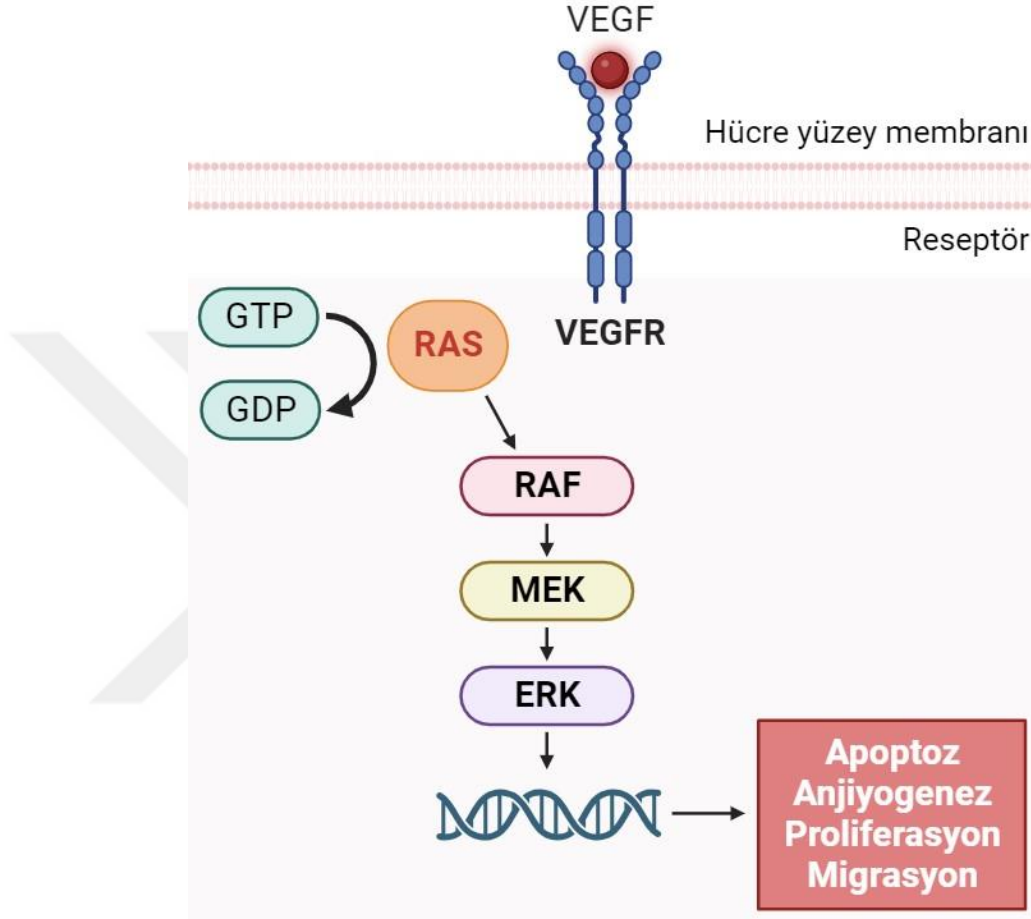


Şekil 2.12. RTK aracılı sinyal yolları ve tümör hücrelerinde meydana gelen değişimler gösterilmektedir. Siyah oklar tümör hücrelerindeki aktivasyonu, kırmızı oklar ise inhibisyonu göstermektedir. RTK'ler, Ras/MEK/ERK ve PI3K/Akt/mTOR olmak üzere iki yolak üzerinden sinyal vermektedir. Bu yollar tümör hücrelerinde aşırı ekspre edilmektedir ve bunun sonucunda tümör hücreleri proliferasyon ve invazyona yönelmektedirler (Pearson and Regad 2017) (RTK, Reseptör Tirozin Kinaz).

RTK ailesi, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri (EGFR), Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörleri (FGFR), İnsülin ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörleri (IGFR), Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörleri (PDGFR), Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörleri (VEGFR), Hepatosit Büyüme Faktörü Reseptörleri (HGFR) ve proto-onkogen c-KIT'i içeren birkaç alt aileden oluşmaktadır (Li and Hristova 2006, Hubbard and Miller 2007). RTK'ler; hücre sağkalımı, çoğalması, farklılaşması ve migrasyonu ile ilgili anahtar sinyal yollarına aracılık etmektedirler (Lemmon and Schlessinger 2010). Özellikle tümörogenik yanıtlarda RTK'lerin etkilendiği ve alt yollarında birçok mekanizmayı çalıştırdığı bilinmektedir. Bunlardan her biri ayrı bir öneme sahipken özellikle tümör anjiyogenezini tetikleyerek, tümörü migrasyon ve invazyona yönlendiren; VEGF ve Raf/MEK/ERK sinyal yolağı ayrı bir öneme sahiptir.

RTK'ler, Raf/MEK/ERK sinyal yolağı ile tümör hücresinin proliferasyon ve migrasyonuna destek olmaktadır. Özellikle tümör hücrelerinde aktif çalışan bu yolak, hücre yüzey reseptörleri tarafından aktive edilmektedir. Reseptör ligand etkileşimi sonucunda GTP'nin GDP'ye dönüşmesi ile Ras ve devamında Ras aracılı MAP kinazlar aktive olmaktadır. MAP kinazlar Raf/MEK/ERK sinyalizasyonunu başlatarak hücre proliferasyonu, anjiyogenez, migrasyon ve sağkalım gibi birçok hücrel aktivasyonu düzenleyerek; tümör oluşumunu tetiklemekte ve HIF-1 α 'nın da aktivasyonuna yol açmaktadır (Kolch 2000, Lim, Lee et al. 2004) (Şekil 2.13). Burada tümör hücreleri ortamdaki oksijeni kullandıkları için ortam çoğunlukla hipoksik kalmaktadır. Bu durum, hipoksi ile indüklenebilir transkripsiyon faktörleri HIF1 α ve HIF1 β 'nin sitoplazmadan nükleusa girmesini sağlamakta ve VEGF'in aktivasyonunu sağlamaktadır. VEGF'in aktive olması, ortamda anjiyogenezin tetiklenmesine sebep olmaktadır (Wainwright, Chang et al. 2014). Bu artık bilinen bir gerçek olup, tümör hücresinin oksijenden yoksun kalarak ortamın hipoksik hale gelmesi anjiyogenezini daha da tetiklemekte ve yeni oluşan kan damarlarıyla oksijen açığı hızla kapatılmaktadır. Bu yolağın aktif bir şekilde devamlı

çalışması tümörün büyüyüp gelişmesinin yanı sıra; tümörün invazyon ve metastaza gitmesine neden olmaktadır.

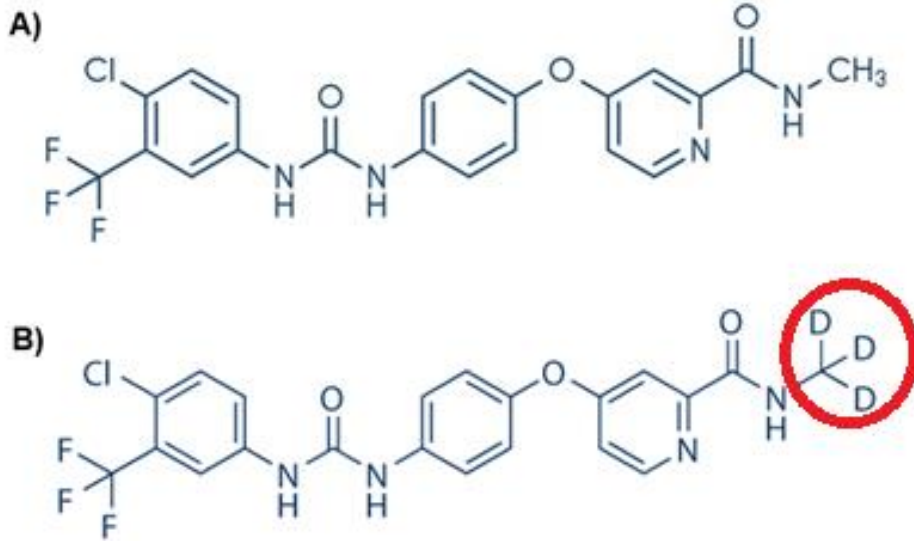


Şekil 2.13. Raf/MEK/ERK sinyal yolağı mekanizması ile meydana gelen hücresel değişimler gösterilmektedir. Reseptör ligand etkileşimi sonucu, GTP ve GDP'nin yer değiştirmesi ile bu sinyal yolağı tümör hücrelerinde aktive olmaktadır. Bunun sonucunda da tümör hücrelerinde; anjiyogenez, proliferasyon ve apoptoz gibi çeşitli hücresel değişimler meydana gelmektedir (Kolch 2000).

Literatürde yer alan bu bilgiler doğrultusunda, tümörün gelişmesinde ve metastazında etkin rol oynayan yolakların inhibe edilmesi ve TMZ direncinin kırılması için yeni terapötik yaklaşımlarla birlikte kombine tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle projemiz GBM üzerinde etkinliği hiç gösterilmemiş bir inhibitör olan DNF'nin, tümör hücrelerinin sağkalımı, apoptozu ve Raf/MEK/ERK sinyal yolağındaki etkisinin değerlendirilmesi üzerine kurgulanmıştır.

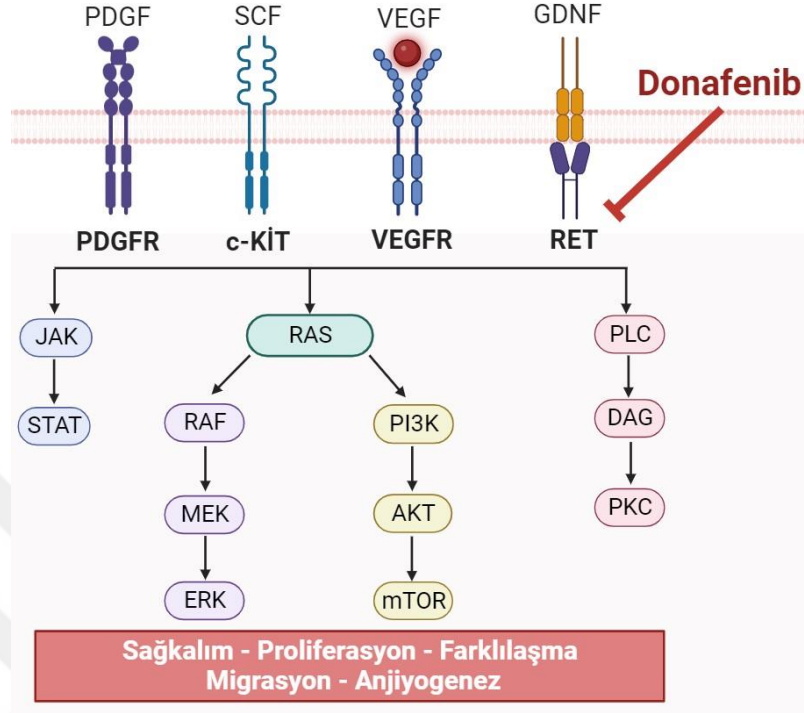
2.9. Donafenib (DNF)

Küçük molekülü multikinaz inhibitörleri de dahil olmak üzere hedefe yönelik tedaviler, birçok kanserde hayatta kalma oranlarını artırmaktadır (Wainwright, Chang et al. 2014, Seebacher, Stacy et al. 2019). DNF, oral yolla alınan, küçük molekülü yeni bir multikinaz inhibitörüdür. Bu inhibitör, hepatosellüler karsinom, kolorektal ve tiroit kanserlerinin tedavisi için Suzhou Zelgen Biopharmaceuticals Co., Ltd. (Zelgen) tarafından geliştirilmiştir (Li, Qiu et al. 2020, Keam and Duggan 2021, Yang, Zhu et al. 2021). DNF, moleküler stabiliteyi artırmak için Sorafenib'e, tridöterasyonlu bir N-metil grubu ekleyerek geliştirilen Sorafenib'in bir döteryum formudur (Şekil 2.14) (Li, Qiu et al. 2020).



Şekil 2.14. Sorafenib (A) ve DNF'nin (B) moleküler yapıları gösterilmektedir. Sorafenib'e tridöterasyonlu bir N-metil grubu eklenerek DNF geliştirilmiştir (DNF, Donafenib).

Döterasyonun, ilaç molekülünün stabilitesini iyileştirerek daha uzun bir yarı ömre, azaltılmış sistemik klirens ve daha uzun süreli sistemik maruziyete yol açtığı bilinmektedir (Nelson and Trager 2003, Li, Qiu et al. 2020). Bunun sonucunda da daha düşük doz ile daha etkin sonuçlar elde edilebilmektedir (Zhong, Hou et al. 2019). DNF; VEGFR, PDGFR ve serin/treonin kinazı baskılayıp tümör hücre proliferasyonu ve anjiyogenezi inhibe ederek anti-neoplastik etki göstermektedir (Niu, Yi et al. 2021, Qin, Bi et al. 2021) (Şekil 2.15).



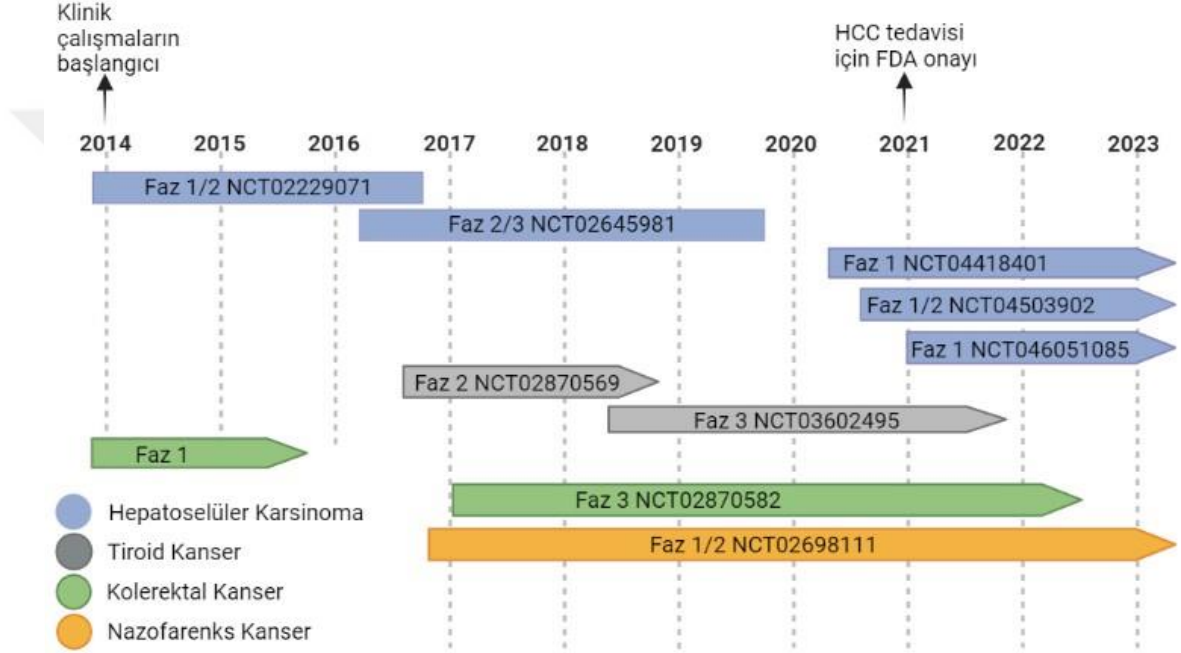
Şekil 2.15. DNF'nin inhibe ettiği sinyal yollarını gösterilmektedir. DNF; PDGFR, VEGFR ve çeşitli tirozin kinazların aktivitesini inhibe eden, yeni bir multikinaz inhibitörüdür. Bu sayede tümör hücre proliferasyonu ve anjiyogenezini baskılamaktadır (Qin, Bi et al. 2021).

DNF'nin farklı kanser hücre hatlarına ait *in vitro* çalışmalar sonucunda da anti-proliferatif özellikleri olduğu tespit edilmiştir. Bilinen hücre hatlarındaki IC_{50} değerleri aşağıdaki tabloda gösterilmektedir (Tablo 2.1) (Li, Qiu et al. 2020).

Tablo 2.1. Kanser hücre hatlarında DNF'nin proliferatif inhibisyonu gösterilmektedir (Li, Qiu et al. 2020).

Hücre Hattı	IC_{50} (μM)
786-0	11.2±1.8
CAKI	11.0±1.0
HCT-116	13.7±0.6
HT-29	18.3±3.2
MCF-7	19.3±1.0
MDA-MDB-231	11.8±2.1
MDA-MDB-468	9.8±1.2
SGC-7901	23.7±1.5
SMMC-7721	7.6±1.4
Bel-7402	7.9±0.7
A375	9.4±1.0
PC-3	10.3±2.2
Bxpc-3	11.5±2.7
A549	7.6±0.8
WI38	14.7±2.5

DNF'nin hepatosellüler karsinomlu hastalarda genel sağkalımı artırdığı ve ek olarak kolorektal, tiroid ve nazofarenks kanserlerinde de klinik denemelerinin hala devam ettiği bilinmektedir (Li, Qiu et al. 2020, Keam and Duggan 2021, Yang, Zhu et al. 2021) (Şekil 2.16). Ayrıca çeşitli solid tümör çalışmalarında, anti-PD1/PD-L1 antikorları ile kombinasyon halinde ve tekrarlayan akut miyeloid lösemide kemoterapi ile kombinasyon halinde de araştırılmaktadır.



Şekil 2.16. DNF'nin devam eden klinik faz çalışmaları gösterilmektedir. DNF'nin klinik araştırmaları ilk olarak 2014 yılında başlamış ve 2021 yılında Çin'de hepatosellüler karsinomlu hastaların tedavisi için onay almıştır. Tiroid, kolorektal ve nazofarenks kanserlerinde de klinik çalışmaları hala devam etmektedir (Keam and Duggan 2021).

Şu ana kadar yaptığımız literatür araştırmalarında; DNF'nin çeşitli kanser hücre hatlarında, farklı yollaklarda *in vitro* ve *in vivo* etkisi gösterilmiş olmasına rağmen TMZ dirençli ve duyarlı GBM hücre hatlarındaki etkisinin değerlendirilmediği ve bununla ilgili bir bilginin literatürde henüz yer almadığı görülmektedir. Bu sebeple çalışmamız; “Radyoterapi ile eş zamanlı TMZ uygulanmış GBM hücrelerine DNF uygulamasının; Raf/MEK/ERK yolağı üzerinden tümör hücre proliferasyonunu baskılayarak, tümör hücrelerini apoptoza yönlendirir” hipotezinden yola çıkarak kurgulanmıştır. Bu bağlamda, DNF'nin TMZ dirençli (T98G) ve duyarlı (U87MG) GBM hücre hatlarında, Raf/MEK/ERK sinyal yolağına etkisinin olup olmadığı, buna ek tümör hücrelerinin apoptoz mekanizmasını kullanıp kullanmadığı da ilk kez değerlendirildi.

Çalışmamızda DNF'nin;

- 1) Tedaviye başlanmadan önceki koşullarda GBM hücrelerindeki etkinliğinin,
- 2) TMZ ve radyoterapi uygulanan koşullarda GBM hücrelerindeki etkinliğinin,
- 3) TMZ dirençli hale gelmiş ve klinikte tedavi seçeneği kalmamış hastaları taklit etmek amaçlı, TMZ dirençli hücrelerdeki etkinliğinin *in vitro* ortamda değerlendirilmesi planlanmaktadır. Bu konuya, literatürde ilk kez açıklık getirileceğinden; projemizden elde edilen her verinin yeni *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara yol açabileceği kanaatindeyiz.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

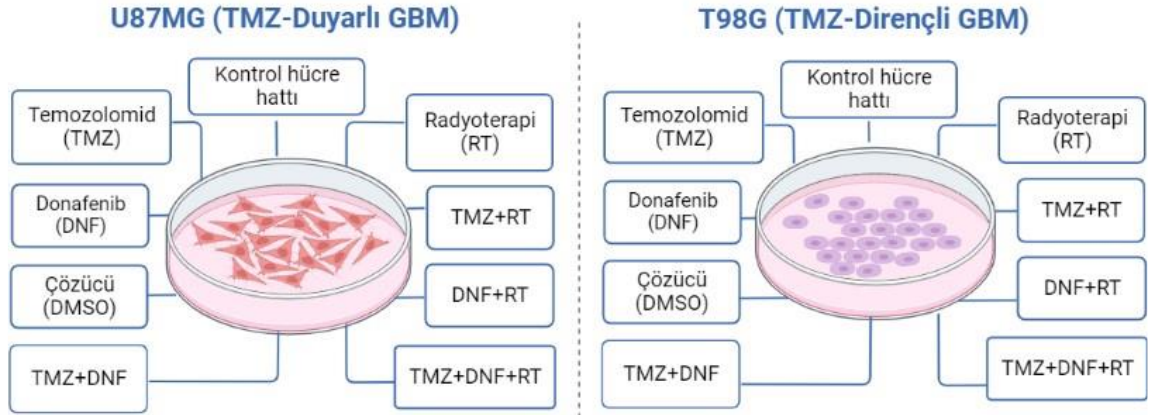
Deneylerimiz Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji, Tıbbi Biyoteknoloji ve Radyasyon Onkolojisi Ana Bilim Dalları laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Projenin tüm iş paketleri *in vitro* basamaklardan oluşmaktadır.

3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Günümüzde GBM için tedavi seçeneği, hastalara tanı konulduktan hemen sonra radyoterapi ve TMZ tedavisinin uygulanmasıdır. Ancak hücreler bir süre sonra TMZ'ye direnç geliştirdikleri için tedavi zorlaşmaktadır. Planlamış olduğumuz projemizde, klinikte hem daha yeni tanı almış hem de tedavi görüp bu tedaviye direnç geliştirmiş hastaları göz önünde bulundurarak deney grupları oluşturuldu. Projemizin deney grupları arasında, hem TMZ duyarlı GBM insan hücre hattı U87MG (ATCC; #HTB-14) hem de TMZ tedavisine zamanla direnç geliştirmiş GBM insan hücre hattı olan T98G (ATCC; #CRL-1690) yer almaktadır. Çalışmamızda, insan glioblastoma hücre hatları seçildi ve deneylerimiz bu hücre hatları ile tamamlandı. Deney gruplarımız; herhangi bir uygulamanın yapılmadığı kontrol grubu ve TMZ ile DNF'nin hem bireysel hem de kombine uygulandığı gruplardan oluşmaktadır. Asıl etkisini değerlendirmek istediğimiz gruplar ise DNF'nin bireysel ve klinikteki tedaviler ile kombine uygulandığı grupları içermektedir. Literatürde bu konuyla ilgili bir bilgi yer almadığı için bu gruplar projemizin özgün yanını oluşturmaktadır. Planlanan deney gruplarımız ise aşağıda belirtildiği şekilde tasarlandı (Şekil 3.1).

Deney Grupları



Şekil 3.1. U87MG ve T98G insan GBM hücre hatlarında gerçekleştirilen deney grupları gösterilmektedir.

3.2. Hücrelerin Deneye Hazır Hale Getirilmesi-Pasajlanması

Tez projesi kapsamında model olarak; insan Glioblastoma U87MG ve T98G hücre hatları (ATCC; #HTB-14); %10 FBS, %2 glutamin ve %1 Penisilin/Streptomisin (PS) (Thermo Fisher; #15140122) ile desteklenmiş DMEM (Thermo; #11965092) besiyerinde çoğaltılarak, %5 CO₂'li ve 37°C ile sabitlenmiş steril etüvde inkübe edildi. Petriye ekilen hücreler %70 konfluensiye ulaştınca besiyeri uzaklaştırılarak hücrelerin tripsinizasyonu için petriye 1.5-2ml %0,25 Tripsin ile %0,03 EDTA solüsyonu içeren Tripsin-EDTA eklendi ve 5 dakika boyunca inkübatörde hücrelerin kalkması için bekletildi. Bu işlem sonrasında petri yüzeyindeki hücrelerin kalktığından emin olmak için mikroskopla kontrol edildi. Tripsin-EDTA'nın enzimatik aktivasyonunu inhibe etmek için petrilere tripsinin en az iki katı olacak şekilde 3-4ml DMEM besiyeri eklendi. Petride yüzer halde bulunan hücreler, hücre kaybı olmaması adına pipetaj yapılarak falkonda toplandı. Falkona toplanan hücreler, 1500rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Hücre yoğunluğuna bağlı ATCC'nin önerdiği şekilde 1:2 veya 1:3 oranında pasajlandı.

3.3. Hücrelerin Dondurulması

Olası bir kontaminasyon durumunda deney tekrarı sağlayabilmek adına hücreler, %95 DMEM besiyeri ve %5 DMSO içerecek şekilde hazırlanan dondurma besiyeri içerisinde kriyoprezervasyon işlemlerine tabi tutuldu. 50ml'lik falkon içerisine 47,5ml DMEM ve 2,5ml DMSO eklendi. Falkon folyo ile sarılarak dondurma işlemi karanlıkta gerçekleştirildi ve artan solüsyon diğer deneylerde kullanabilmek adına +4°C'de saklandı.

Hücreler kısa süreli -80°C derin dondurucuda, uzun vadede ise sıvı azot tankları içerisinde muhafaza edildi.

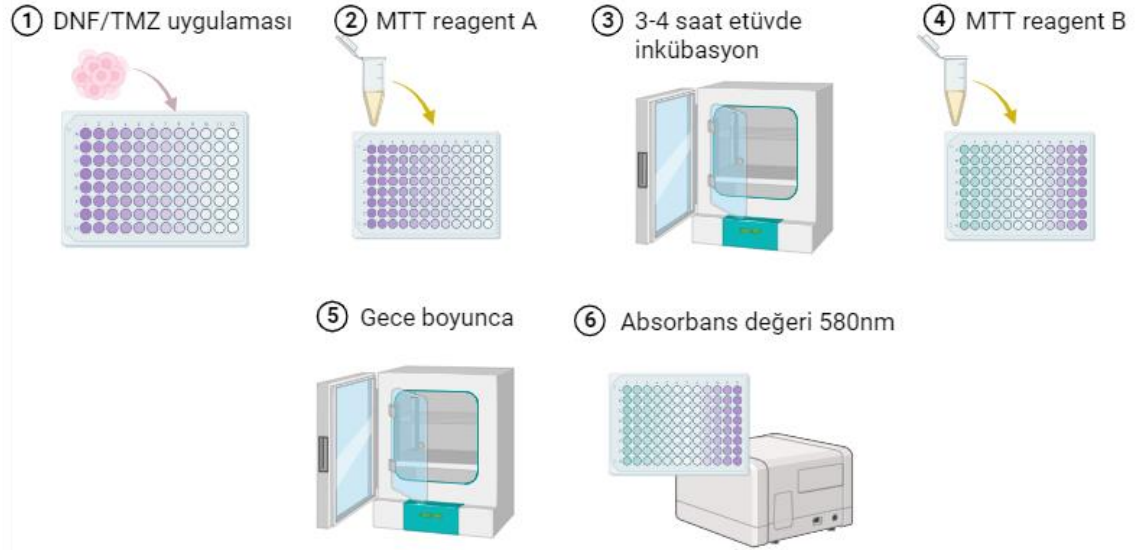
3.4.TMZ'nin Hazırlanması ve Deney Gruplarına Uygulanması

TMZ'nin (Sigma; #T2577) deney gruplarına uygulanabilmesi için 10mM ana stok konsantrasyonu hazırlandı. TMZ, 10mg tartılarak 15ml'lik falkona alındı ve çözücüsü olan DMSO'dan 5ml üzerine ilave edip çözdürme işlemi gerçekleştirildi. TMZ'nin etkin dozunu belirlemek için U87MG ve T98G GBM hücreleri, her kuyucuğa 5.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril kültür tabaklarına ekildi ve yapışmaları için 24 saat etüvde inkübe edildi. Takiben TMZ'nin tümör hücrelerindeki etkinliğini belirleyebilmek için U87MG ve T98G hücre hatlarında, literatüre göre farklı konsantrasyonlarda TMZ dozları (800-400-200-100-50-25-12.5-6.25-3.125µM) belirlenerek deney grupları oluşturuldu (Tablo 3.1). Deney grupları arasına pozitif kontrol grubu U87MG ve T98G hücreleri; TMZ'nin çözücüsünün negatif etkilerini ortadan kaldırmak için de DMSO eklendi. Tüm deney grupları için ilaç uygulamasının hemen ardından başlangıçtaki hücre sayısını belirlemek için başlangıç zamanı (Time Zero) okuması yapıldı.

Tablo 3.1. U87MG ve T98G hücrelerine TMZ uygulanması için oluşturulan deney grupları gösterilmektedir.

TMZ'nin U87MG ve T98G hücrelerine uygulandığı dozlar ve deney grupları		
1	Kontrol	Sadece tümör hücrelerini içeren, hiçbir şey uygulanmamış grup.
2	t0	Kontrol grubuna kıyasla başlangıçtaki hücre sayısını belirleyen grup.
3	Çözücü	TMZ'nin çözücü olan DMSO'yu içeren grup.
4	800µM	TMZ'nin 800µM dozda hücrelere uygulandığı grup.
5	400µM	TMZ'nin 400µM dozda hücrelere uygulandığı grup.
6	200µM	TMZ'nin 200µM dozda hücrelere uygulandığı grup.
7	100µM	TMZ'nin 100µM dozda hücrelere uygulandığı grup.
8	50µM	TMZ'nin 50µM dozda hücrelere uygulandığı grup.
9	25µM	TMZ'nin 25µM dozda hücrelere uygulandığı grup.
10	12.5µM	TMZ'nin 12.5µM dozda hücrelere uygulandığı grup.
11	6.25µM	TMZ'nin 6.25µM dozda hücrelere uygulandığı grup.
12	3.15µM	TMZ'nin 3.15µM dozda hücrelere uygulandığı grup.

Besiyeri içerisindeki serum proteinlerinin ilaçla etkileşimini en aza indirmek için TMZ, %1 FBS içeren DMEM besiyerinde hazırlandı. TMZ'nin en yüksek dozu 800µM (tek doz uygulamasının iki katı), her seferinde ½ kez seyreltilerek seri dilüsyon halinde %1 FBS içeren DMEM besiyerinde hazırlandı. 96 kuyucuklu steril kültür tabaklarına en düşük ilaç konsantrasyonundan başlanarak uygulandı. İlaç uygulamasını takiben hücreler 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda inkübe edildi. Her bir inkübasyon süresi sonunda deney MTT (Roche; #11465007001) ile sonlandırılıp, TMZ'nin tümör hücrelerinin büyümesi üzerine etkisi değerlendirildi. Deneyde kullanılan MTT kitinin prosedürüne göre, 96 kuyucuklu steril kültür tabaklarına ekilmiş hücrelere 10µl MTT solüsyonu uygulandı ve 4 saat etüvde inkübe edildikten sonra hücrelerin üzerine 100µl solübilizasyon tamponu eklenerek bir gece etüvde bekletildi (Şekil 3.2). Ardından deney sonlandırılarak protokolde belirtildiği gibi örneklerin absorbans değerleri ELISA kit okuyucuda 580nm'de okundu. Her biri kendi içinde 8 tekrarlı olmak üzere birbirinden bağımsız 3 farklı deney sonucu istatistiksel olarak değerlendirildi ve kontrol grubu (ilaç uygulanmamış grup) ile karşılaştırılarak yorumlandı.



Şekil 3.2. MTT kitinin protokolüne göre doz taramaları için deney aşamaları gösterilmektedir. DNF/TMZ uygulamasından sonra, MTT reagent A hücrelere eklendi ve 3-4 saat etüvde inkübe edildi. Ardından MTT reagent B solüsyonu eklenip bir gece etüvde inkübe edilerek ELISA kit okuyucuda 580nm'de okundu.

3.5. DNF'nin Hazırlanması ve Deney Gruplarına Uygulanması

DNF'nin (Selleckhem; #S9621), U87MG ve T98G GBM hücrelerinde IC₅₀ değerini belirten *in vitro* bir çalışma olmadığı için hücrelerin proliferasyonunu belirlemek adına

MTT kiti ile doz taraması yapıldı. DNF, alıcı firmanın önerdiği şekilde 1mg tartılıp üzerine çözücüsü olan DMSO'dan 2.13ml ilave edildi ve 1mM ana stok konsantrasyonu hazırlandı. Ardından hazırlanan DNF 15ml'lik falkonlarda %1 FBS'li DMEM besiyeri içerisinde 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3 ve 0.15µM konsantrasyonlarında hazırlandı. DNF'nin en yüksek dozu 40µM (tek doz uygulamasının iki katı), her seferinde ½ kez seyreltme yapıp seri dilüsyon halinde %1 FBS içeren DMEM besiyerinde hazırlanarak deney için hazır hale getirildi. Ek olarak DNF, DMSO'da çözündüğü için deney grupları arasına DMSO'nun olası etkisini ortadan kaldırmak için çözücü grubu da eklendi. Bu grup DNF'nin en yüksek konsantrasyonuna göre hazırlandı.

Tablo 3.2. U87MG ve T8G hücrelerine DNF uygulanması ile belirlenen deney grupları gösterilmektedir.

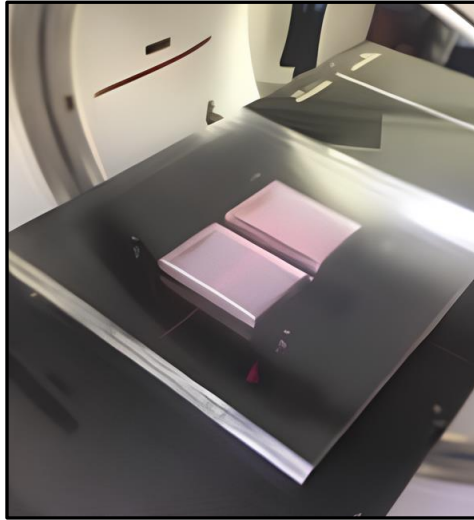
DNF'nin U87MG ve T98G hücrelerine uygulandığı dozlar ve deney grupları		
1	Kontrol	Sadece tümör hücrelerini içeren, hiçbir şey uygulanmamış grup.
2	t0	Kontrol grubuna kıyasla başlangıçtaki hücre sayısını belirleyen grup.
3	Çözücü	DNF'nin çözücü olan DMSO'yu içeren grup.
4	40µM	DNF'nin 40µM dozda hücrelere uygulandığı grup.
5	20µM	DNF'nin 20µM dozda hücrelere uygulandığı grup.
6	10µM	DNF'nin 10µM dozda hücrelere uygulandığı grup.
7	5µM	DNF'nin 5µM dozda hücrelere uygulandığı grup.
8	2.5µM	DNF'nin 2.5µM dozda hücrelere uygulandığı grup.
9	1.25µM	DNF'nin 1.25µM dozda hücrelere uygulandığı grup.
10	0.625µM	DNF'nin 0.625µM dozda hücrelere uygulandığı grup.
11	0.3µM	DNF'nin 0.3µM dozda hücrelere uygulandığı grup.
12	0.15µM	DNF'nin 0.15µM dozda hücrelere uygulandığı grup.

U87MG ve T98G hücreleri 5000 hücre/kuyucuk; 96 kuyucuklu steril kültür tabaklarına ekildi ve yapışmaları için bir gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin durumu mikroskoptan kontrol edildi. Ardından besiyeri uzaklaştırıldı ve önceden %1 FBS'li DMEM besiyerinde hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki DNF, en düşük konsantrasyondan başlanılarak uygulandı. İlaç uygulamasının hemen ardından başlangıçtaki hücre sayısını belirlemek adına başlangıç zamanı (Time Zero) okuması yapıldı. İlaç uygulamasını takiben hücreler 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde inkübe edildi. Her bir inkübasyon sonunda DNF'nin, tümör hücrelerindeki proliferasyon etkisini

belirlemek için MTT kiti ile sonuçlar yorumlandı. MTT protokolünde belirtildiği gibi 10µl MTT solüsyonu 96 kuyucuklu steril kültür tabaklarına uygulandı. 4 saat etüvde inkübe edildikten sonra 100µl solübilizasyon tamponu uygulandı ve bir gece etüvde inkübe edildi. Ertesi gün deney sonlandırılarak 580nm’de okundu. Her biri kendi içinde 8 tekrarlı olmak üzere birbirinden bağımsız 3 farklı deney sonucu istatistiksel olarak değerlendirilip, kontrol grubu (ilaç uygulanmamış olan grup) ile karşılaştırılarak IC₅₀ değeri belirlendi. Belirlenen IC₅₀ değerlerine göre kalan deneylere bu doz ile devam edildi.

3.6. Kültür Tabaklarına Radyasyon Uygulanması

Kliniği birebir taklit etmek amacıyla kurgulanan bu iş paketinde, kültür tabaklarına TMZ ve DNF’nin bireysel ve eş zamanlı kombine uygulanmasını takiben; klinikte uygulandığı gibi günde 2Gy olmak üzere 5 gün boyunca toplam 10Gy ışınlama yapıldı. Hücre kültürü için kullanılan 96 kuyucuklu steril tabakların ışınlaması Lineer akseleratör tabanlı bir cihaz olan Synergy (ELEKTA) ile 6MeV ışını kullanılarak gerçekleştirildi. 96 kuyucuklu steril tabakların ışınlaması sırasında hücre kültürlerinde yeterli doza ulaşmak amacıyla posteriyor tek alandan minimum 16mm su eşdeğeri malzeme (14.29mm plexiglass) ile alttan desteklenecek şekilde yapıldı. Kültür tabaklarında yan saçılmaları engellemek amacıyla, aynı malzeme ile yanlardan desteklenerek pleksiglass malzemedan bir kutu içerisinde ışınlama sağlandı (Şekil 3.3) (Abatzoglou, Zois ve ark. 2013).



Şekil 3.3. Steril kültür tabaklarında ekilen U87MG ve T98G hücrelerinin ışınlaması sırasında yan saçılmaları engellemek için kullanılan “pleksiglass” gösterilmektedir.

Öncelikle radyoterapi uygulanacak deney grupları belirlendi (Şekil 3.4). Belirlediğimiz dozlar, radyoterapi uygulamasından 1 saat önce hem bireysel hem de kombine olarak 96 kuyucuklu steril kültür tabaklarına uygulandı. Deneye başlamadan önce yapmış olduğumuz doz taramaları sonucu belirlenen IC₅₀ değeri sonuçlarına göre;

U87MG hücre hattına uygulanmış olan dozlar;

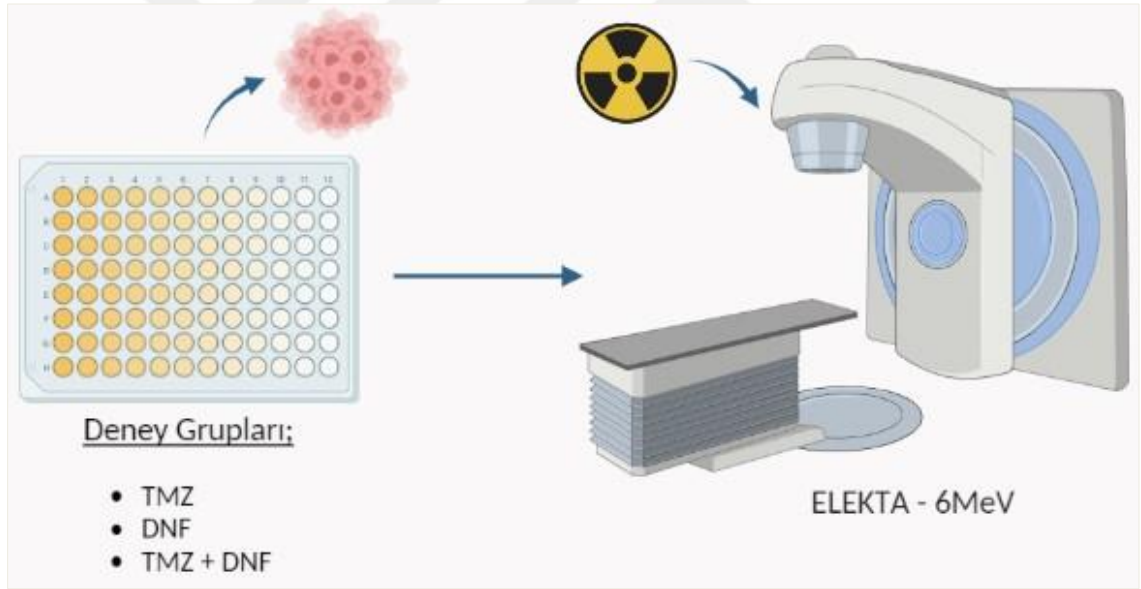
TMZ için uygulanan dozlar; 60, 120 (IC₅₀ değeri) ve 240µM,

DNF için uygulanan dozlar ise; 1.7, 3.4 (IC₅₀ değeri) ve 6.8µM'dir.

T98G hücre hattına uygulanmış olan dozlar ise;

TMZ için uygulanan dozlar; 80, 160 (IC₅₀ değeri) ve 320µM,

DNF için uygulanan dozlar ise; 2, 4 (IC₅₀ değeri) ve 8µM'dir.



Şekil 3.4. GBM hücrelerine bireysel ve kombine uygulanan TMZ ve DNF'ye ek olarak radyoterapinin uygulandığı deney grupları gösterilmektedir (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib).

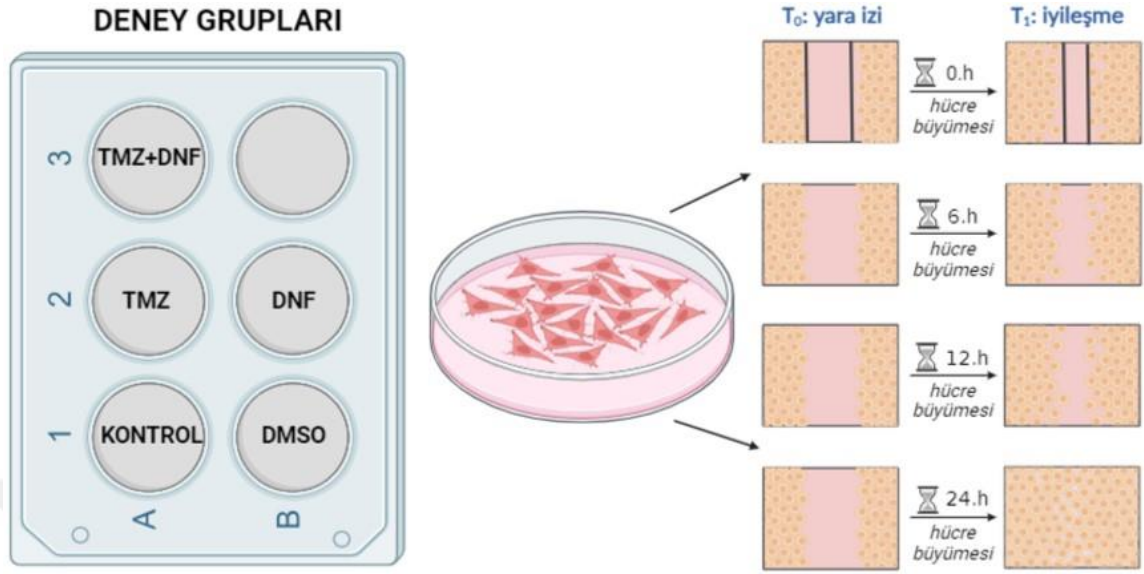
U87MG ve T98G insan GBM hücreleri 5000 hücre/kuyucuk 96 kuyucuklu steril kültür tabaklarına ekildi ve yapışmaları için bir gece inkübe edildi. Ardından besiyeri uzaklaştırıldı ve önceden %1 FBS'li DMEM besiyerinde hazırlanan DNF ve TMZ'nin deney için belirlenen dozları, en düşük konsantrasyondan başlanarak uygulandı. İlaç uygulamasından 1 saat sonra hücreler, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi bölümünde günde 2Gy olmak üzere ardışık 5 gün boyunca toplam 10Gy ışınladı. Ardından hücreler %5CO₂ ve %95 hava koşullarında 37°C inkübatörde; 24, 48,

72, 96 ve 120 saatlik zaman dilimlerinde inkübe edildi. Her bir inkübasyon sonunda DNF ve TMZ'nin hem bireysel hem de kombine uygulamasının yanı sıra; ek olarak radyoterapinin de tümör hücreleri üzerindeki proliferatif etkisini belirlemek için MTT kiti ile deney sonlandırıldı (Böylelikle hem deney gruplarına uygulanan ilaçlar arasında; hem de radyoterapi grupları arasında değerlendirme yapılması sağlandı). MTT protokolünde belirtildiği gibi 96 kuyucuklu steril kültür tabaklarına 10µl MTT solüsyonu uygulandı. 4 saat etüvde inkübe edildikten sonra 100µl solübilizasyon tamponu uygulandı ve bir gece etüvde inkübe edildi. Ertesi gün deney sonlandırılarak 580nm'de okundu. Her biri kendi içinde 8 tekrarlı olarak birbirinden bağımsız 3 farklı deney sonucu istatistiksel olarak değerlendirilip, kontrol grubu (ilaç uygulanmayan grup) ile karşılaştırılarak yorumlandı.

3.7. Migrasyon Analizi

Bu deney basamağı çalışmamızın diğer deneylerinde de olduğu gibi iki hücre hattı ile gerçekleştirildi (U87MG ve T98G). DNF ve TMZ'nin hem bireysel hem de kombine uygulamaları sonucu hücrelerin hareket potansiyeli hakkında veri elde edebilmek adına hücrelerde yara izi oluşturuldu ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

U87MG hücreleri için 12 kuyucuklu steril kültür tabaklarına her bir kuyucuğa 200.000 hücre ekildi. T98G hücreleri, U87MG hücrelerine göre daha yavaş proliferatif oldukları için 300.000 hücre 12 kuyucuklu steril kültür tabaklarına ekildi. Hücreler en az %70 konfluensiye ulaşmaları için etüvde iki gün inkübe edildi. Hücreler kuyucukları tamamen doldurduktan sonra her kuyucuk yukarıdan aşağıya doğru steril 200µL'lik pipet ucu ile çizilerek yara izi oluşumu sağlandı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. U87MG ve T98G hücrelerine uygulanan TMZ ve DNF sonucu, hücrelerde yara izi oluşturularak 0, 6, 12 ve 24. saatlerdeki hareket potansiyelleri görülmektedir.

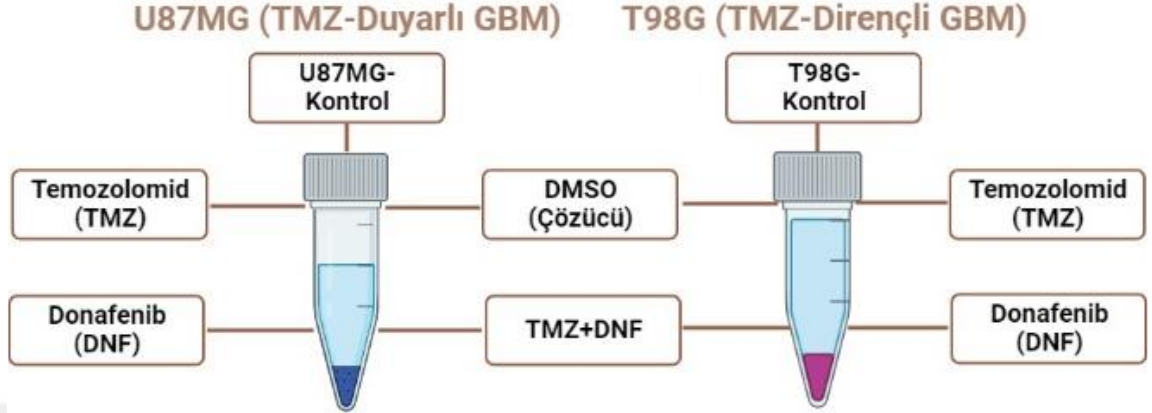
Kuyucuktan kalkan hücrelerin uzaklaştırılması için hücrelerin besiyeri atıldı ve 2 kere soğuk steril PBS ile yıkandı. Hücrelerin çizilmesinden sonra U87MG hücreleri için; 120 μ M dozda (IC₅₀ değeri) TMZ ve 3.4 μ M (IC₅₀ değeri) dozda DNF uygulandı. T98G hücrelerine ise TMZ 160 μ M (IC₅₀ değeri) ve DNF 4 μ M (IC₅₀ değeri) dozda hazırlanıp hem bireysel hem de TMZ ile kombine uygulandı. En yüksek konsantrasyona sahip doz ile aynı miktarda DMSO hazırlanarak deneye çözücü grubu da eklendi.

Tüm bu uygulamaların hemen ardından 0. saat için tüm grupların fotoğrafları 4X objektifte çekildi ve fotoğrafın çekildiği alan kültür tabağının üstünde işaretlendi. 6, 12 ve 24. saatlerde de her bir kuyucuktan aynı alanların fotoğrafları çekildi. Kuyucuklarda oluşturulan yara izlerinden çekilen fotoğraflar ImageJ programı yardımıyla ölçülerek hesaplandı. U87MG ve T98G hücreleriyle diğer gruplar kıyaslanarak Graphpad 8.0.2 programında istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.8. Western Blot

Tümör hücrelerinde TMZ, DNF ve TMZ+DNF kombinasyonlarının *p*-ERK 1/2 ve Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyon seviyelerindeki etkinliğinin değerlendirilmesi amacı ile Western Blot yapılması hedeflendi. Planlanan deney grupları ise aşağıda belirtildiği şekilde tasarlandı (Şekil 3.6).

Deney Grupları



Şekil 3.6. U87MG ve T98G insan GBM hücre hatlarında gerçekleştirilen Western Blot deney grupları gösterilmektedir. Deney grupları arasında hem TMZ'nin hem de DNF'nin çözücüsü DMSO da eklendi ve böylelikle hücrelerde oluşan etkinin TMZ/DNF'den mi yoksa çözücü grubundan mı kaynaklandığı değerlendirildi.

3.8.1. Hücrelerden Lizat Elde Edilmesi

U87MG ve T98G hücreleri için her grup için 8×10^6 hücre olacak şekilde steril petriye ekildi. Ekilen bu hücreler bir gün etüvde yapışması için bekletildi. Ertesi gün DNF ve TMZ için belirlenen dozlar hazırlanarak GBM hücrelerine uygulandı. İlaç uygulamasının 24. saatinde hücrelerin besiyeri uzaklaştırılıp iki kere soğuk steril PBS ile yıkandı. Hücrelerin kalkması tripsin ile sağlandı. Tripsinin etkinliğini ortadan kaldırmak için en az iki katı kadar DMEM besiyeri eklendi ve grup isimlerinin yazılı olduğu ependorflara toplandı. 2000rpm'de 6 dakika boyunca santrifüjlendikten sonra süpernatant kısmı pelleti bozmadan uzaklaştırıldı. Pellet miktarının ortalama iki katı kadar Lizis ve PİK karışımı (100µl) eklenerek 10'ar dakika aralıklarla 3 kez vortekslendi. Pipetaj işlemini takiben hücreler ependorflara alınıp 13.500rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı kullanılmak üzere ependorflara toplandı. Hücrelerden açığa çıkan proteinler lizat olarak -80°C'ye kaldırıldı.

3.8.2. Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Hücrelerin içerdiği protein miktarları Bicinchoninic Acid Kit (BCA) (Thermo; #23225) kullanılarak tespit edildi ve her örnekte total hücre miktarlarının eşit olması sağlandı. BCA yönteminde standart protein olarak BSA kullanıldı. 1mg/ml BSA (S0) hazırlandı, hazırlanan bu BSA dH₂O ile dilüe edildi ve S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 standart proteinler elde edildi. Lizatlar, 1:50 oranında lizis tamponu ve PİK karışımı ile dilüe edilerek

vortekslendi. Liziz tamponu-PİK karışımı “blank” olarak kullanıldı. BCA kit içeriğindeki Reagent A’dan 10ml ve Reagent B’den 200µl solüsyon, 15ml’lik falkonda karıştırılarak karanlıkta hazırlandı. Bu yöntem için 96 kuyucuklu kültür tabakları kullanıldı. Her kuyucuğa iki tekrar olacak şekilde 25µl standartlar ve 25µl örnekler eklendi. Daha sonra standartların ve örneklerin üzerine her kuyucuğa toplam 200µl olacak şekilde hazırlanan solüsyon eklendi ve kültür tabağı alüminyum folyoya sarılarak 60°C’lik etüvde 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra spektrofotometrede 562nm dalga boyunda okundu. Standartlar ile kıyaslayarak her bir örneğin protein konsantrasyonu tespit edildi. Örnekler protein konsantrasyonları (30µg) eşit olacak şekilde Laemli tamponu (Sigma; #S-3401) ve dH₂O kullanılarak hazırlandı. Örnekler 5 dakika boyunca 95°C kuru ısıtıcıda kaynatılarak hazır hale getirildi.

3.8.3. Kullanılan Solüsyonlar

%30 Akrilamid-Bisakrilamid: 37,5:1 oranındaki akrilamid-bisakrilamid (Biorad; #161-01-25) 15,4gr tartılarak 40ml distile su (dH₂O) içerisinde çözöldü.

4X Tris-HCl/SDS (pH: 6,8): 3,025gr Tris (Biorad; #1.08387.2500) tartılarak 20ml dH₂O içerisinde çözöldü. HCl ile pH 6,8’e ayarlanıp dH₂O ile toplam hacim 50ml’ye tamamlandı. Üzerine 0,2gr SDS (Biorad; #161-0301) eklendi.

4X Tris-HCl/SDS (pH: 8,8): 9,75gr Tris (Merck; #1.08387.2500) tartılarak 20ml dH₂O içerisinde çözöldü. HCl ile pH 8,8’e ayarlandı. Son hacim dH₂O ile 50ml’ye tamamlandı ve 0,2gr SDS eklendi.

%10’luk Amonyum Persölfat (APS): 1ml dH₂O içerisinde 0,1gr APS (Amresco; #7727-54) çözöldü.

N, N, N’, N’-Tetramethylethylenediamidine (TEMED): Sigma Aldrich; #T-7024. APS ve TEMED hemen donduğı için jel hazırlanırken en son eklendi ve falkon yavaşça çalkalandı.

5X Yürütme Tamponu (Elektroforez Solüsyonu): 9gr Tris (Bio-Rad; #161-0719), 43.2gr Glisin (Bio-Rad; #161-0718) ve 3gr SDS (Sigma Aldrich; #L4390) tartılarak

üzerine 600ml dH₂O ilave edildi. Devamında dH₂O ile 1X olacak şekilde dilüe edilerek deneye hazır hale getirildi.

10X PBS Tamponu: 16gr NaCl, 0.8gr KH₂PO₄ ve 2.856gr Na₂HPO₄ tartılarak 2000ml dH₂O içerisinde çözöldü ve +4°C’de muhafaza edildi.

PBS-T Solösyonu: Hazırlanan 10X PBS’ten alınan 100ml solösyon dH₂O ile 1 litreye tamamlanıp 1X PBS elde edilmiş oldu. Elde edilen 1 litre 1X PBS içörsine 1000µl Tween-20 (Merck; #8.22184.0500) eklendi.

Transfer Tamponu (Blotlama solösyonu): 14,3gr Glisin (Bio-Rad; #161-0718) ve 3gr Tris (Bio-Rad; #161-0719) 700ml dH₂O içörsinde çözöldü. Çözölen bu solösyona 200ml Metanol (Merck; #1.06009.2511) eklenerek toplam hacim dH₂O ile 1000ml’ye tamamlandı.

Bloklama Solösyonu (%5’lik süt tozu): 2gr süt tozu (Bio-Rad; #170-6404) 40ml PBS-T içörsinde çözöldü.

Ayırıcı %10’luk poliakrilamid jel hazırlamada kullanılan solösyonlar:

- %30 Akrilamid-bisakrilamid: 5ml
- 4X Tris-HCl/SDS (pH: 8,8): 3,75ml
- dH₂O: 6,25ml
- %10 Amonyum persölfat: 50µl
- TEMED: 10µl

Toplayıcı poliakrilamid jel için kullanılan solösyonlar:

- %30 Akrilamid-bisakrilamid: 650µl
- 4X Tris-HCl/SDS (pH: 6,8): 1250µl
- dH₂O: 3050µl
- %10 Amonyum persölfat: 25µl
- TEMED: 5µl

Hazırlanan lizatlar için jel elektroforez yöntemi kullanılarak *p*-ERK 1/2 (Thermo; #36-8800) ve Aktif Kaspaz-3 protein miktarları belirlendi. Bu işlem için *p*-ERK 1/2’nin

moleküler ağırlığı 42-44kDa ve Aktif Kaspaz-3'ün ise 17kDa olduğu için %10'luk poliakrilamid jel hazırlandı. Örnekler protein miktarları eşit olacak şekilde oranlanarak kuyucuklara eklendi ve Mini Protean Sistem III tankının içerisine yerleştirildi. Tanka elektroforez solüsyonu eklenerek güç kaynağına bağlandı. Proteinler güç kaynağı aracılığı ile 100 Volt ve 50 miliamperde 80-100 dakika yürütüldü. Proteinler jelde yürüdükten sonra PVDF membran üstte ve altta 3'er adet filtre kâğıdı olacak şekilde sandviç biçiminde hazırlandı. PVDF membran üzerine proteinleri içeren jel konularak hazırlanan sandviç Mini protean III sistemindeki tank içerisine alındı. Mini protean III tankına transfer solüsyonu eklendi ve +4°C'de proteinlerin membrana transfer olması için gece boyu inkübe edildi. Proteinlerin PVDF membrana transferinden sonra elde edilen membran, PBS-T ile 10 dk'da bir yarım saat boyunca yıkandı. Ardından %5'lik süt tozu ile oda ısısında 1 saat çalkalayıcı üzerinde blokladı. Membranlar bloklanırken üretici firmanın tavsiyesine göre PBS-T içeren *p*-ERK 1/2 (1:1000) ve Aktif Kaspaz-3 (1:1000) primer antikoru %3 süt tozu ile hazırlandı. Protein miktarlarının eşit yüklendiğini göstermek için her hücrede ekspre edilen Vinculin, internal kontrol olarak kullanıldı ve +4°C'de karıştırıcı üzerinde gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 30 dakika boyunca 10 dakikada bir PBS-T solüsyonu ile yıkama yapıldı. Membran, primer antikor için uygun olan ve bloklama solüsyonu ile sulandırılmış HorseRadish peroksidaz (HRP) konjuge anti-tavşan IgG (keçide üretilmiş) sekonder antikorla (Vector lab.; #BA-1000) (1:3000) oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında PBS-T ile 30 dakika boyunca 10 dakikada bir yıkama yapılarak görüntülemeye hazır hale getirildi.

3.8.4. Görüntüleme ve Değerlendirme

Sekonder antikorla konjuge peroksidaz enziminin kemiluminesans oluşturulan ürünü için substrat içeren ECL reaksiyon karışımı (Thermo; #34580) ile muamele edilen membranlar 3-5 dakika bekleme süresinin sonunda görüntülendi. Antikorların bağlanma yerleri bant olarak tespit edildi ve bu bantların ImageJ programı ile analizleri yapıldı. *p*-ERK 1/2 ve Aktif Kaspaz-3 proteinlerinden elde edilen matematiksel değerler ayrı ayrı Vinculin ile elde edilen değerlerle oranlanıp gruplar arası karşılaştırmalar GraphPad 8.0.2 programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.9. İstatistiksel Analizler

Gruplar arasında hücre canlılığı analizleri ile *p*-ERK 1/2 ve Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyonları istatistiksel olarak değerlendirildi. Çalışmadan elde edilen verilerden grup içi değerlendirmeler için Dunnett's Multiple Comparison post-test, gruplar arası değişimlerin değerlendirilmesi için ise Tukey-Kramer multiple comparison test, the Student's paired t-test ve ANOVA testleri kullanıldı ($p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi). Elde edilen veriler doğrultusunda grafikler ve değerlendirmeler, GraphPad 8.0.2 programı ile analiz edildi.



4. BULGULAR

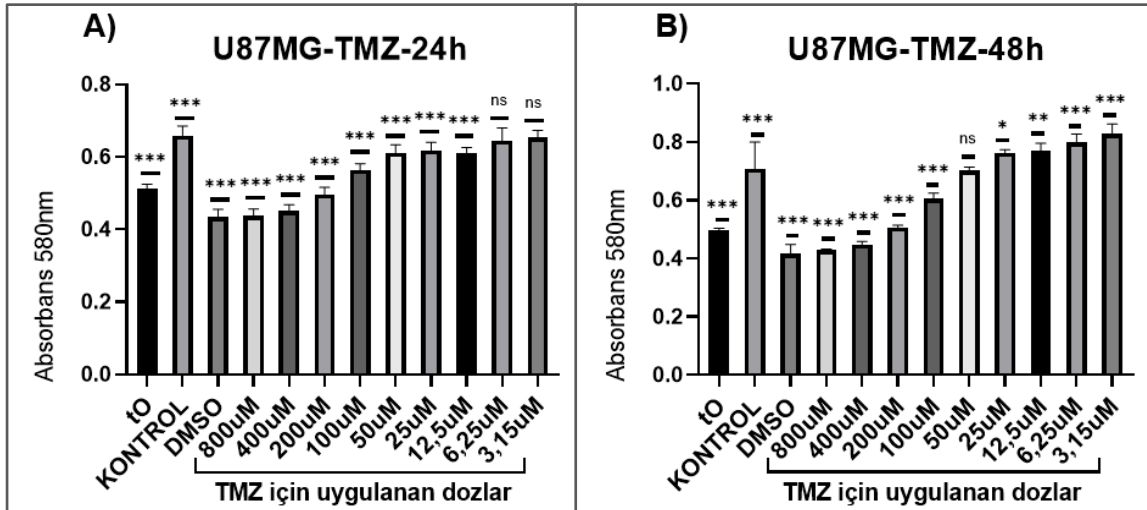
4.1. TMZ'nin U87MG Hücrelerine Etkisinin Belirlenmesi

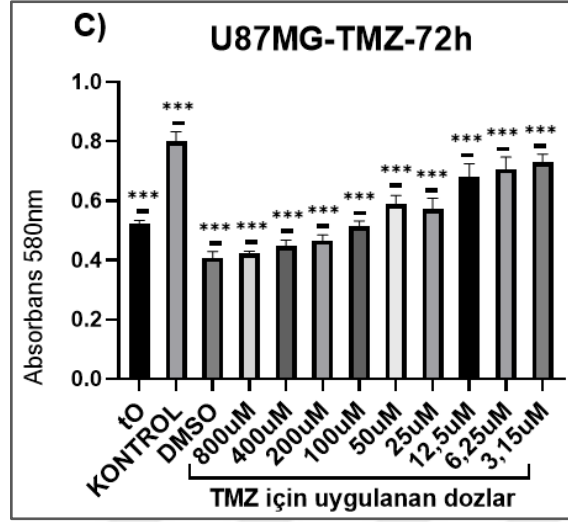
TMZ'nin doz taramaları birbirinden farklı üç deney tekrarı olacak şekilde gerçekleştirildi. Uygulanan dozlar 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 ve 3.125 μ M'dır. U87MG hücrelerine uygulanan TMZ için yapılan istatistiksel analizler sonucunda;

24 saatlik inkübasyon sonunda; 800, 400, 200, 100, 50, 25 ve 12.5 μ M dozlarında kontrole kıyasla anlamlı bir azalma görülürken; 6.25 ve 3.125 μ M dozlar kontrolle kıyaslandığında hücrelerin azalmasına rağmen anlamlı bir sonuç ifade etmemektedir (ns: $p>0.05$, *** $p<0.001$) (Şekil 4.1A).

48 saatlik inkübasyon sonunda; 50 μ M TMZ dozu hariç tüm dozlar anlamlıdır. Fakat 12.5, 6.25 ve 3.15 μ M dozlar tümör hücrelerinin proliferasyonu sağlayarak kontrole kıyasla anlamlı bir artış ifade ettiği için istatistiksel olarak anlamlandırıldı (ns: $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$) (Şekil 4.1B).

72 saatlik inkübasyon sonunda ise TMZ uygulaması kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde azalma göstermeye devam etti (*** $p<0.001$) (Şekil 4.1C).

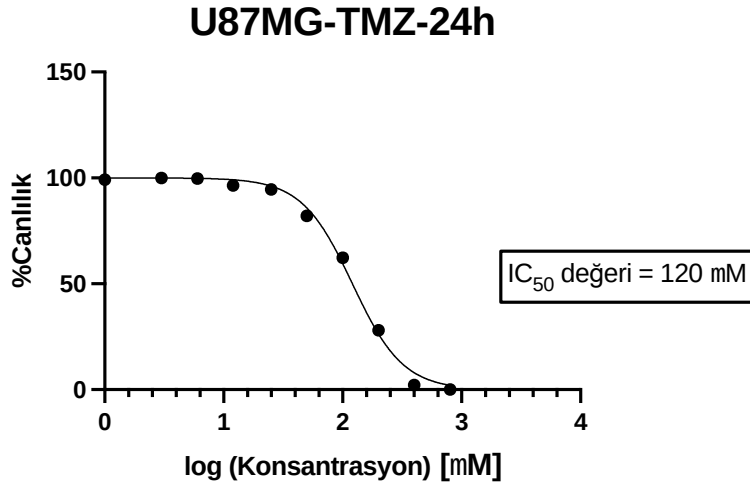




Şekil 4.1. U87MG insan glioblastoma hücre hattına uygulanan TMZ'nin; 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saatlik inkübasyon süreleri sonunda hücre canlılığına etkisi gösterilmektedir (TMZ, Temozolomid).

4.1.1. TMZ'nin U87MG Hücreleri İçin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

U87MG insan GBM hücrelerine, farklı zamanlarda ve dozlarda uygulanan TMZ'nin; MTT kiti ile hücre canlılığı test edildi. Elde edilen veriler doğrultusunda TMZ'nin IC₅₀ değeri GraphPad 8.0.2 programında non-lineer regresyon analizi ile belirlendi. Yapılan analizler sonucunda, TMZ için 24 saat inkübasyon sonucu elde edilen IC₅₀ değeri 120µM olarak belirlendi (Şekil 4.2). Projemizin devamında deneylere, bulduğumuz bu IC₅₀ değeri ile devam edildi.



Şekil 4.2. MTT analizi sonucunda; U87MG hücrelerine uygulanan TMZ'nin, en etkili zaman aralığı 24 saat ve buna bağlı IC₅₀ değeri de 120µM olarak belirlendi (TMZ, Temozolomid).

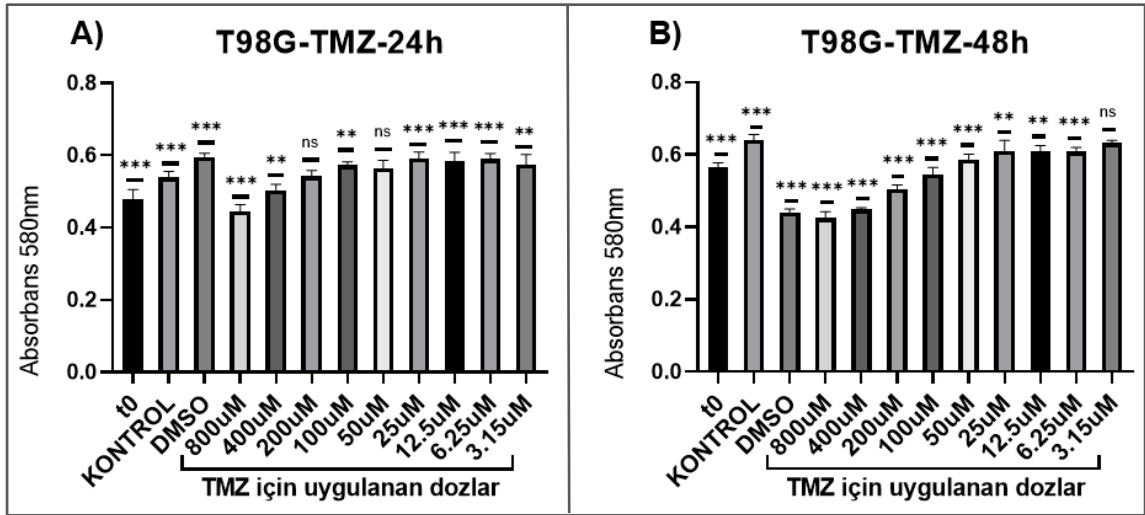
4.2. TMZ'nin T98G Hücrelerine Etkisinin Belirlenmesi

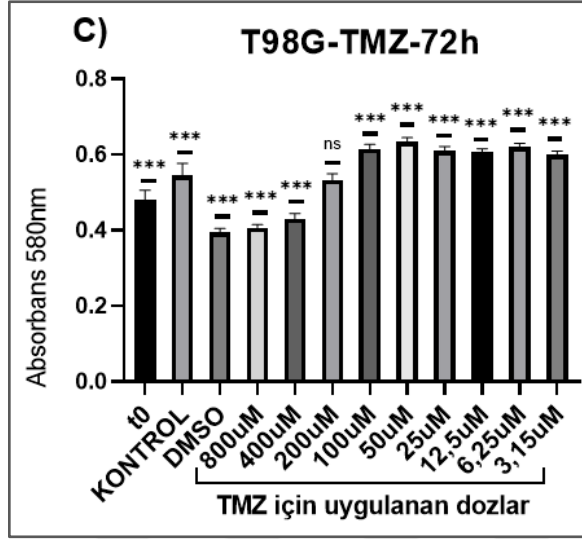
TMZ'nin doz taramaları birbirinden farklı üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi. T98G hücre hattına uygulanan TMZ dozları 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 ve 3.125 μ M'dır. Uygulama sonunda elde edilen istatistiksel analizler sonucunda;

24 saatlik inkübasyon sonunda; TMZ'nin 800, 400 ve 100 μ M dozlarında kontrole kıyasla anlamlı bir azalma görülürken; 200 ve 50 μ M dozlar anlamlı bir sonuç ifade etmemektedir. Ek olarak, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 ve 3.125 μ M dozlar kontrole kıyasla tümör hücrelerinin proliferasyonu sağladığı için istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (ns: $p>0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$) (Şekil 4.3A).

48 saatlik inkübasyon sonunda, TMZ dozlarından 3.125 μ M dozu hariç tüm dozlar anlamlı olarak belirlendi (ns: $p>0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$) (Şekil 4.3B).

72 saatlik inkübasyon sonunda da TMZ'nin, 200 μ M dozu hariç kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde azalma göstermeye devam etti. Ek olarak, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 ve 3.15 μ M dozlarda ise kontrole kıyasla tümör hücrelerinde artış meydana geldi (ns: $p>0.05$, *** $p<0.001$) (Şekil 4.3C).

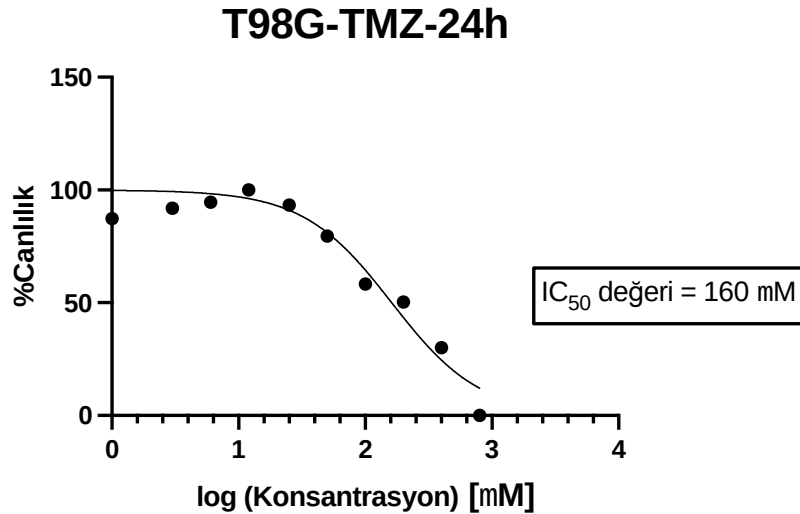




Şekil 4.3. T98G insan glioblastoma hücre hattına uygulanan TMZ'nin; 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saatlik inkübasyon süreleri sonunda hücre canlılığına etkisi gösterilmektedir (TMZ, Temozolomid).

4.2.1. TMZ'nin T98G Hücreleri İçin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

Doz taramaları için farklı konsantrasyonlarda T98G hücrelerine uygulanan TMZ'nin; MTT kiti ile hücre canlılığı analiz edildi. TMZ'nin IC₅₀ değeri GraphPad 8.0.2 programında yapılan analizler ile belirlendi. Yapılan bu analizler sonucunda, TMZ için 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda elde edilen IC₅₀ değeri 160µM doz olarak bulundu ve kalan tüm deneylere bu değer ile devam edildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. MTT analizi sonucunda; T98G hücrelerine uygulanan TMZ'nin, en etkili zaman aralığı 24 saat ve buna bağlı IC₅₀ değeri de 160µM olarak belirlendi (TMZ, Temozolomid).

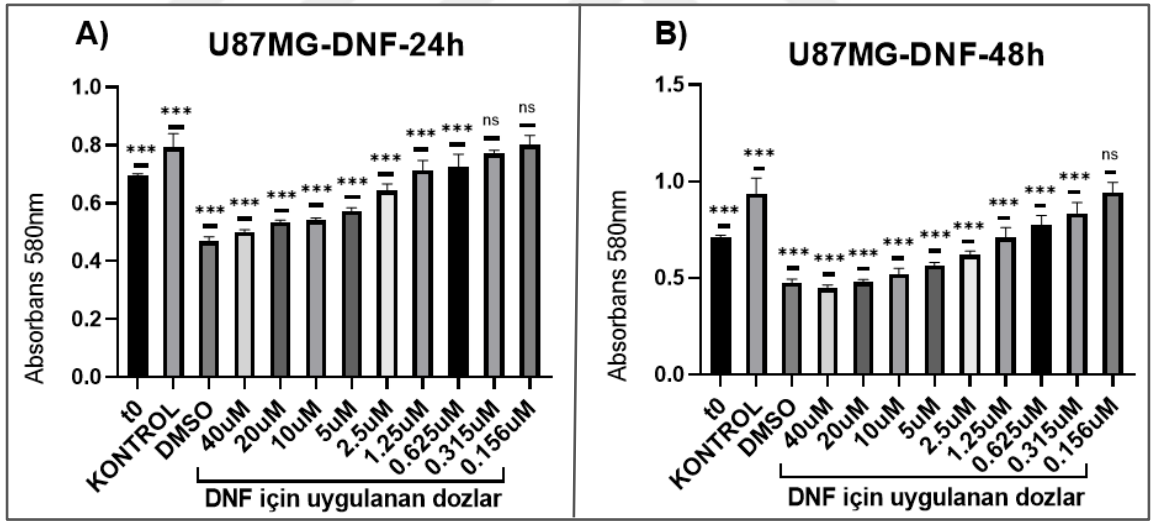
4.3. DNF'nin U87MG Hücrelerine Etkisinin Belirlenmesi

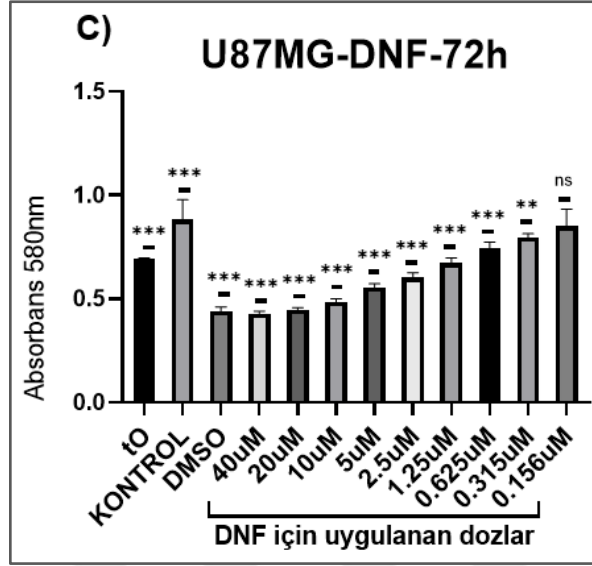
U87MG hücrelerine, farklı konsantrasyonlarda (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.315 ve 0.156 μ M) DNF uygulandı. Doz taramaları birbirinden bağımsız üç deney tekrarı olacak şekilde gerçekleştirildi. Uygulama sonunda yapılan istatistiksel analiz sonucunda;

24 saatlik inkübasyon sonunda; 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 ve 0.625 μ M dozlarında kontrole kıyasla anlamlı bir azalma görülürken, 0.315 ve 0.156 μ M dozlar anlamlı bir sonuç ifade etmemektedir (ns: $p>0.05$, *** $p<0.001$) (Şekil 4.5A).

48 saatlik inkübasyon sonunda, DNF dozlarından 0.156 μ M hariç diğer tüm dozlar kontrole kıyasla anlamlıdır (ns: $p>0.05$, *** $p<0.001$) (Şekil 4.5B).

72 saatlik inkübasyon sonunda ise 0.156 μ M DNF dozu hariç tüm dozlar kontrole kıyasla anlamlıdır (ns: $p>0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$) (Şekil 4.5C).

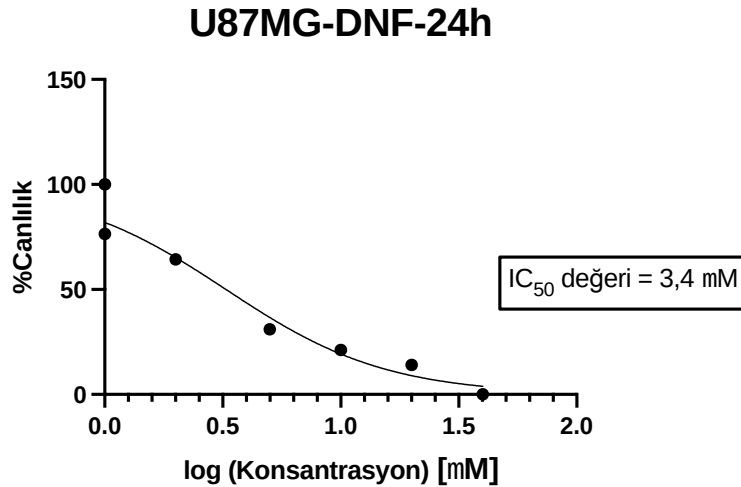




Şekil 4.5. U87MG insan glioblastoma hücre hattına uygulanan DNF'nin; 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saatlik inkübasyon süreleri sonunda hücre canlılığına etkisi gösterilmektedir (DNF, Donafenib).

4.3.1. DNF'nin U87MG Hücreleri İçin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

U87MG hücrelerine, farklı zamanlarda ve farklı dozlarda uygulanan DNF'nin; MTT kiti ile hücre canlılığı belirlendi. Elde edilen verilere göre DNF'nin IC₅₀ değeri GraphPad 8.0.2 programında non-lineer regresyon analizi ile değerlendirildi. DNF için 24 saat inkübasyon sonucu IC₅₀ değeri 3.4µM doz olarak belirlendi ve kalan deneylere bu doz ile devam edildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. MTT analizi sonucunda; U87MG hücrelerine uygulanan DNF'nin, en etkili zaman aralığı 24 saat ve buna bağlı IC₅₀ değeri de 3.4µM olarak belirlendi (DNF, Donafenib).

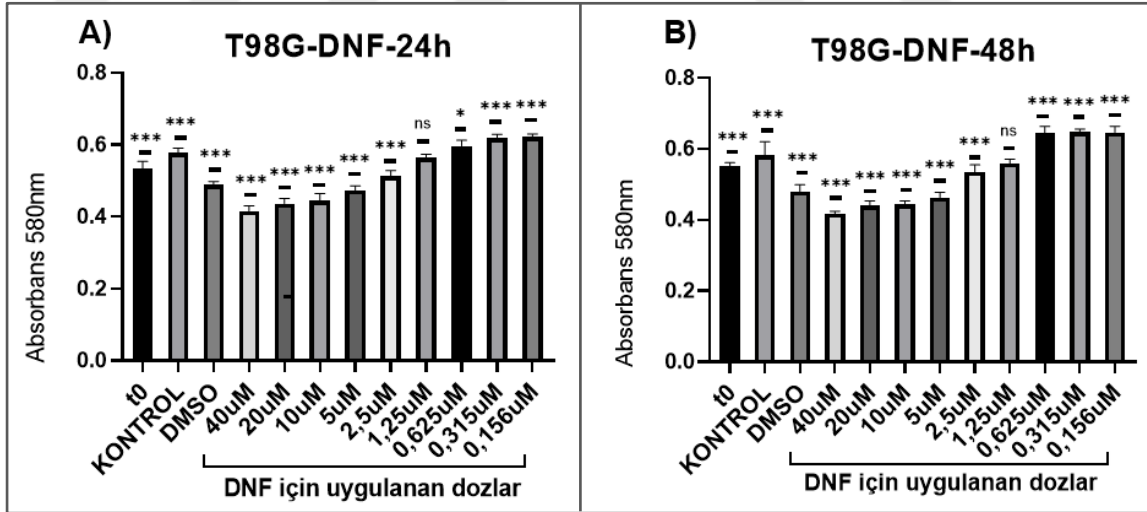
4.4. DNF'nin T98G Hücrelerindeki Etkisinin Belirlenmesi

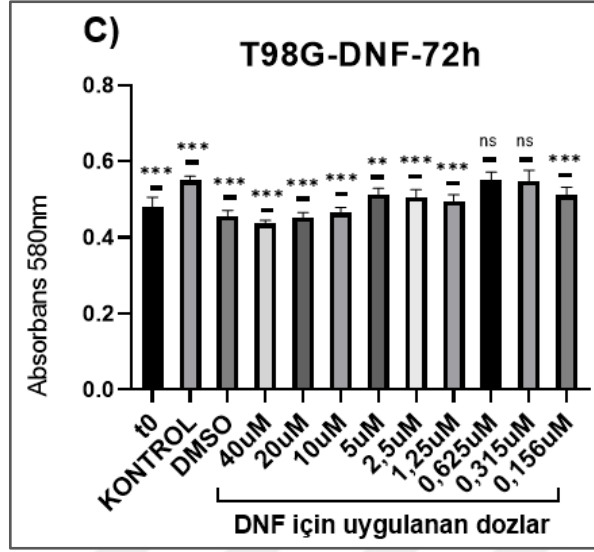
T98G hücrelerine, farklı konsantrasyonlarda (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.315 ve 0.156 μ M) DNF uygulandı. Doz taramaları birbirinden bağımsız üç deney seti olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Uygulama sonunda yapılan istatistiksel analiz sonucunda;

24 saatlik inkübasyon sonunda; 40, 20, 10, 5 ve 2.5 μ M dozlarda kontrole kıyasla anlamlı bir azalma görülürken, 0.625, 0.315 ve 0.156 μ M dozlar tümör hücrelerinde artışa sebep olmuştur. 1.25 μ M doz ise anlamlı bir sonuç ifade etmemiştir (ns: $p>0.05$, * $p<0.05$, *** $p<0.001$) (Şekil 4.7A).

48 saatlik inkübasyon sonunda, 0.625, 0.315 ve 0.156 μ M dozlar tümör hücrelerinin proliferasyonu sağladı. 0.125 μ M hariç diğer tüm dozlar kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde azalmaya devam etti (ns: $p>0.05$, *** $p<0.001$) (Şekil 4.7B).

72 saatlik inkübasyon sonunda ise 0.625 ve 0.315 μ M dozlar dışında kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde azalma gösterdi (ns: $p>0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$) (Şekil 4.7C).

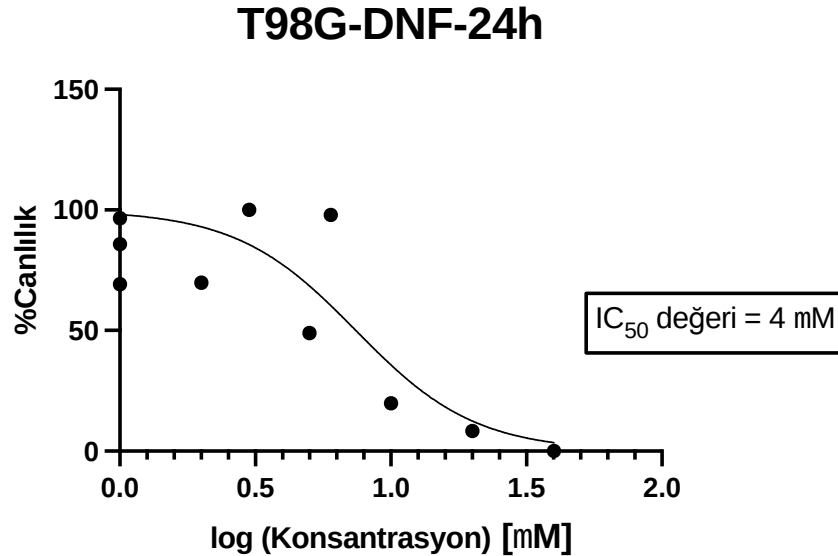




Şekil 4.7. T98G insan glioblastoma hücre hattına uygulanan DNF'nin; 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saatlik inkübasyon süreleri sonunda hücre canlılığına etkisi gösterilmektedir (DNF, Donafenib).

4.4.1. DNF'nin T98G Hücreleri İçin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

T98G hücrelerine, farklı zamanlarda ve dozlarda uygulanan DNF'nin; hücre canlılığı MTT kiti ile belirlendi. Elde edilen veriler doğrultusunda DNF'nin IC₅₀ değeri GraphPad 8.0.2 programı ile analiz edildi ve DNF için 24 saat inkübasyon sonucuna göre bu değer 4µM olarak belirlendi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. MTT analizi sonucunda; T98G hücrelerine uygulanan DNF'nin, en etkili zaman aralığı 24 saat ve buna bağlı IC₅₀ değeri de 4µM olarak belirlendi (DNF, Donafenib).

4.5. Radyoterapi ve Kemoterapi Uygulaması

Deney sonuçlarına göre belirlenen IC_{50} değerleri baz alınarak, TMZ ve DNF dozları; IC_{50} değerinin yarısı ($IC_{50}/2$), IC_{50} ve IC_{50} değerinin iki katı ($IC_{50}*2$) olacak şekilde belirlendi. U87MG hücrelerine uygulanan; TMZ dozları 60 ($IC_{50}/2$), 120 (IC_{50}) ve 240 μ M ($IC_{50}*2$); DNF dozları ise 1.7 ($IC_{50}/2$), 3.4 (IC_{50}) ve 6.8 μ M ($IC_{50}*2$)'dır. TMZ ve DNF hücrelere hem bireysel hem de kombine uygulandı. Ek olarak, aynı gruplar için hücrelere günde 2Gy olacak şekilde ardışık beş gün boyunca toplam 10Gy ışıma yapıldı.

T98G üzerine uygulanan DNF dozları 2 ($IC_{50}/2$), 4 (IC_{50}) ve 8 μ M ($IC_{50}*2$); TMZ dozları ise 80 ($IC_{50}/2$), 160 (IC_{50}) ve 320 μ M ($IC_{50}*2$)'dır. TMZ ve DNF hem bireysel hem de kombine uygulandı. Her iki hücre hattı içinde uygulamadan bir saat sonra hücrelere günde 2Gy olacak şekilde ardışık beş gün boyunca toplam 10Gy ışıma yapıldı.

4.5.1. U87MG Hücrelerine Uygulanan DNF ve Kemoterapinin Değerlendirilmesi

Klinikte GBM tedavisi için kemoterapötik ajan olan TMZ'nin, *in vitro* koşullarda DNF ile hem bireysel hem de kombine uygulanmasının ardından elde edilen veriler aşağıda özetlenmiştir.

24 saatlik inkübasyon sonunda, Çözücü grubu olarak deney gruplarına eklenen DMSO'nun tümör hücreleri üzerinde bir etkisi olmadığı görüldü. Bunun sonucunda anlamlı bulunan dozların DMSO etkisinden kaynaklanmadığını belirtmek mümkündür. TMZ ve DNF'nin hem bireysel hem de kombine uygulanmasındaki dozlar anlamlıdır. Fakat düşük doz uygulanan TMZ ve kombine grubu anlamlı bir sonuç ifade etmemektedir (ns: $p>0.05$, *** $p<0.001$) (Şekil 4.9A).

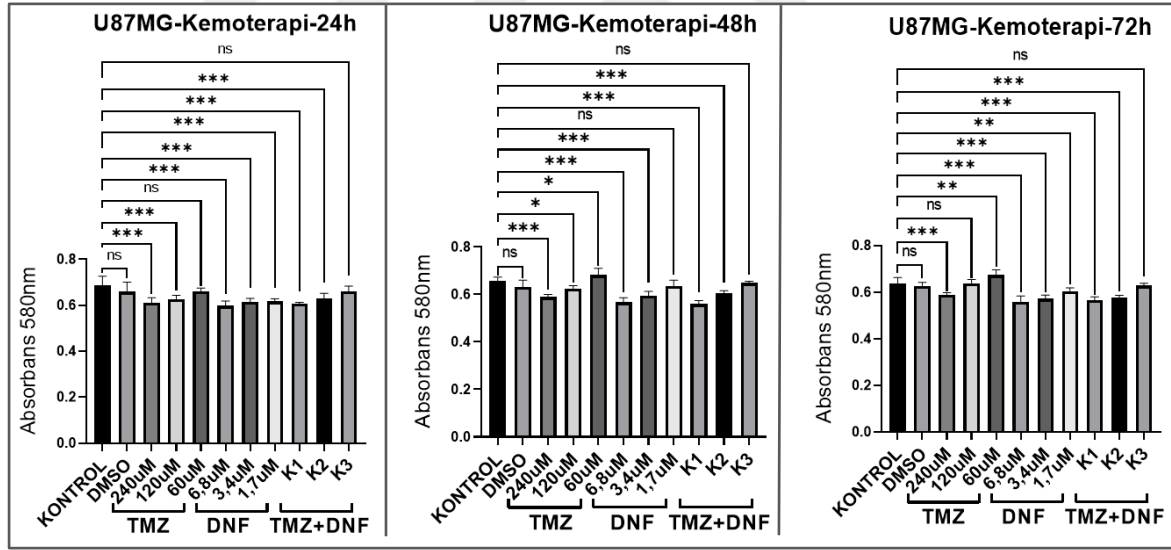
48 saatlik inkübasyon sonunda, DMSO'nun tümör hücreleri üzerinde bir etkisinin olmadığı görüldü. Ayrıca düşük doz uygulanan TMZ, DNF ve kombine grubu da anlamlı bir sonuç ifade etmemektedir. TMZ ve DNF'nin bireysel ve kombine uygulamasındaki diğer tüm dozlar anlamlı bulundu (ns: $p>0.05$, * $p<0.05$, *** $p<0.001$) (Şekil 4.9B).

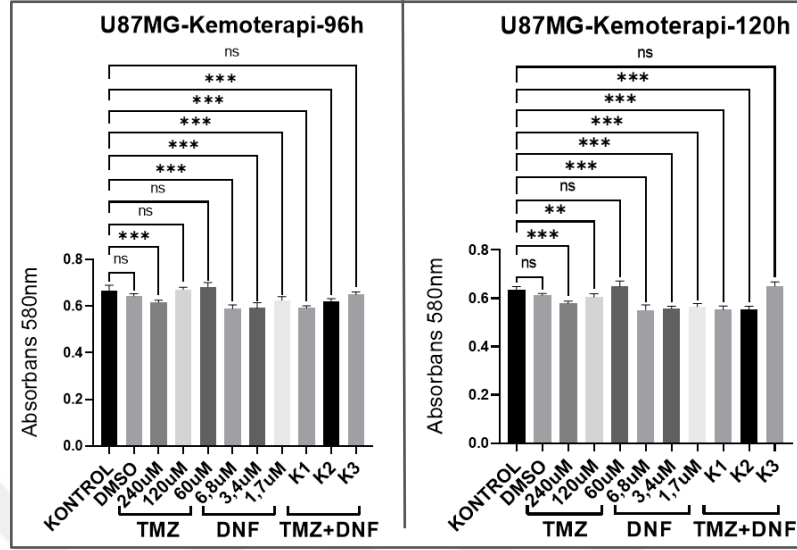
72 saatlik inkübasyon sonunda, bireysel uygulanan TMZ'nin sadece yüksek dozu anlamlı bulundu. DNF'nin bireysel uygulamasındaki tüm dozlar anlamlıdır. Tümör hücrelerini en çok öldüren DNF ve kombine gruplar olarak bulundu. Ek olarak, DMSO'nun etkisiz

olduğu ve anlamlı olan dozların çözücü grubundan kaynaklanmadığı gösterildi (ns: $p>0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$) (Şekil 4.9C).

96 saatlik inkübasyon sonunda, diğer saatlerde de olduğu gibi DMSO'nun bir etkisi olmadığı görüldü. TMZ'nin IC₅₀ değeri, düşük dozu ve TMZ'den kaynaklandığını düşündüğümüz düşük doz uygulanan kombine grubunun da anlamlı bir sonuç ifade etmediği görüldü. Ek olarak, diğer tüm dozlar anlamlı olarak belirlendi (ns: $p>0.05$, *** $p<0.001$) (Şekil 4.9D).

120 saatlik inkübasyon sonunda ise DMSO, düşük doz TMZ ve kombine grubu dışında tüm dozlar anlamlı belirlendi. DNF ve kombine uygulanan grupların kontrole kıyasla tümör hücrelerini TMZ'den daha çok öldürdüğü gösterildi (ns: $p>0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$) (Şekil 4.9E).





Şekil 4.9. U87MG hücrelerine uygulanan TMZ ve DNF'nin, hem bireysel hem de kombine uygulamalarında; 24 (A), 48 (B), 72 (C), 96 (D) ve 120 (E) saatlerin sonunda hücre canlılığına etkisi görülmektedir (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib; K1/2/3, Kombine).

4.5.2. U87MG Hücrelerine Uygulanan TMZ, DNF ve Radyoterapinin Değerlendirilmesi

U87MG hücrelerine TMZ ve DNF uygulamasından bir saat sonra günde 2Gy olacak şekilde ardışık beş gün boyunca toplam 10Gy ışıma yapıldı. 24 saatten başlayarak 120 saate kadar yapılan bu uygulamadan elde edilen veriler aşağıda özetlenmiştir.

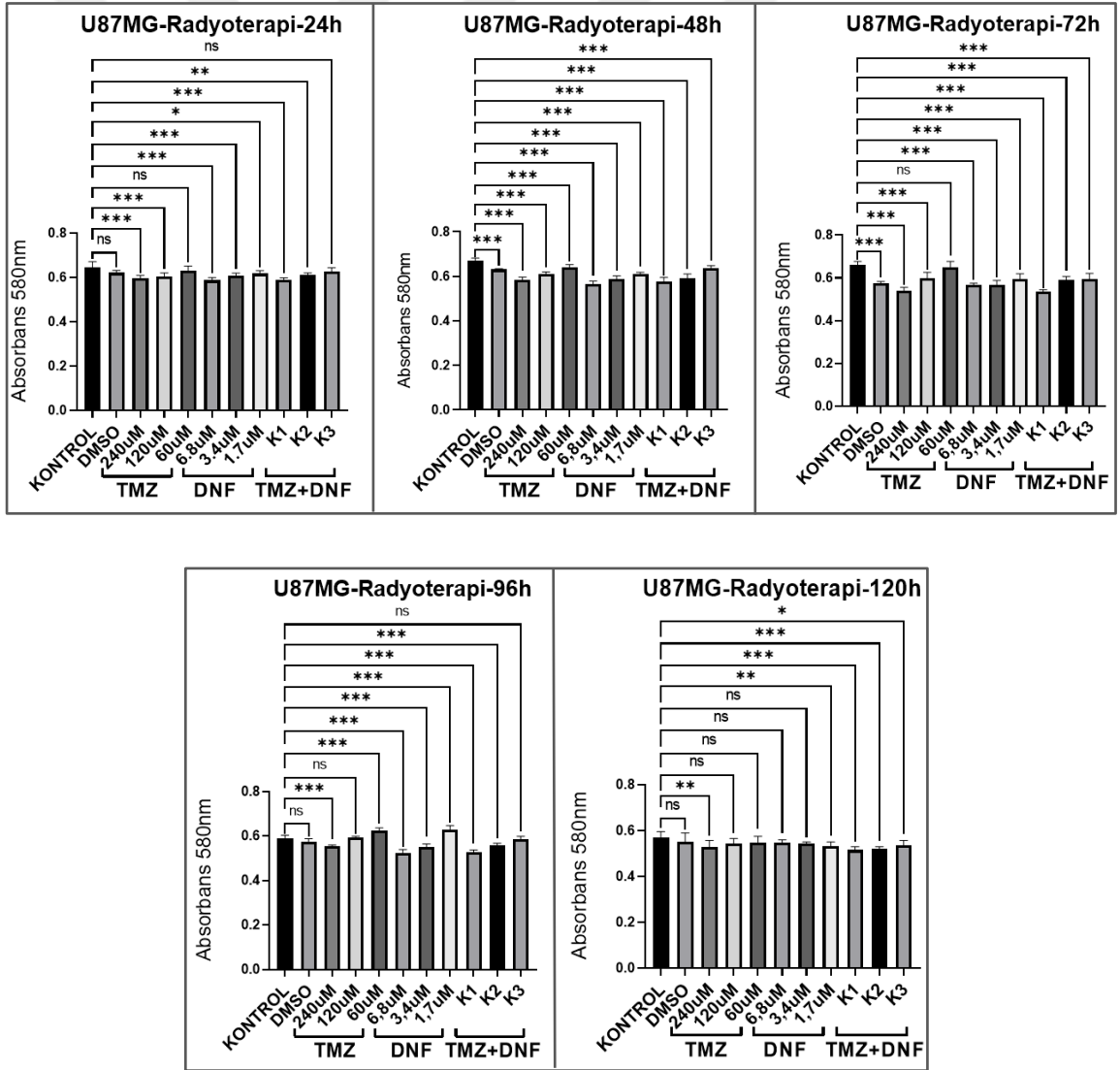
24 saatlik inkübasyon sonunda, hem çözücü grubu olarak deney gruplarına eklenen DMSO'nun hem düşük doz TMZ'nin hem de kombine uygulamanın tümör hücrelerine bir etkisi olmadığı görüldü. Bu dozlar dışında TMZ ve DNF'nin hem bireysel hem de kombine uygulanmasındaki dozlar anlamlı olarak belirlendi (ns: $p>0.05$, $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$) (Şekil 4.10A). Yüksek, IC₅₀ ve düşük doz olarak, üç grup şeklinde uygulanan grupların tümör hücrelerine etkileri benzerdir.

48 saatlik inkübasyon sonunda, TMZ ve DNF'nin hem bireysel hem de kombine uygulamasındaki tüm dozlar anlamlıdır ($***p<0.001$) (Şekil 4.10B).

72 saatlik inkübasyon sonunda, düşük doz uygulanan TMZ dozu hariç tüm dozlar anlamlı bulundu (ns: $p>0.05$, $***p<0.001$) (Şekil 4.10C). Tümör hücrelerini en çok öldüren gruplar, DNF ve kombine uygulamanın yapılan gruplar olmuştur.

96 saatlik inkübasyon sonunda; DMSO, TMZ (IC_{50}), düşük doz TMZ, düşük doz DNF ve düşük doz kombine uygulanan dozlar dışındaki tüm dozlar anlamlı bulundu (ns: $p>0.05$, *** $p<0.001$) (Şekil 4.10D). DMSO'nun bir anlam ifade etmemesi, tümör hücreleri üzerinde anlamlı bulunan doz etkilerinin DMSO'dan kaynaklanmadığını göstermektedir.

120 saatlik inkübasyon sonunda ise sadece yüksek doz TMZ ve düşük doz DNF uygulanan gruplar anlamlı bulundu (ns: $p>0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$) (Şekil 4.10E). Bireysel uygulamalar bir anlamlılık ifade etmemesine rağmen kombine grupların anlamlı olması, bu iki ajanın daha kapsamlı bir şekilde araştırılması gerektiğini gündeme getirmektedir.



Şekil 4.10. U87MG hücrelerine uygulanan TMZ, DNF ve radyoterapinin; 24 (A), 48 (B), 72 (C), 96 (D) ve 120 (E) saatlerin sonunda hücre canlılığına etkisi görülmektedir (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib; K1/2/3, Kombine).

4.5.3. T98G Hücrelerine Uygulanan DNF ve Kemoterapinin Değerlendirilmesi

GBM tanısı almış fakat zamanla klinikte uygulanan tedaviye direnç geliştiren veya daha önce tedavi görmesine rağmen cerrahi rezeksiyondan sonra beyinde kalan tümör kalıntısından nüks meydana gelen hastaları da düşünerek deney grupları oluşturuldu. Bu hastalar TMZ'ye karşı zamanla direnç geliştirip, tedaviye etkili yanıt veremedikleri için bu tedaviye ek DNF'nin, *in vitro* ortamlarda T98G hücrelerine uygulanmasının değerlendirilmesi amaçlandı. TMZ ve DNF'nin hem bireysel hem de kombine uygulanmasının ardından elde edilen veriler aşağıda özetlenmiştir.

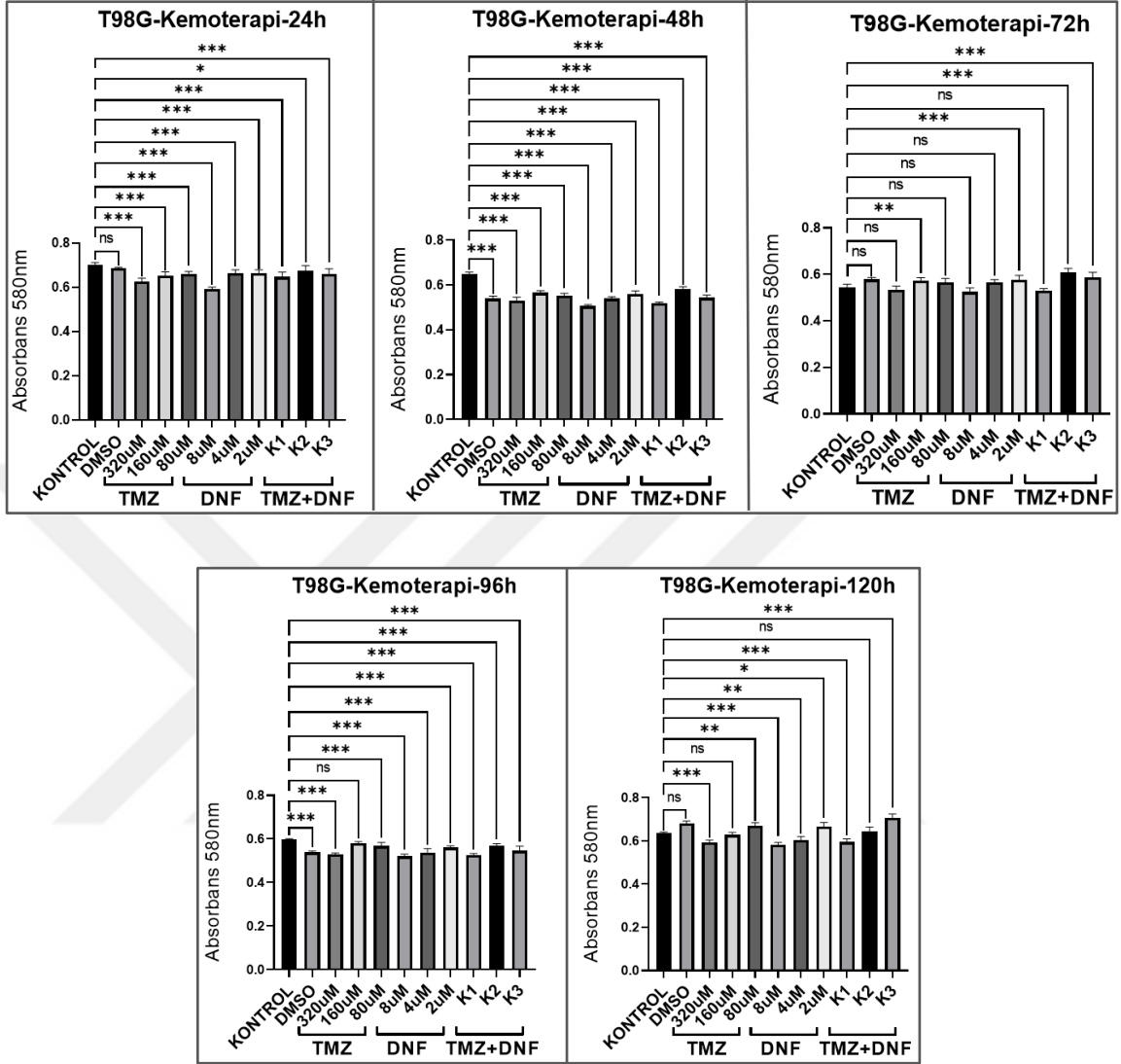
24 saatlik inkübasyon sonunda, TMZ ve DNF'nin hem bireysel hem de kombine uygulamasındaki tüm dozlar anlamlı bulundu. Ek olarak bu etkinin DMSO kaynaklı olmadığı da gösterildi (ns: $p>0.05$, $*p<0.05$, $***p<0.001$) (Şekil 4.11A).

48 saatlik inkübasyon sonunda, uygulanan tüm dozlar anlamlı olarak belirlendi ($***p<0.001$) (Şekil 4.11B).

72 saatlik inkübasyon sonunda, TMZ'ye dirençli olduğunu bildiğimiz bu tümör hücrelerinde tüm dozlar anlamsızdır (ns: $p>0.05$) (Şekil 4.11C). TMZ uygulamasının bu tümör hücrelerinde bir anlam ifade etmemesi, TMZ'ye dirençli hücreler olduğundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

96 saatlik inkübasyon sonunda, IC₅₀ dozunun uygulandığı TMZ grubu dışında tüm dozlar anlamlı bir sonuç ifade etmektedir (ns: $p>0.05$, $***p<0.001$) (Şekil 4.11D). DNF ve kombine dozların uygulandığı grup, tümör hücrelerini en çok öldüren gruptur.

120 saatlik inkübasyon sonunda ise yüksek doz uygulanan TMZ ve kombine grubu ile tüm DNF uygulanan gruplar anlamlıdır (ns: $p>0.05$, $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$) (Şekil 4.11E). Ek olarak, düşük doz DNF ve TMZ'nin hem bireysel hem de kombine uygulaması tümör hücrelerinde artışa neden olmuştur.



Şekil 4.11. T98G hücrelerine uygulanan TMZ ve DNF'nin, hem bireysel hem de kombine uygulamalarında; 24 (A), 48 (B), 72 (C), 96 (D) ve 120 (E) saatlerin sonunda hücre canlılığına etkisi görülmektedir (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib; K1/2/3, Kombine).

4.5.4. T98G Hücrelerine Uygulanan TMZ, DNF ve Radyoterapinin Değerlendirilmesi

T98G hücrelerine TMZ ve DNF uygulamasından bir saat sonra hücrelere günde 2Gy ardışık beş gün boyunca toplam 10Gy ışına yapıldı. 24 saatten başlayarak 120 saate kadar yapılan bu uygulamadan elde edilen veriler aşağıda özetlenmiştir.

24 saatlik inkübasyon sonunda; yüksek doz TMZ, yüksek doz ve IC₅₀ uygulanan DNF grubu ile yüksek ve düşük doz uygulanan kombine grupları anlamlı belirlendi. DMSO'nun tümör hücreleri üzerinde olası bir etkisi bulunmamaktadır (ns: $p > 0.05$, * $p < 0.05$,

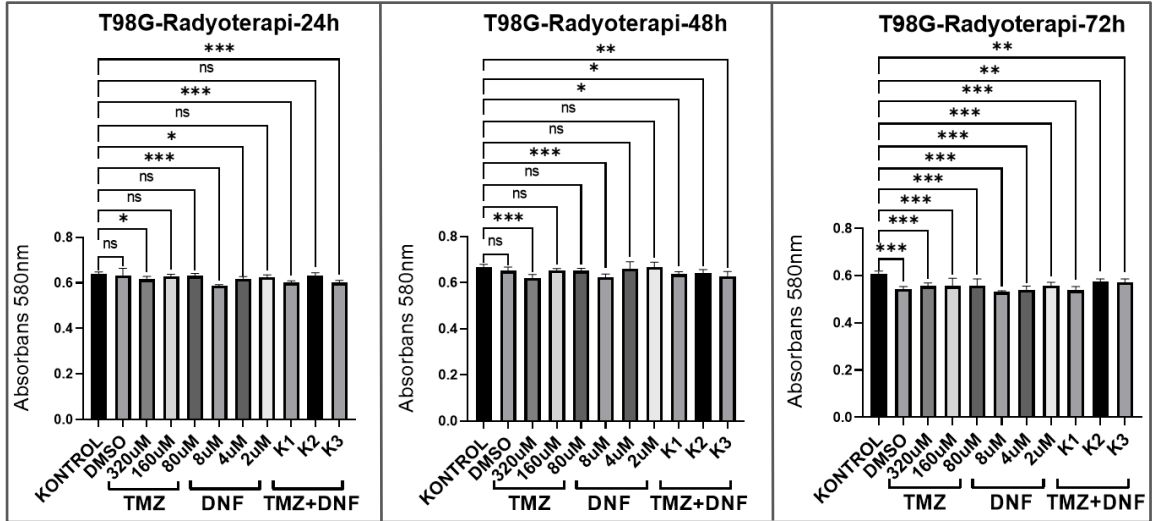
$**p<0.01$, $***p<0.001$) (Şekil 4.12A). Radyoterapi ve TMZ'ye dirençli olduğunu bildiğimiz bu hücrelerde, DNF ve DNF sayesinde olduğunu düşündüğümüz kombine grupların anlamlı olması umut vaat etmektedir.

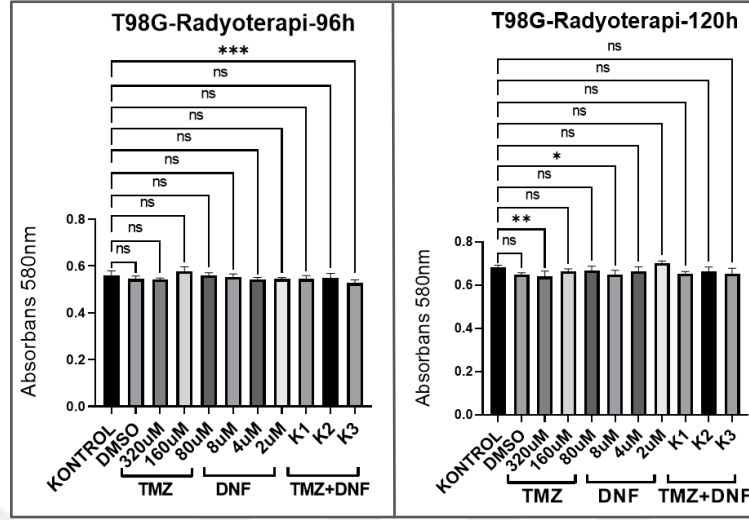
48 saatlik inkübasyon sonunda, bireysel uygulanan TMZ ve DNF gruplarından sadece yüksek doz uygulanan gruplar anlamlı bir sonuç ifade etmektedir. TMZ ve DNF'nin birlikte uygulandığı grupların hepsi tümör hücreleri üzerinde anlamlı ve benzer etki göstermektedir. Ek olarak, DMSO'nun tümör hücrelerine bir etkisinin olmadığı görülmektedir (ns: $p>0.05$, $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$) (Şekil 4.12B).

72 saatlik inkübasyon sonunda, TMZ ve DNF'nin hem bireysel hem de kombine uygulamasındaki tüm dozlar 48 saatlik uygulamaya kıyasla anlamlı görülmektedir $**p<0.01$, $***p<0.001$) (Şekil 4.12C).

96 saatlik inkübasyon sonunda, sadece TMZ ve DNF'nin kombine uygulandığı grup anlamlıdır (ns: $p>0.05$, $***p<0.001$) (Şekil 4.12D).

120 saatlik inkübasyon sonunda ise sadece yüksek doz TMZ ve DNF'nin bireysel uygulamaları anlamlıdır (ns: $p>0.05$, $**p<0.01$) (Şekil 4.12E).





Şekil 4.12. T98G hücrelerine uygulanan TMZ, DNF ve radyoterapinin; 24 (A), 48 (B), 72 (C), 96 (D) ve 120 (E) saatlerin sonunda hücre canlılığına etkisi görülmektedir (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib; K1/2/3, Kombine).

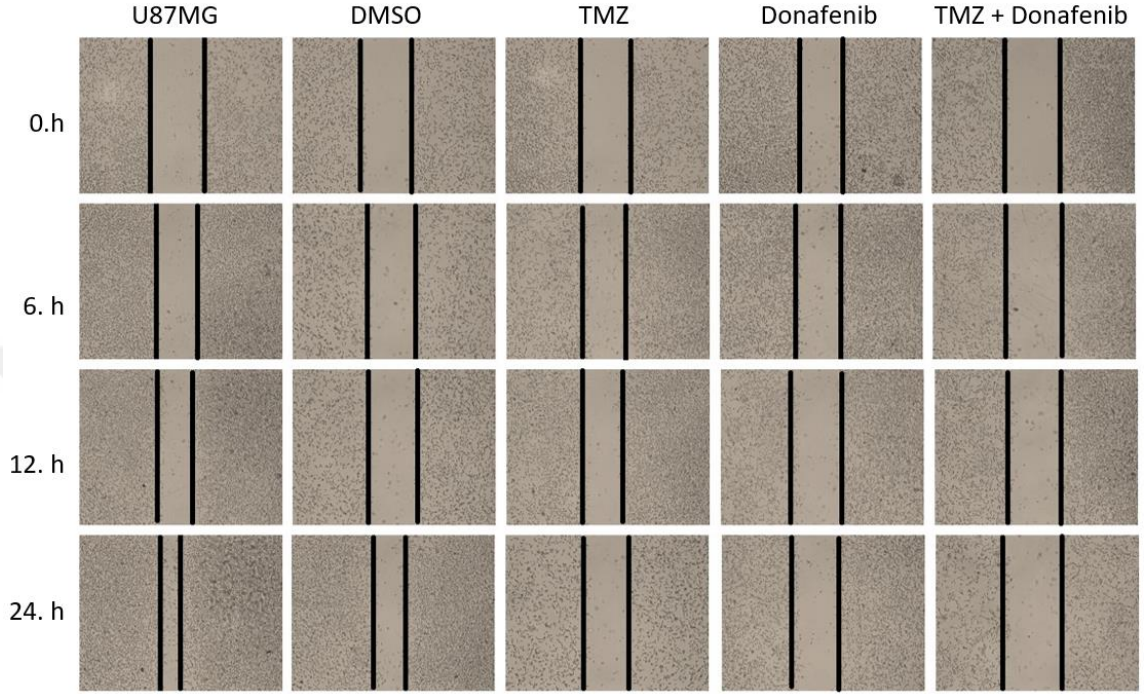
4.6. Migrasyon Analizinin Değerlendirilmesi

Bu iş paketinde U87MG ve T98G hücrelerine, TMZ ve DNF uygulamasından sonra oluşturulan yara izi ile tümör hücrelerinin hareket potansiyelleri değerlendirildi. Gruplar arasındaki değişimler kontrol gruplarıyla kıyaslanarak istatistiksel olarak anlamlandırıldı. Literatürde GBM hücre göçü ile ilgili DNF'nin bireysel ve TMZ ile kombine uygulamasını içeren bir çalışma yer almamaktadır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, TMZ ve DNF'nin hücre göçünü yavaşlatıcı etkisi DNF'nin kombine tedavide umut vaat edici olduğunu göstermektedir.

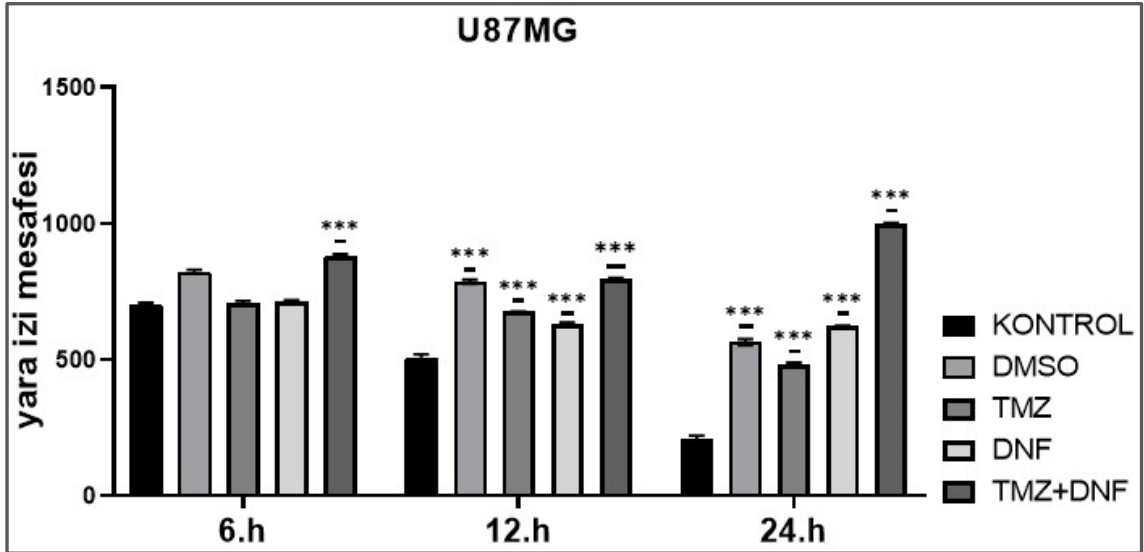
4.6.1. U87MG Hücrelerinin Hareket Potansiyelinin Değerlendirilmesi

U87MG hücrelerine TMZ ve DNF'nin hem bireysel hem de kombine uygulamalarının tümör hücre migrasyonunu azalttığı görüldü (Şekil 4.13). 24. saatin sonunda kontrol grubu olan U87MG tümör hücrelerinin yara izi aralığı proliferasyona bağlı kapanırken; TMZ (120μM) ve DNF'nin (3,4μM), migrasyonu yavaşlatarak tümör hücrelerinin göçünü sınırlandırdığı gösterildi. Gruplar arasındaki yara izi mesafesinin zamana bağlı olarak kapanmaması son derece dikkat çekiciydi. Tümör hücrelerinin en çok kapanma gösterdiği 24. saatin sonunda, kontrol grubuyla kıyaslanarak yapılan istatistiksel analizlerde; TMZ ve DNF'nin hem bireysel hem de kombine uygulamalarının, migrasyonu anlamlı olarak geriletmediği tespit edildi ($***p<0.001$) (Şekil 4.14). Ek olarak, deney grupları arasına çözücü olarak eklenen DMSO grubu ile U87MG hücreleri arasında anlamlı bir fark

görülmedi. Bu durumda bize TMZ ve DNF gruplarında meydana gelen hücre göçündeki azalmanın çözücü kaynaklı olmadığını göstermektedir.



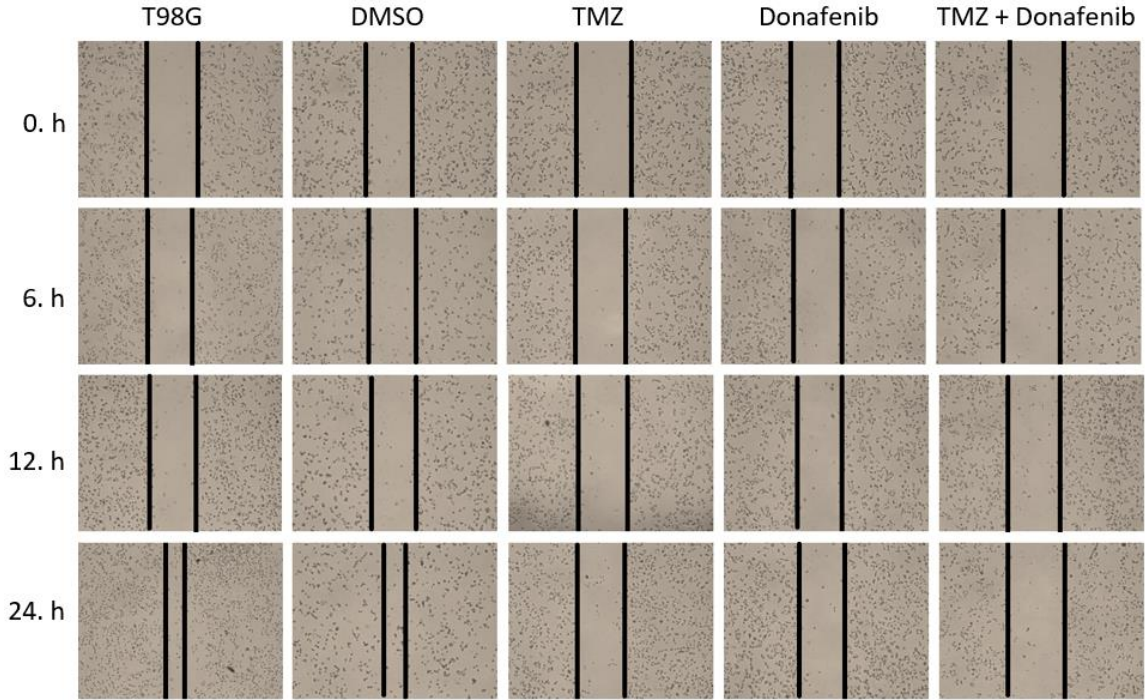
Şekil 4.13. U87MG hücrelerine, TMZ ve DNF uygulamasının ardından hücrelerde oluşturulan yara izi ile hücrelerin hareket potansiyellerindeki değişimleri gösterilmektedir. Tümör hücrelerine uygulanan TMZ ve DNF'nin zamana bağlı hücre migrasyonunu geriletmediği görülmektedir.



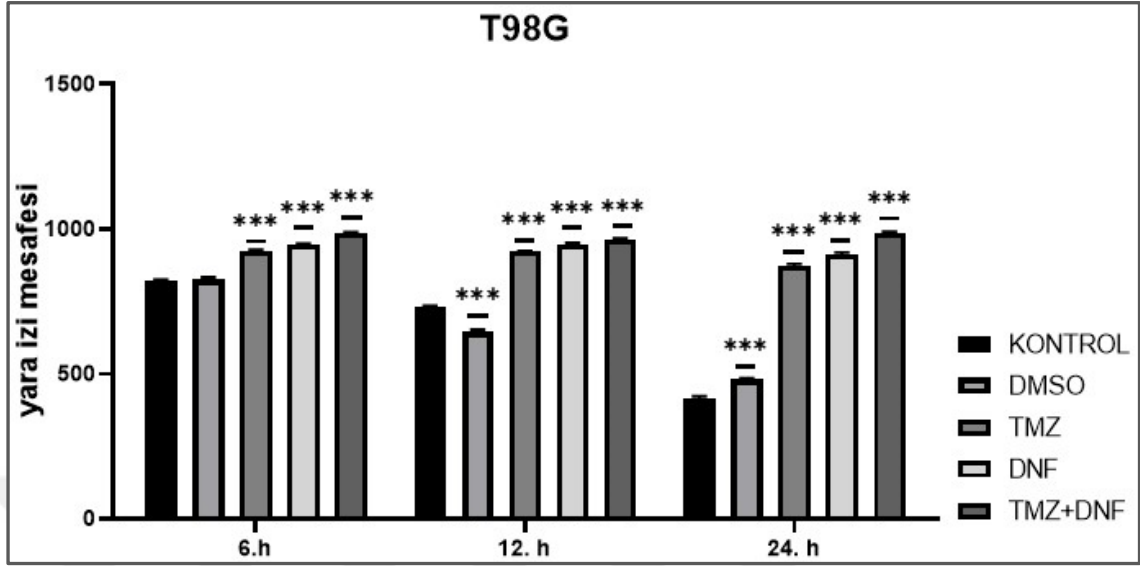
Şekil 4.14. U87MG hücrelerinde 6, 12 ve 24. saatlerde; her grup kendi arasında kıyaslandığında hücre göçünde zamana bağlı bir gerilemenin meydana geldiği görülmektedir. Yapılan istatistiksel analizler sonucu, TMZ ve DNF'nin hem bireysel hem de kombine uygulamasının kontrole kıyasla yara izi mesafesini koruyarak migrasyonu anlamlı düzeyde yavaşlattığı gösterilmektedir.

4.6.2. T98G Hücrelerinin Hareket Potansiyelinin Değerlendirilmesi

T98G hücrelerine, TMZ ve DNF'nin hem bireysel hem de kombine uygulamalarının tümör hücre migrasyonunu yavaşlattığı görüldü (Şekil 4.15). T98G hücrelerinde oluşturulan yara izinde zamana bağlı kapanma görülürken; TMZ (160 μ M) ve DNF (4 μ M) uygulanan gruplarda migrasyonun yavaşladığı ve bu aralığın diğer gruplara kıyasla daha geç kapandığı görülmektedir (Şekil 4.16). Kontrol grubuyla kıyaslanarak yapılan istatistiksel analizler sonucunda; TMZ ve DNF'nin hem bireysel hem kombine uygulamalarının tümör hücrelerinin göçünü anlamlı olarak yavaşlattığı görüldü (** $p < 0.001$) (Şekil 4.16). Ek olarak, DMSO ve T98G grubu arasında anlamlı bir fark görülmeydi.



Şekil 4.15. T98G hücrelerine uygulanan TMZ ve DNF'nin ardından hücrelerde oluşturulan yara izi ile hareket potansiyellerindeki değişimler gösterilmektedir. Tümör hücrelerine uygulanan TMZ ve DNF'nin zamana bağlı hücre migrasyonunu yavaşlattığı görülmektedir.



Şekil 4.16. T98G hücrelerine TMZ ve DNF uygulamasının ardından, her grup kendi arasında kıyaslandığında hücre göçünde zamana bağlı (6, 12 ve 24. saatler) azalma meydana geldiği görülmektedir. Yapılan istatistiksel analizler sonucu, TMZ ve DNF'nin hem bireysel hem de kombine uygulamasının kontrole kıyasla yara izi mesafesini koruyarak migrasyonu anlamlı düzeyde azalttığı gösterilmektedir.

4.7. Western Blot Analizlerinin Değerlendirilmesi

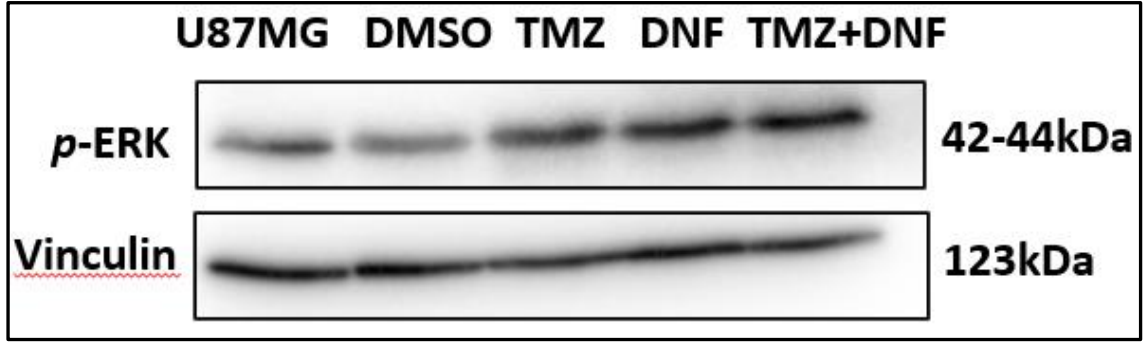
Bu iş paketinde *p*-ERK 1/2'nin *in vitro* gruplarımızda tedavi ajanlarına göre etkinliğinin yorumlanması için Western Blot düzeyinde proteine yansımalarının değerlendirilmesi planlandı. Ancak *p*-ERK 1/2 için deneylerimizde beklenen sonucu alamayınca, projemizin yönünü biraz değiştirmeyi planladık ve bu doğrultuda çalışmamızda olmamasına rağmen Aktif Kaspaz-3'ü değerlendirmeyi uygun bulduk. Tümör hücrelerinin migrasyon ve invazyon kapasitelerini etkileyen DNF'nin, özellikle migrasyon sırasında hücrelerin sağkalımında azalma meydana geldiğini gördüğümüz için bu iş paketinde; DNF'nin hücreleri ölüm yolağına yönlendirip yönlendirmediğinin değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır. DNF'nin hem bireysel hem de TMZ ile kombine olarak GBM hücrelerine uygulanması ile hücrelerin apoptoz yolunu kullanıp kullanmadığı bu parametre ile ilk kez ortaya konuldu. TMZ tedavisine dirençli olan T98G hücrelerinde, TMZ uygulanmasına devam edilmesiyle hücrelerin Aktif Kaspaz-3 ekspre etmedikleri yani apoptotik yolağı kullanmadıkları görülmektedir. Bu durum dirençli hücre hattında TMZ uygulamasının etkisinin hücreleri ölüm yolağına sokmadığının açık bir ifadesidir. Buna karşın; DNF'nin hücrelere bireysel ve kombine uygulanmasının GBM hücrelerinde apoptozu tetiklediği görülmektedir. Bu durumda dirençli hücrelerde TMZ tedavisine ek DNF uygulamasının önemini bir kez daha gündeme gelmiştir.

4.7.1. *p*-ERK 1/2 Protein Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi

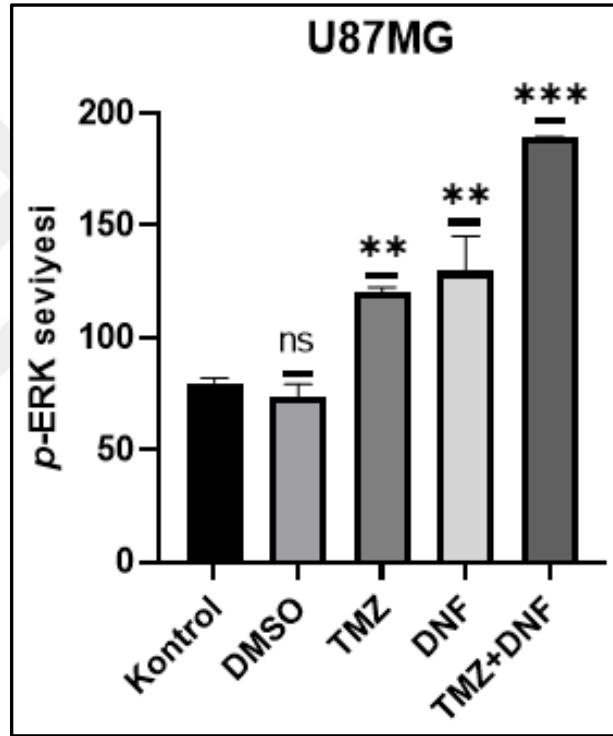
Reseptör tirozin kinazlar (RTK), büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinler gibi hücre dışı sinyal molekülleri için reseptör görevi gören hücre yüzeyi reseptörü ailesidir. RTK'ler; hücre sağkalımı, çoğalması ve farklılaşması gibi çeşitli hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde görev almaktadırlar (Lemmon and Schlessinger 2010). Ligandlar tarafından aktive olan RTK'ler, RAF alt sinyal yolları olan protein kinazları aktive ederler. Raf/MEK/ERK sinyal yolağının aktive olması tümör hücrelerini, proliferasyon ve migrasyona yönlendirmektedir. Bir protein kinaz olan ERK sinyalinin anormal aktivasyonu ise bu protein kinazın fosforilenmesi (*p*-ERK) sonucu tümör oluşumuna neden olmaktadır (Sugiura, Satoh ve ark., 2021). *p*-ERK'in aşırı ekspresyonu çoğu kanser türünde gözlemlenmiştir. Bu yolağın inhibisyonu da tümör hücrelerinin büyümesini engellemektedir (Guo, Pan ve ark., 2020). Tüm bu sonuçlar doğrultusunda, tümör hücrelerinde aşırı ekspre olan *p*-ERK sinyal yolağının ekspresyonel değişimini görmek çalışmamız için önem taşımaktadır. Literatürde daha önce GBM hücrelerinde etkinliği değerlendirilmemiş olan DNF'nin, GBM hücrelerinde *p*-ERK sinyal yolağı üzerindeki etkisinin olup olmadığına dair bir bilgi yer almamaktaydı. DNF'nin TMZ ile bireysel ve kombine uygulanmasının Raf/MEK/ERK sinyal yolağını kullanıp kullanmadığı da *p*-ERK 1/2'nin Western Blot analizi ile değerlendirildi ve bu yolağın etkinliği vurgulanmaya çalışıldı.

4.7.2. U87MG Hücrelerinde *p*-ERK 1/2 Protein Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi

24 saat boyunca belirlenen dozlara maruz bırakılan hücreler için *p*-ERK 1/2 proteini 42-44 kDa olduğundan dolayı internal kontrol olarak Vinculin kullanıldı ve grupların protein seviyeleri tespit edildi (Şekil 4.17.). Elde ettiğimiz Western Blot bantlarını istatistiksel olarak değerlendirdiğimizde; U87MG hücrelerinde, *p*-ERK protein ekspresyon seviyesini belirlemek için her grup kendi internal kontrolü (Vinculin) ile oranlandı. Sonuç olarak, TMZ ve DNF'nin U87MG hücrelerine hem bireysel hem de kombine uygulamasının *p*-ERK protein düzeyini arttırdığı tespit edildi (Şekil 4.17). Elde edilen protein bantları, ImageJ programı ile her bandın kendi internal kontrolü olan Vinculin ile kıyaslanarak grafikleri oluşturuldu (ns: $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) (Şekil 4.18).



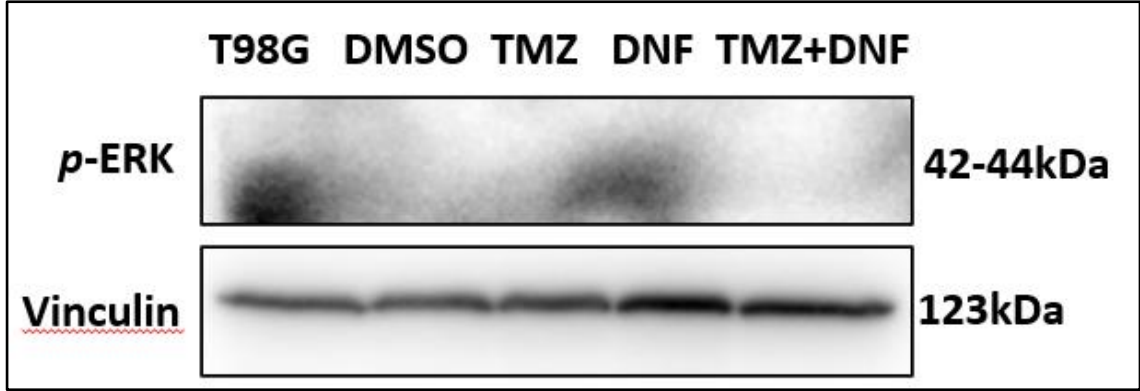
Şekil 4.17. U87MG hücrelerine TMZ ve DNF uygulamasının ardından, Vinculin ve *p*-ERK protein miktarları görülmektedir (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib).



Şekil 4.18. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda *p*-ERK protein miktarlarında, DNF (3.4µM) ve TMZ'nin (120µM) hem bireysel hem de kombine uygulandığı gruplarda artış olduğu tespit edildi (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib).

4.7.3. T98G Hücrelerinde *p*-ERK 1/2 Protein Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi

24 saat boyunca belirlenen dozlara maruz bırakılan hücrelere, internal kontrol olarak Vinculin kullanıldı. Elde ettiğimiz Western Blot bantlarını değerlendirdiğimizde; T98G hücrelerine uygulanan TMZ ve DNF'nin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda, deney birçok kez tekrarlanmasına rağmen bantlarda anlamlı bir ifade elde edilemediği için sonuçlar değerlendirilemedi (Şekil 4. 19).



Şekil 4.19. T98G hücrelerine TMZ ve DNF uygulamasının ardından, Vinculin ve *p*-ERK protein miktarları görülmektedir (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib).

TMZ dirençli T98G GBM hücre hattında da U87MG hücrelerinde olduğu gibi aynı analizler yapıldı. Ancak deney farklı hücre lizatlarıyla farklı zaman dilimlerinde tekrarlanmasına rağmen Western Blot bantlarının düzgün şekilde çıkmaması nedeniyle istatistiksel analiz yapılamadı ve deneyden başarılı bir sonuç elde edilemedi (Şekil 4. 19). Bu iş paketinde T98G hücre hattı ile yapılması planlanan deneyimiz maalesef eksiktir.

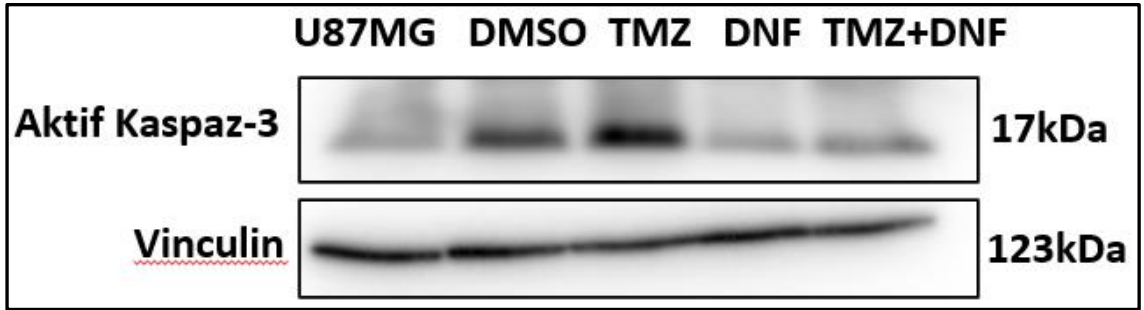
Bunun üzerine DNF ve TMZ'nin bireysel ve kombine uygulamasıyla hem U87MG hem de T98G hücrelerinde meydana gelen Aktif Kaspaz-3 protein seviyesinin değerlendirilmesine karar verildi ve bu parametre teze eklendi.

4.7.4. Aktif Kaspaz-3 Protein Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi

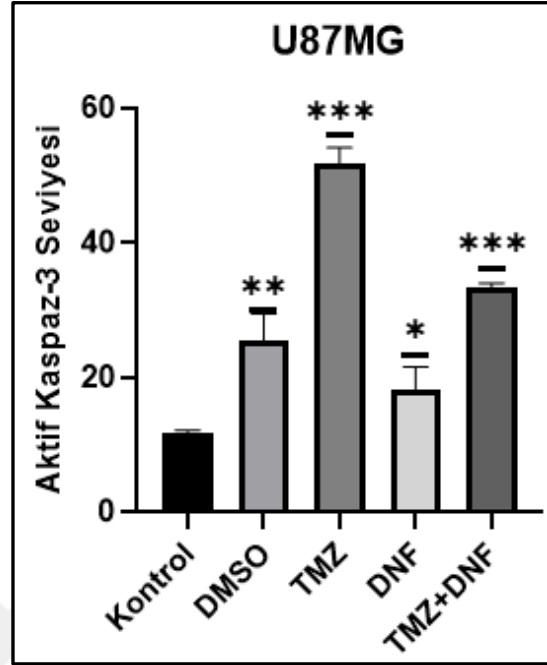
Aktif Kaspaz-3, apoptotik süreçlerde görev alan bir enzimdir. Tümör hücrelerinde Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyon seviyesinin artması hücrelerin dönüşü olmayan bir ölüm yoluna girdiğini ifade etmektedir. Literatürde daha önce GBM hücre sağkalımındaki etkinliği değerlendirilmemiş olan DNF'nin, Aktif Kaspaz-3 proteinindeki ekspresyonel değişimler sonucu apoptoza gidip gitmediğini gösteren bir çalışma yer almamaktadır. Bu yüzden, DNF'nin TMZ ile bireysel ve kombine uygulanmasıyla hücrelerde Aktif Kaspaz-3 protein seviyesindeki değişim ile apoptoza uğrayıp uğramadığı Western Blot analizi yaparak değerlendirildi.

4.7.5. U87MG Hücrelerinde Aktif Kaspaz-3 Protein Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi

Aktif Kaspaz-3 proteinini 17kDa olduğu için internal kontrol olarak 123kDa olan Vinculin tercih edildi. 24 saat boyunca belirlenen dozlara maruz bırakılan hücrelerde, Aktif Kaspaz-3 protein etkinliğini değerlendirmeden önce, örneklerin tüm gruplara eşit yüklendiğinden emin olmak adına Vinculin kullanıldı ve tüm grupların protein seviyeleri belirlendi (Şekil 4.20). Elde ettiğimiz Western Blot bantlarını değerlendirdiğimizde; U87MG hücrelerine uygulanan TMZ ve DNF'nin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda, TMZ grubunun Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyon seviyesini artırdığı ve apoptozu indüklediği görüldü. DNF'nin bireysel uygulamasında ise Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyon seviyesi, Vinculin ile oranlandığında kontrol grubuna göre anlamlı bulundu. TMZ ve DNF'nin kombine uygulamalarında da Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyon seviyesinin anlamlı düzeyde arttığı ve apoptozu indüklediği tespit edildi (Şekil 4.20). Elde edilen protein bantları, ImageJ programı ile her bandın kendi internal kontrolü Vinculin ile kıyaslanarak grafikleri oluşturuldu (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) (Şekil 4.21).



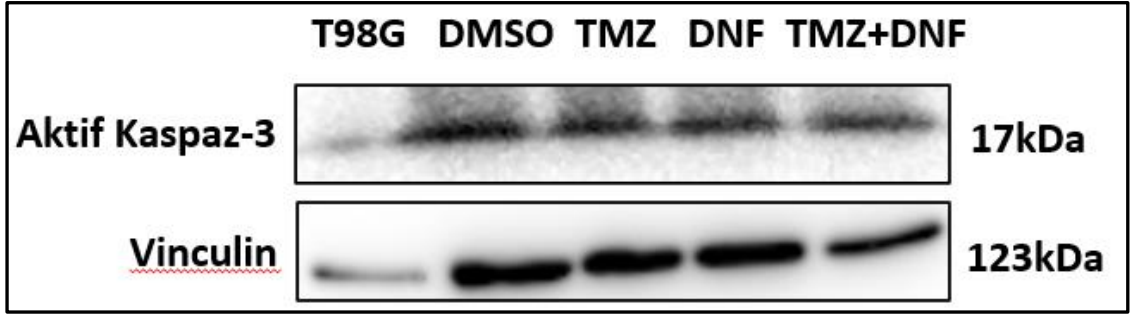
Şekil 4.20. U87MG hücrelerine uygulanan TMZ ve DNF sonrası, gruplardaki Vinculin ve Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyon miktarları görülmektedir (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib).



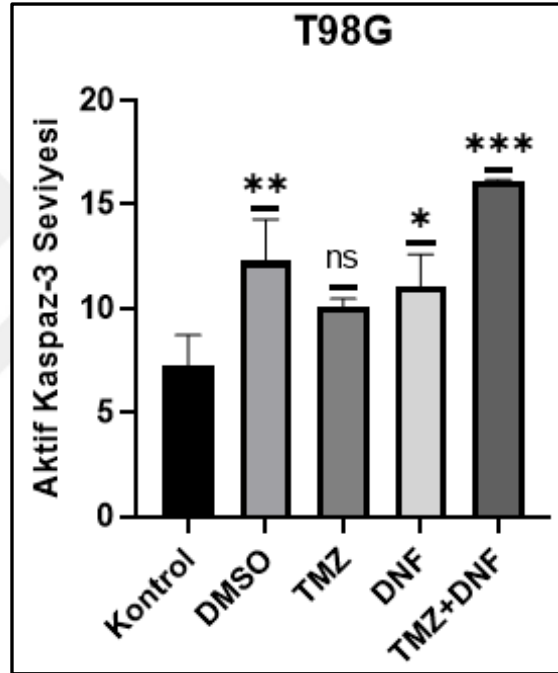
Şekil 4.21. U87MG hücrelerinde Aktif Kaspaz-3 protein seviyesi için, her grup kendi internal kontrolü (Vinculin) ile oranlandığında; özellikle TMZ grubunda Aktif Kaspaz-3 protein seviyesinde artış görüldü. DNF ve kombine uygulanan grupların da, TMZ'ye duyarlı olan bu hücreleri apoptoza uğrattığı tespit edildi (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib).

4.7.6. T98G Hücrelerinde Aktif Kaspaz-3 Protein Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi

T98G hücreleri 24 saat boyunca belirlenen TMZ ve DNF dozlarına maruz bırakıldı. Membrana yüklenen örneklerin eşit olduğunu tespit edebilmek için internal kontrol olarak Vinculin kullanıldı ve protein seviyeleri tüm gruplarda gösterildi (Şekil 4.22). Elde ettiğimiz Western Blot bantlarını istatistiksel olarak değerlendirdiğimizde, T98G hücrelerine uygulanan TMZ ve DNF'nin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda, tedaviye yani TMZ'ye dirençli olduğu bilinen bu hücrelerde TMZ'nin herhangi bir anlam ifade etmemesine rağmen DNF'nin apoptozu indüklediği gösterildi. Buna ilaveten, TMZ ve DNF'nin kombine uygulandığı gruplarda da Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyon seviyesinin arttığı ve yine aynı şekilde apoptozu indüklediği görüldü (Şekil 4.22). Elde edilen protein bantları, ImageJ programı ile her bandın kendi internal kontrolü olan Vinculin ile kıyaslanarak grafikleri oluşturuldu (ns: $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) (Şekil 4.23).



Şekil 4.22. T98G hücrelerine TMZ ve DNF uygulamasının ardından, Vinculin ve Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyon miktarları görülmektedir (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib).



Şekil 4.23. T98G hücrelerinde Aktif Kaspaz-3 protein seviyesi için, her grup kendi internal kontrolü (Vinculin) ile oranlandığında; özellikle TMZ ve DNF'nin kombine uygulandığı grupta Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyon seviyesinde artış tespit edildi. TMZ'nin anlamlı bir sonuç ifade etmemesine rağmen DNF'nin apoptozu indüklediği görüldü (TMZ, Temozolomid; DNF, Donafenib).

Tüm bu sonuçlar doğrultusunda, DNF'nin hem bireysel hem de TMZ ile kombine uygulamasının *p*-ERK protein ekspresyon değişimine etkisi GBM hücrelerinde ilk kez değerlendirildi. Buna ilaveten, bu uygulama sonucunda GBM hücrelerindeki Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyonunun arttığı ve uygulama yapılan gruplarda kontrole kıyasla apoptozun indüklendiği gösterildi. Bu sebeple, TMZ'ye dirençli olan T98G hücrelerinde DNF'nin TMZ ile kombine olarak uygulanması ve daha fazla araştırılması yeni projeler için umut vaad etmektedir.

4.8. İstatistiksel Analizler

Gruplar arasında hücre canlılığı analizleri ile *p*-ERK 1/2 ve Aktif Kaspaz-3 immün reaksiyonları istatistiksel olarak her iş paketinin altında değerlendirildi. Çalışmadan elde edilecek verilerden grup içi değerlendirmeler için Dunnett's Multiple Comparison post-test, gruplar arası değişimlerin değerlendirilmesi için ise Tukey-Kramer multiple comparison test, the Student's paired t-test ve ANOVA testleri kullanıldı ($p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecektir). Elde edilen veriler doğrultusunda grafikler ve değerlendirmeler, GraphPad 8.0.2 programı ile analiz edildi.



5. TARTIŞMA

Hızlı hücresel proliferasyon, yaygın anjiyogenez ve invazyon özelliği olan GBM, yetişkinlerdeki en agresif beyin tümörü tipidir (Wen and Kesari 2008, Jia, Alshamsan et al. 2023). Cerrahi ve farmakolojik tedaviler dahil olmak üzere GBM tedavisindeki önemli ilerlemelere rağmen malign gliomlar, ciddi morbidite ve mortalite ile kötü bir prognoza sahiptirler. Şu an klinikte standart tedavi olarak uygulanan TMZ, en etkili kemoterapi olmasına rağmen, hastaların sağkalım oranları hala kısıtlıdır. Radyoterapi ile eş zamanlı uygulandığında ise sağkalım oranlarının önemli ölçüde arttığı bilinmektedir (Witthayanuwat, Pessee et al. 2018). GBM tedavisindeki en önemli engel, yüksek invazif yapı ve radyoterapi/kemoterapiye karşı zamanla oluşan dirençtir. Ayrıca cerrahi rezeksiyonda tüm gliom hücrelerinin rezeke edilebilmesi tümörün konumundan dolayı zordur; bu da yüksek nüks oranı oluşturmaktadır. Tedavi direncinin altında yatan en önemli nedenlerden biri de sinyal yollarında meydana gelen düzensiz hücresel fonksiyonlardır. Bu nedenle GBM tedavisi için etkili stratejilerin geliştirilmesi gün geçtikçe daha da önem kazanmaktadır (Zhang, Xu et al. 2018).

Küçük molekülü multikinaz inhibitörleri de dahil olmak üzere hedefe yönelik bu tedaviler, birçok kanser hastalarında sağkalım oranlarını önemli ölçüde artırmaktadır (Seebacher, Stacy et al. 2019). Oral yolla alınan DNF; VEGFR, PDGFR ve serin/treonin kinazı baskılayıp tümör hücre proliferasyonu ve anjiyogenezini inhibe eden küçük molekülü yeni bir multikinaz inhibitörüdür (Niu, Yi et al. 2021). DNF'nin farklı tümör hücre hatlarında *in vitro* çalışmalar sonucunda anti-proliferatif özellikleri olduğu vurgulanmış ve bazı tümör hücrelerinde IC₅₀ değerleri belirlenmiştir (Li, Qiu et al. 2020). Ayrıca Haziran 2021'de daha önce sistemik tedavi almamış ve rezeke edilemeyen hepatosellüler karsinomlu hastaların tedavisi için Çin'de ilk onayını almıştır (Keam and Duggan 2021). Fakat GBM hücre hatlarında herhangi bir çalışma literatürde henüz yer almamaktadır.

Çalışmamızla DNF ve TMZ'nin doz taramaları sonucu GBM hücre hatlarındaki IC₅₀ değerleri belirlendi. GBM hücrelerine uyguladığımız TMZ için bulmuş olduğumuz IC₅₀ değerleri literatürdeki yayınlarla benzer niteliktedir (Lee 2016). Buna karşın literatürde

DNF'nin, GBM hücrelerindeki etkisini gösteren bir çalışma olmadığından IC₅₀ değerleri çalışmamızla ilk kez belirlenmiş oldu. DNF'nin hem bireysel hem de TMZ ile kombine uygulamasıyla tümör hücre proliferasyonunu ciddi şekilde azalttığı görüldü. Literatürde TMZ ile yapılan kombine çalışmalarda, tümör hücrelerinin sağkalımında bir azalma olduğu bilinmekle birlikte; direnç kazanmış GBM hücreleri için kombine uygulanan araştırmalar günden güne önem kazanmaktadır (Vengoji, Macha et al. 2019). Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda, direnç kazanmış tümör hücrelerinin proliferasyonunda da azalma olduğu gösterildi. Bu durum da bize DNF'nin, GBM hücrelerinde oldukça etkili olduğu ve daha detaylı bir şekilde araştırılması gerektiğini göstermektedir.

GBM hücre hatlarını kullanarak kliniği taklit etmek üzere kurgulamış olduğumuz bir diğer iş paketimizde, DNF'nin hem TMZ ile hem de TMZ+radoterapiyle eş zamanlı uygulanmasının tümör hücrelerinin sağkalımını azalttığı görüldü. Literatürde radyoterapi uygulamalarının ya tek seferde 10Gy ya da günde 2Gy olmak üzere ardışık beş gün boyunca toplam 10Gy uygulandığı bilinmektedir (Atkins, Stylli et al. 2019). Buradan yola çıkarak çalışmamızda, GBM hücrelerine DNF ve TMZ uygulamalarından yaklaşık bir saat sonra günde 2Gy olmak üzere ardışık beş gün boyunca toplam 10Gy ışıma yapıldı. Şu anda klinikte standart tedavi, bireysel TMZ tedavisinden eş zamanlı uygulanan TMZ ve radyoterapi tedavisinin hasta sağkalımı üzerinde daha etkili sonuçlar verdiği yönündedir (Bhandari, Gandhi et al. 2017). Yapılan literatür araştırmalarında DNF'nin, TMZ ve radyoterapi ile kombine uygulamasına rastlanmamaktadır. Çalışmamızda U87MG ve T98G tümör hücrelerine uygulanan DNF'nin, radyoterapi ve TMZ ile bireysel ve kombine uyguladığımızda da GBM hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı görülmektedir. Ek olarak, TMZ'ye dirençli olduğunu bildiğimiz T98G tümör hücrelerinde, TMZ uygulamasının tek başına bir anlam ifade etmeyip; DNF'nin ve DNF sayesinde olduğunu düşündüğümüz kombine grupların (TMZ+DNF) anlamlı olması da umut vaat etmekte ve bu yaklaşımın tümör hücreleri üzerinde son derece etkili olabileceğini göstermektedir.

GBM tedavisindeki çeşitli engeller hastanın tedavisini kısıtlamaktadır. Bu engellerden biri olan tümör hücrelerinin beyindeki sağlıklı dokulara göç etmesi de tedavideki başka bir zorluğu oluşturmaktadır. GBM hücreleri nadiren metastaz yapmakla birlikte oldukça invazif ve göç etme yeteneğine sahiptirler (Cheng, Chiao et al. 2013). Bu hücreler yıldız

şeklinde yayılım göstererek beynin komşu dokularına mikroskopik dallar uzatabilirler, bu da rezeksiyon sırasında tümör hücrelerinin tamamen çıkarılmasını zorlaştırmaktadır. Ameliyat sonrasında kalan ufak bir tümör kalıntısı bile tümör nüksüne yol açarak hastaların sağkalım oranlarını tehdit etmektedir (Vaid and Schmidt 2023). GBM progresyonunda, hücre göçü ve metastaz anahtar olaylar olarak kabul edilmektedir. Bu sebeple GBM'de hücre göçünü engellemek için yeni terapötik yaklaşımlara ihtiyaç vardır. Yaptığımız literatür araştırmalarında, TMZ'nin hücre göçünü yavaşlatıcı etkisi olduğu görülmüştür. Bir çalışmada, farklı TMZ konsantrasyonları ile U87MG hücrelerinin hareket potansiyeline etkisine değinilmiş ve hücre göçünde yavaşlama olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca TMZ'nin hücre göçünü yavaşlatmasının doza bağlı olabileceğini göstermişlerdir. Ek olarak, bu azalmanın TMZ'nin hücreler üzerindeki anti-proliferatif etkisiyle de olabileceği dikkat çekmektedir (Kılıcı 2021). Bununla birlikte, DNF'nin GBM'in hücre göçüyle ilgili bir bilgi literatürde henüz yer almamaktadır. Tüm bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda, U87MG ve T98G hücrelerine DNF ve TMZ'yi hem bireysel hem de kombine uygulayarak tümör hücrelerinin hareket potansiyellerini değerlendirdik. Her iki hücre hattında da oluşturulan yara izi sonrası 24. saatte kontrol gruplarında (U87MG-T98G) kapanma meydana gelirken; TMZ ve DNF'nin bireysel uygulamalarında kontrole kıyasla kapanma olmadığı görülmektedir. Kombine uygulamalarında ise migrasyonu yavaşlatarak tümör hücre göçünü ciddi şekilde azalttığı gösterildi. Çalışmamızdan elde edilen veriler doğrultusunda; DNF'nin, GBM hücre göçünü engellemede iyi bir terapi potansiyeline sahip olabileceği ve TMZ ile kombine olarak uygulandığında daha etkili olabileceği vurgulandı.

GBM hastalarında artan RAF aktivasyonunu inhibe etmek günümüz çalışmaları arasında yer almaktadır. Normal hücrelerde birer protoonkogen olan RAF, mutasyonlar sonucu onkogene dönüşerek hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına ve farklılaşmasına neden olmaktadır. Bu durum da RAF alt sinyal yolları olan protein kinazları aktive etmektedir. Bir serin/treonin olan ERK, hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasından sorumlu MAPK ailesine ait bir protein kinazdır. ERK genellikle sitoplazmada bulunmakta ve aktive olduğunda çekirdeğe geçerek gen ekspresyonunu düzenlemektedir (Guo, Pan et al. 2020). RAF/ERK/MAPK sinyal yolu hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz gibi çeşitli hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde görev almaktadır (Sun, Xu et al. 2022).

ERK sinyalinin anormal aktivasyonu ise genetik ve epigenetik değişiklikler nedeniyle tümör oluşumuna neden olmaktadır (Sugiura, Satoh et al. 2021). Ovaryum, kolon, meme, tiroit, pankreas, akciğer ve beyin kanserlerinde yüksek ERK ekspresyonu görölmektedir (Garcia-Gomez, Bustelo et al. 2018). RAF/ERK/MAPK sinyal yolunun anormal aktivasyonu normal hücrelerin tümör hücrelerine dönüşmesini sağlarken, bu sinyal yolunun inhibisyonu da tümör hücrelerinin prolifer olmasını engellemektedir (Guo, Pan et al. 2020).

Şu anda FDA tarafından RAF inhibisyonu olarak onay alan ilk ve tek inhibitör Sorafenib'tir. Yapılan çalışmalara bakıldığında Sorafenib'in, Raf kinazın fosforilasyon aktivitesini baskılayarak alt sinyal yollarındaki reseptörleri inhibe ettiği gösterilmiştir (Abdelgalil, Alkahtani et al. 2019, Liu, Hai et al. 2022). Sorafenib'in, FDA tarafından hepatosellüler karsinomlu hastaların tedavisi için onay almasına rağmen yüksek doz ve advers etkilerinden dolayı ciddi yan etkilere yol açtığı bilinmektedir. Bu sebeple ilacın stabilitesini iyileştirmek ve daha düşük dozla yan etkilerin azaltılması için DNF geliştirilmiştir (Li, Qiu et al. 2020). Tüm bu sonuçlar doğrultusunda çalışmamızda, tümör hücrelerinde aşırı ekspre olan *p*-ERK sinyal yolağını değerlendirmeyi hedefledik. Literatürde daha önce GBM hücrelerinde etkinliği hiç değerlendirilmemiş olan DNF'nin, RAF/MEK/ERK sinyal yolağını kullanıp kullanmadığı *p*-ERK 1/2'nin Western Blot analizi ile değerlendirildi ve bu yolağın etkinliği ilk kez ortaya konuldu.

GBM henüz terapötik bir müdahale ile başarılı bir şekilde tedavi edilememiştir. Hayatı tehdit eden bu hastalığı yenmek için etkili teknik ve yeni tedavi yöntemlerinin araştırılması gerekmektedir (Lin, Hseu et al. 2023). GBM tedavisindeki en büyük zorluklardan biri apoptoza karşı dirençtir, bu durum tümör hücrelerinde apoptozun indüklenmesinde önemli bir mekanizma olduğunu düşündürmektedir (Bernard, Chevrier et al. 2019). Yapılan çalışmalar, Kaspaz aktivasyonunun tümör hücrelerinde azaldığı ve tümör hücrelerinin apoptoza uğramadığı yönündedir. Yaptığımız literatür araştırmalarında, GBM hücrelerine TMZ uygulamasıyla Aktif Kaspaz-3 protein aktivasyonunun arttığı ve tümör hücrelerinin apoptozu indüklediği gösterilmektedir (Das, Banik et al. 2004, Xiao, Cao et al. 2013). Fakat literatürde DNF'nin bireysel ve TMZ ile kombine uygulamasının GBM hücrelerindeki etkinliği değerlendiren bir çalışma yer

almamaktadır. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda çalışmamızla, DNF'nin bireysel ve TMZ ile kombine uygulamasının Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyon değişimindeki etkisini ilk kez değerlendirdik. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular, U87MG hücrelerinde Aktif Kaspaz-3 protein seviyesinin, TMZ uygulaması sonrasında arttığı yönündedir. DNF ve kombine uygulanan gruplarında tümör hücrelerini apoptoza uğrattığı tespit edildi. TMZ'ye dirençli olan T98G hücrelerinde TMZ'nin herhangi bir anlam ifade etmemesine rağmen DNF'nin apoptozu indüklediği gösterildi. Buna ilaveten, TMZ ve DNF'nin kombine uygulandığı gruplarda da Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyon seviyesinin arttığı ve apoptozu indüklediği görüldü. Tüm bu sonuçlar, DNF'nin apoptoz mekanizmasındaki etkisinin daha detaylı bir şekilde araştırılması gerektiğini vurgulamaktadır.

Çalışmamızda, DNF'nin GBM hücre hatlarında (Duyarlı-U87MG; Dirençli-T98G) tümör hücre proliferasyonunu ve TMZ+radyoterapiyle eş zamanlı uygulandığında da tümör hücrelerinin sağkalımını azalttığı görüldü. Ayrıca TMZ ve DNF'nin hem bireysel hem de kombine uygulama sonrası oluşturulan yara izi ile tümör hücre hareket potansiyellerinde yavaşlama olduğu gösterildi. Buna ek olarak, DNF'nin hem bireysel hem de TMZ ile kombine uygulamasının, RAF/MEK/ERK sinyal yolağındaki etkinliği ilk kez değerlendirildi. Buna ilaveten, DNF'nin GBM hücrelerinde Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyon seviyesini arttığı ve apoptozun indüklediği ilk kez gösterildi. Sonuç olarak DNF'nin, GBM hücreleri üzerindeki olumlu etkileri bu ajanın daha detaylı bir şekilde araştırılması gerektiğini vurgulamaktadır. Literatürde daha önce DNF'nin GBM hücreleri üzerinde etkileri değerlendirilmediğinden, çalışmamız literatüre ciddi anlamda katkı sağlama potansiyelindedir. Bu bağlamda elde ettiğimiz veriler, literatürde yeni çalışmalara öncülük etme niteliğindedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda, GBM hastaları için standart tedavi olan TMZ ve radyoterapi uygulamasının, *in vitro* ortamda kliniği taklit edebilmek adına deney grupları oluşturuldu. Özellikle bu tedaviye ek yeni bir multikinaz inhibitörü olan DNF'nin, GBM hücrelerindeki etkileri araştırıldı. U87MG ve T98G insan GBM hücre hatlarına uygulanan DNF ve TMZ'nin IC₅₀ değerleri MTT analizi ile belirlendi. Bulunan bu değerlere göre eş zamanlı radyoterapi uygulandı. Ardından, tümör hücrelerinde oluşturulan yara izi ile hücrelerin hareket potansiyelleri değerlendirildi ve tümör hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonunu sınırlandıran bir etkisinin olduğu gösterildi. Ek olarak, GBM hücrelerine DNF ve TMZ uygulamasıyla p-ERK 1/2 ve Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyon seviyeleri Western Blot analizi ile yorumlandı. Çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda sonuçlarımız maddeler halinde özetlenmiştir:

1. DNF'nin GBM hücrelerinde (U87MG-duyarlı; T98G-dirençli), IC₅₀ değerleri ilk kez belirlendi.
2. DNF'nin TMZ ile hem bireysel hem de kombine uygulamasının tümör hücre proliferasyonunu sınırlandırdığı görüldü.
3. Kliniği taklit etmek üzere kurgulamış olduğumuz iş paketimizde, GBM hücrelerine DNF ve TMZ'nin hem bireysel hem de kombine uygulanması ardından da eş zamanlı uygulanan radyoterapinin, tümör hücre sağkalımını azalttığı gösterildi.
4. Her iki hücre hattında da oluşturulan yara izi sonrası 24. saatte kontrol gruplarında kapanma meydana gelirken; TMZ ve DNF'nin bireysel uygulamalarında kontrole kıyasla kapanmanın olmadığı görülmektedir. Kombine uygulamada ise kontrol grubuna kıyasla, tümör hücre göçünün ciddi şekilde gerilediği gösterildi.
5. U87MG hücrelerine uygulanmış olan DNF'nin, RAF/MEK/ERK sinyal yolağını kullanıp kullanmadığı ilk kez ortaya konuldu.

6. Buna ilaveten, GBM hücrelerine DNF'nin hem bireysel hem de TMZ ile kombine uygulanmasıyla hücrelerin apoptoza gidip gitmediği çalışmamızla ilk kez gösterildi.
7. GBM hücrelerine DNF ve TMZ uygulaması ardından, Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyon seviyesinin arttığı ve uygulama yapılan bu hücrelerde apoptozun indüklendiği görüldü.

Elde ettiğimiz veriler, DNF'nin GBM hastalarının tedavisi için olumlu sonuçlar verebileceği fikrini gündeme getirmektedir. GBM hücrelerinde radyoterapi ve TMZ tedavisine ek veya direkt DNF'nin uygulanması literatürde daha önce tanımlanmamıştır. Bu nedenle elde ettiğimiz bulgular, yeni *in vitro* ve *in vivo* projelerin kurgulanmasına yol açarak daha detaylı bir şekilde araştırma yapılmasını sağlayacaktır.

GBM mekanizması ve etkili yolların aydınlatılması;

- TMZ direncinin inhibisyonuna,
- Hasta sağkalımının artmasına,
- Yeni tedavi ajanlarının bulunmasına ve bu sayede daha etkili terapötik yaklaşımlara olanak sağlayabilecek bir potansiyelde olduğundan, konuyla ilgili çalışmalara yön verilmesi ciddi önem içermektedir.

KAYNAKLAR

Abdelgalil, A. A., H. M. Alkahtani and F. I. Al-Jenoobi (2019). "Sorafenib." Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol **44**: 239-266.

Agarwala, S. S. and J. M. Kirkwood (2000). "Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma." Oncologist **5**(2): 144-151.

Alfouzan, A. F. (2021). "Radiation therapy in head and neck cancer." Saudi Med J **42**(3): 247-254.

Alifieris, C. and D. T. Trafalis (2015). "Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment." Pharmacol Ther **152**: 63-82.

Amirian, E. S., Q. T. Ostrom, G. N. Armstrong, R. K. Lai, X. Gu, D. I. Jacobs, A. Jalali, E. B. Claus, J. S. Barnholtz-Sloan, D. Il'yasova, J. M. Schildkraut, F. Ali-Osman, S. Sadetzki, R. B. Jenkins, D. H. Lachance, S. H. Olson, J. L. Bernstein, R. T. Merrell, M. R. Wensch, C. Johansen, R. S. Houlston, M. E. Scheurer, S. Shete, C. I. Amos, B. Melin and M. L. Bondy (2019). "Aspirin, NSAIDs, and Glioma Risk: Original Data from the Glioma International Case-Control Study and a Meta-analysis." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **28**(3): 555-562.

Arcella, A., F. Limanaqi, R. Ferese, F. Biagioni, M. A. Oliva, M. Storto, M. Fanelli, S. Gambardella and F. Fornai (2020). "Dissecting Molecular Features of Gliomas: Genetic Loci and Validated Biomarkers." Int J Mol Sci **21**(2).

Atkins, R. J., S. S. Styli, N. Kurganovs, S. Mangiola, C. J. Nowell, T. M. Ware, N. M. Corcoran, D. V. Brown, A. H. Kaye, A. Morokoff, R. B. Luwor, C. M. Hovens and T. Mantamadiotis (2019). "Cell quiescence correlates with enhanced glioblastoma cell invasion and cytotoxic resistance." Exp Cell Res **374**(2): 353-364.

Barnholtz-Sloan, J. S., Q. T. Ostrom and D. Cote (2018). "Epidemiology of Brain Tumors." Neurol Clin **36**(3): 395-419.

Bastiancich, C., A. Da Silva and M. A. Esteve (2020). "Photothermal Therapy for the Treatment of Glioblastoma: Potential and Preclinical Challenges." Front Oncol **10**: 610356.

Bastiancich, C., P. Danhier, V. Preat and F. Danhier (2016). "Anticancer drug-loaded hydrogels as drug delivery systems for the local treatment of glioblastoma." J Control Release **243**: 29-42.

Bernard, A., S. Chevrier, F. Beltjens, M. Dosset, E. Viltard, A. Lagrange, V. Derangere, A. Oudot, F. Ghiringhelli, B. Collin, L. Apetoh, O. Feron, S. Chen, L. Arnould, F. Vegran and R. Boidot (2019). "Cleaved Caspase-3 Transcriptionally Regulates Angiogenesis-Promoting Chemotherapy Resistance." Cancer Res **79**(23): 5958-5970.

Bhandari, M., A. K. Gandhi, B. Devnani, P. Kumar, D. N. Sharma and P. K. Julka (2017). "Comparative Study of Adjuvant Temozolomide Six Cycles Versus Extended 12 Cycles in Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme." J Clin Diagn Res **11**(5): XC04-XC08.

Bhat, A. A., R. Thapa, O. Afzal, N. Agrawal, W. H. Almalki, I. Kazmi, S. I. Alzarea, A. S. A. Altamimi, P. Prasher, S. K. Singh, K. Dua and G. Gupta (2023). "The pyroptotic role of Caspase-3/GSDME signalling pathway among various cancer: A Review." Int J Biol Macromol **242**(Pt 2): 124832.

Bosio, A. and G. Lombardi (2023). "Recurrent Glioblastoma: What Is the Route?" Cancers (Basel) **15**(7).

Bunevicius, A. and J. P. Sheehan (2021). "Radiosurgery for Glioblastoma." Neurosurg Clin N Am **32**(1): 117-128.

Cha, G. D., T. Kang, S. Baik, D. Kim, S. H. Choi, T. Hyeon and D. H. Kim (2020). "Advances in drug delivery technology for the treatment of glioblastoma multiforme." J Control Release **328**: 350-367.

Cheng, W. Y., M. T. Chiao, Y. J. Liang, Y. C. Yang, C. C. Shen and C. Y. Yang (2013). "Luteolin inhibits migration of human glioblastoma U-87 MG and T98G cells through downregulation of Cdc42 expression and PI3K/AKT activity." Mol Biol Rep **40**(9): 5315-5326.

Chinot, O. L., W. Wick, W. Mason, R. Henriksson, F. Saran, R. Nishikawa, A. F. Carpentier, K. Hoang-Xuan, P. Kavan, D. Cerna, A. A. Brandes, M. Hilton, L. Abrey and T. Cloughesy (2014). "Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma." N Engl J Med **370**(8): 709-722.

Crosby, D., S. Bhatia, K. M. Brindle, L. M. Coussens, C. Dive, M. Emberton, S. Esener, R. C. Fitzgerald, S. S. Gambhir, P. Kuhn, T. R. Rebbeck and S. Balasubramanian (2022). "Early detection of cancer." Science **375**(6586): eaay9040.

Das, A., N. L. Banik, S. J. Patel and S. K. Ray (2004). "Dexamethasone protected human glioblastoma U87MG cells from temozolomide induced apoptosis by maintaining Bax:Bcl-2 ratio and preventing proteolytic activities." Mol Cancer **3**(1): 36.

Davis, M. E. (2016). "Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment." Clin J Oncol Nurs **20**(5 Suppl): S2-8.

DeCordova, S., A. Shastri, A. G. Tsolaki, H. Yasmin, L. Klein, S. K. Singh and U. Kishore (2020). "Molecular Heterogeneity and Immunosuppressive Microenvironment in Glioblastoma." Front Immunol **11**: 1402.

Delello Di Filippo, L., J. Hofstatter Azambuja, J. A. Paes Dutra, M. Tavares Luiz, J. Lobato Duarte, L. R. Nicoleti, S. T. Olalla Saad and M. Chorilli (2021). "Improving temozolomide biopharmaceutical properties in glioblastoma multiforme (GBM) treatment using GBM-targeting nanocarriers." Eur J Pharm Biopharm **168**: 76-89.

Dymova, M. A., E. V. Kuligina and V. A. Richter (2021). "Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Glioblastoma." Int J Mol Sci **22**(12).

Fukushima, T., H. Takeshima and H. Kataoka (2009). "Anti-glioma therapy with temozolomide and status of the DNA-repair gene MGMT." Anticancer Res **29**(11): 4845-4854.

Garcia-Gomez, R., X. R. Bustelo and P. Crespo (2018). "Protein-Protein Interactions: Emerging Oncotargets in the RAS-ERK Pathway." Trends Cancer **4**(9): 616-633.

Gawel, A. M., R. Singh and W. Debinski (2022). "Metal-Based Nanostructured Therapeutic Strategies for Glioblastoma Treatment-An Update." Biomedicines **10**(7).

Giotta Lucifero, A. and S. Luzzi (2021). "Against the Resilience of High-Grade Gliomas: The Immunotherapeutic Approach (Part I)." Brain Sci **11**(3).

Gondi, V. (2021). "Radiotherapy intensification for glioblastoma: enhancing the backbone of treatment." Chin Clin Oncol **10**(4): 39.

Guevara, B., K. Cullison, D. Maziero, G. A. Azzam, M. I. De La Fuente, K. Brown, A. Valderrama, J. Meshman, A. Breto, J. C. Ford and E. A. Mellon (2023). "Simulated Adaptive Radiotherapy for Shrinking Glioblastoma Resection Cavities on a Hybrid MRI-Linear Accelerator." Cancers (Basel) **15**(5).

Guo, Y. J., W. W. Pan, S. B. Liu, Z. F. Shen, Y. Xu and L. L. Hu (2020). "ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis." Exp Ther Med **19**(3): 1997-2007.

Hanahan, D. (2022). "Hallmarks of Cancer: New Dimensions." Cancer Discov **12**(1): 31-46.

Hanif, F., K. Muzaffar, K. Perveen, S. M. Malhi and U. Simjee Sh (2017). "Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment." Asian Pac J Cancer Prev **18**(1): 3-9.

Herholz, K., K. J. Langen, C. Schiepers and J. M. Mountz (2012). "Brain tumors." Semin Nucl Med **42**(6): 356-370.

Herrera-Oropeza, G. E., C. Angulo-Rojo, S. A. Gastelum-Lopez, A. Varela-Echavarria, M. Hernandez-Rosales and K. Avina-Padilla (2021). "Glioblastoma multiforme: a multi-omics analysis of driver genes and tumour heterogeneity." Interface Focus **11**(4): 20200072.

Higuchi, F., H. Nagashima, J. Ning, M. V. A. Koerner, H. Wakimoto and D. P. Cahill (2020). "Restoration of Temozolomide Sensitivity by PARP Inhibitors in Mismatch Repair Deficient Glioblastoma is Independent of Base Excision Repair." Clin Cancer Res **26**(7): 1690-1699.

- Hotchkiss, K. M. and J. H. Sampson (2021). "Temozolomide treatment outcomes and immunotherapy efficacy in brain tumor." J Neurooncol **151**(1): 55-62.
- Huang, B., X. Li, Y. Li, J. Zhang, Z. Zong and H. Zhang (2020). "Current Immunotherapies for Glioblastoma Multiforme." Front Immunol **11**: 603911.
- Hubbard, S. R. and W. T. Miller (2007). "Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling." Curr Opin Cell Biol **19**(2): 117-123.
- Huse, J. T. and E. C. Holland (2010). "Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma." Nat Rev Cancer **10**(5): 319-331.
- Jia, J. L., B. Alshamsan and T. L. Ng (2023). "Temozolomide Chronotherapy in Glioma: A Systematic Review." Curr Oncol **30**(2): 1893-1902.
- Jiapaer, S., T. Furuta, S. Tanaka, T. Kitabayashi and M. Nakada (2018). "Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma." Neurol Med Chir (Tokyo) **58**(10): 405-421.
- Jnaidi, R., A. J. Almeida and L. M. Goncalves (2020). "Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers as Smart Drug Delivery Systems in the Treatment of Glioblastoma Multiforme." Pharmaceutics **12**(9).
- Kanu, O. O., A. Mehta, C. Di, N. Lin, K. Bortoff, D. D. Bigner, H. Yan and D. C. Adamson (2009). "Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets." Expert Opin Ther Targets **13**(6): 701-718.
- Karachi, A., F. Dastmalchi, D. A. Mitchell and M. Rahman (2018). "Temozolomide for immunomodulation in the treatment of glioblastoma." Neuro Oncol **20**(12): 1566-1572.
- Kashyap, D., V. K. Garg and N. Goel (2021). "Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis." Adv Protein Chem Struct Biol **125**: 73-120.
- Kazmi, F., Y. Y. Soon, Y. H. Leong, W. Y. Koh and B. Vellayappan (2019). "Re-irradiation for recurrent glioblastoma (GBM): a systematic review and meta-analysis." J Neurooncol **142**(1): 79-90.
- Keam, S. J. and S. Duggan (2021). "Donafenib: First Approval." Drugs **81**(16): 1915-1920.
- Khabibov, M., A. Garifullin, Y. Bumber, K. Khaddour, M. Fernandez, F. Khamitov, L. Khalikova, N. Kuznetsova, O. Kit and L. Kharin (2022). "Signaling pathways and therapeutic approaches in glioblastoma multiforme (Review)." Int J Oncol **60**(6).
- Kılıcı, M. P. a. C. (2021). "The effect of temozolomide on Hsp60 and Hsp70 expression in extracellular vesicles derived from U87MG glioma cells."

- Kolch, W. (2000). "Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions." Biochem J **351 Pt 2**: 289-305.
- Krakstad, C. and M. Chekenya (2010). "Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics." Mol Cancer **9**: 135.
- Kyriakou, I., N. Yarandi and E. Polycarpou (2021). "Efficacy of cannabinoids against glioblastoma multiforme: A systematic review." Phytomedicine **88**: 153533.
- Lee, S. Y. (2016). "Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme." Genes Dis **3(3)**: 198-210.
- Lemmon, M. A. and J. Schlessinger (2010). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **141(7)**: 1117-1134.
- Li, E. and K. Hristova (2006). "Role of receptor tyrosine kinase transmembrane domains in cell signaling and human pathologies." Biochemistry **45(20)**: 6241-6251.
- Li, X., M. Qiu, S. Wang, H. Zhu, B. Feng and L. Zheng (2020). "A Phase I dose-escalation, pharmacokinetics and food-effect study of oral donafenib in patients with advanced solid tumours." Cancer Chemother Pharmacol **85(3)**: 593-604.
- Li, Y., Z. X. Zhang, G. H. Huang, Y. Xiang, L. Yang, Y. C. Pei, W. Yang and S. Q. Lv (2021). "A systematic review of multifocal and multicentric glioblastoma." J Clin Neurosci **83**: 71-76.
- Lim, J. H., E. S. Lee, H. J. You, J. W. Lee, J. W. Park and Y. S. Chun (2004). "Ras-dependent induction of HIF-1 α 785 via the Raf/MEK/ERK pathway: a novel mechanism of Ras-mediated tumor promotion." Oncogene **23(58)**: 9427-9431.
- Lin, N., W. Yan, K. Gao, Y. Wang, J. Zhang and Y. You (2014). "Prevalence and clinicopathologic characteristics of the molecular subtypes in malignant glioma: a multi-institutional analysis of 941 cases." PLoS One **9(4)**: e94871.
- Lin, Y. P., Y. C. Hseu, V. Thiyagarajan, C. Vadivalagan, S. Pandey, K. Y. Lin, Y. T. Hsu, J. W. Liao, C. C. Lee and H. L. Yang (2023). "The in vitro and in vivo anticancer activities of *Antrodia salmonea* through inhibition of metastasis and induction of ROS-mediated apoptotic and autophagic cell death in human glioblastoma cells." Biomed Pharmacother **158**: 114178.
- Liu, X., Q. Guo, G. Gao, Z. Cao, Z. Guan, B. Jia, W. Wang, K. Zhang, W. Zhang, S. Wang, W. Li, Q. Hao, Y. Zhang, M. Li, W. Zhang and J. Gu (2023). "Exosome-transmitted circCABIN1 promotes temozolomide resistance in glioblastoma via sustaining ErbB downstream signaling." J Nanobiotechnology **21(1)**: 45.
- Liu, X., Y. Hai, J. Dong, L. Xu, W. Hou, J. Su, W. Ren and D. Liu (2022). "Realgar-induced KRAS mutation lung cancer cell death via KRAS/Raf/MAPK mediates ferroptosis." Int J Oncol **61(6)**.

Louis, D. N., H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer and P. Kleihues (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." Acta Neuropathol **114**(2): 97-109.

Maher, E. A., F. B. Furnari, R. M. Bachoo, D. H. Rowitch, D. N. Louis, W. K. Cavenee and R. A. DePinho (2001). "Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter." Genes Dev **15**(11): 1311-1333.

Martin, D. H., E. Bianchi, S. Ben Mustapha and P. Freres (2021). "[Glioblastoma]." Rev Med Liege **76**(5-6): 419-424.

Minniti, G., M. Niyazi, F. Alongi, P. Navarria and C. Belka (2021). "Current status and recent advances in reirradiation of glioblastoma." Radiat Oncol **16**(1): 36.

Mortezaee, K., E. Salehi, H. Mirtavoos-Mahyari, E. Motevaseli, M. Najafi, B. Farhood, R. J. Rosengren and A. Sahebkar (2019). "Mechanisms of apoptosis modulation by curcumin: Implications for cancer therapy." J Cell Physiol **234**(8): 12537-12550.

Navarria, P., G. Minniti, E. Clerici, S. Tomatis, V. Pinzi, P. Ciammella, M. Galaverni, D. Amelio, D. Scartoni, S. Scoccianti, M. Krengli, L. Masini, L. Draghini, E. Maranzano, V. Borzillo, P. Muto, F. Ferrarese, L. Fariselli, L. Livi, F. Pasqualetti, A. Fiorentino, F. Alongi, M. B. di Monale, S. Magrini and M. Scorsetti (2019). "Re-irradiation for recurrent glioma: outcome evaluation, toxicity and prognostic factors assessment. A multicenter study of the Radiation Oncology Italian Association (AIRO)." J Neurooncol **142**(1): 59-67.

Nelson, S. D. and W. F. Trager (2003). "The use of deuterium isotope effects to probe the active site properties, mechanism of cytochrome P450-catalyzed reactions, and mechanisms of metabolically dependent toxicity." Drug Metab Dispos **31**(12): 1481-1498.

Niu, M., M. Yi, N. Li, K. Wu and K. Wu (2021). "Advances of Targeted Therapy for Hepatocellular Carcinoma." Front Oncol **11**: 719896.

Ohgaki, H., P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, T. Nishikawa, P. L. Di Patre, C. Burkhard, D. Schuler, N. M. Probst-Hensch, P. C. Maiorka, N. Baeza, P. Pisani, Y. Yonekawa, M. G. Yasargil, U. M. Lutolf and P. Kleihues (2004). "Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study." Cancer Res **64**(19): 6892-6899.

Ohgaki, H. and P. Kleihues (2013). "The definition of primary and secondary glioblastoma." Clin Cancer Res **19**(4): 764-772.

Omay, S. B. and M. A. Vogelbaum (2009). "Current concepts and newer developments in the treatment of malignant gliomas." Indian J Cancer **46**(2): 88-95.

Ortiz, R., L. Cabeza, G. Perazzoli, J. Jimenez-Lopez, B. Garcia-Pinel, C. Melguizo and J. Prados (2019). "Nanoformulations for glioblastoma multiforme: a new hope for treatment." Future Med Chem **11**(18): 2459-2480.

Ostrom, Q. T., L. Bauchet, F. G. Davis, I. Deltour, J. L. Fisher, C. E. Langer, M. Pekmezci, J. A. Schwartzbaum, M. C. Turner, K. M. Walsh, M. R. Wrensch and J. S. Barnholtz-Sloan (2014). "The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review." Neuro Oncol **16**(7): 896-913.

Ostrom, Q. T., H. Gittleman, P. Farah, A. Ondracek, Y. Chen, Y. Wolinsky, N. E. Stroup, C. Kruchko and J. S. Barnholtz-Sloan (2013). "CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010." Neuro Oncol **15 Suppl 2**(Suppl 2): ii1-56.

Owonikoko, T. K., J. Arbiser, A. Zelnak, H. K. Shu, H. Shim, A. M. Robin, S. N. Kalkanis, T. G. Whitsett, B. Salhia, N. L. Tran, T. Ryken, M. K. Moore, K. M. Egan and J. J. Olson (2014). "Current approaches to the treatment of metastatic brain tumours." Nat Rev Clin Oncol **11**(4): 203-222.

Pant, A. and M. Lim (2023). "CAR-T Therapy in GBM: Current Challenges and Avenues for Improvement." Cancers (Basel) **15**(4).

Pearson, J. R. D. and T. Regad (2017). "Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme." Signal Transduct Target Ther **2**: 17040.

Perkins, A. and G. Liu (2016). "Primary Brain Tumors in Adults: Diagnosis and Treatment." Am Fam Physician **93**(3): 211-217.

Qin, S., F. Bi, S. Gu, Y. Bai, Z. Chen, Z. Wang, J. Ying, Y. Lu, Z. Meng, H. Pan, P. Yang, H. Zhang, X. Chen, A. Xu, C. Cui, B. Zhu, J. Wu, X. Xin, J. Wang, J. Shan, J. Chen, Z. Zheng, L. Xu, X. Wen, Z. You, Z. Ren, X. Liu, M. Qiu, L. Wu and F. Chen (2021). "Donafenib Versus Sorafenib in First-Line Treatment of Unresectable or Metastatic Hepatocellular Carcinoma: A Randomized, Open-Label, Parallel-Controlled Phase II-III Trial." J Clin Oncol **39**(27): 3002-3011.

Ramalho, M. J., S. Andrade, M. A. N. Coelho, J. A. Loureiro and M. C. Pereira (2019). "Biophysical interaction of temozolomide and its active metabolite with biomembrane models: The relevance of drug-membrane interaction for Glioblastoma Multiforme therapy." Eur J Pharm Biopharm **136**: 156-163.

Rao, A. M., A. Quddusi and M. S. Shamim (2018). "The significance of MGMT methylation in Glioblastoma Multiforme prognosis." J Pak Med Assoc **68**(7): 1137-1139.

Rosinska, S. and J. Gavard (2021). "Tumor Vessels Fuel the Fire in Glioblastoma." Int J Mol Sci **22**(12).

Roskoski, R., Jr. (2018). "Targeting oncogenic Raf protein-serine/threonine kinases in human cancers." Pharmacol Res **135**: 239-258.

Roy, P. S. and B. J. Saikia (2016). "Cancer and cure: A critical analysis." Indian J Cancer **53**(3): 441-442.

Schaffnerath, J., T. Wyss, L. He, E. J. Rushing, M. Delorenzi, F. Vasella, L. Regli, M. C. Neidert and A. Keller (2021). "Blood-brain barrier alterations in human brain tumors revealed by genome-wide transcriptomic profiling." Neuro Oncol **23**(12): 2095-2106.

Seebacher, N. A., A. E. Stacy, G. M. Porter and A. M. Merlot (2019). "Clinical development of targeted and immune based anti-cancer therapies." J Exp Clin Cancer Res **38**(1): 156.

Senga, S. S. and R. P. Grose (2021). "Hallmarks of cancer-the new testament." Open Biol **11**(1): 200358.

Shah, V. and P. Kochar (2018). "Brain Cancer: Implication to Disease, Therapeutic Strategies and Tumor Targeted Drug Delivery Approaches." Recent Pat Anticancer Drug Discov **13**(1): 70-85.

Singh, N., A. Miner, L. Hennis and S. Mittal (2021). "Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review." Cancer Drug Resist **4**(1): 17-43.

Strickland, M. and E. A. Stoll (2017). "Metabolic Reprogramming in Glioma." Front Cell Dev Biol **5**: 43.

Stupp, R., M. Gander, S. Leyvraz and E. Newlands (2001). "Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours." Lancet Oncol **2**(9): 552-560.

Stupp, R., M. E. Hegi, T. Gorlia, S. C. Erridge, J. Perry, Y. K. Hong, K. D. Aldape, B. Lhermitte, T. Pietsch, D. Grujicic, J. P. Steinbach, W. Wick, R. Tarnawski, D. H. Nam, P. Hau, A. Weyerbrock, M. J. Taphoorn, C. C. Shen, N. Rao, L. Thurzo, U. Herrlinger, T. Gupta, R. D. Kortmann, K. Adamska, C. McBain, A. A. Brandes, J. C. Tonn, O. Schnell, T. Wiegel, C. Y. Kim, L. B. Nabors, D. A. Reardon, M. J. van den Bent, C. Hicking, A. Markivskyy, M. Picard, M. Weller, R. European Organisation for, C. Treatment of, C. Canadian Brain Tumor and C. s. team (2014). "Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial." Lancet Oncol **15**(10): 1100-1108.

Stupp, R., M. E. Hegi, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. J. Taphoorn, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, A. Allgeier, B. Fisher, K. Belanger, P. Hau, A. A. Brandes, J. Gijtenbeek, C. Marosi, C. J. Vecht, K. Mokhtari, P. Wesseling, S. Villa, E. Eisenhauer, T. Gorlia, M. Weller, D. Lacombe, J. G. Cairncross, R. O. Mirimanoff, R. European Organisation for, T. Treatment of Cancer Brain, G. Radiation Oncology and G. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials (2009). "Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial." Lancet Oncol **10**(5): 459-466.

Sugiura, R., R. Satoh and T. Takasaki (2021). "ERK: A Double-Edged Sword in Cancer. ERK-Dependent Apoptosis as a Potential Therapeutic Strategy for Cancer." Cells **10**(10).

Sun, J., Y. Xu, J. Liu, H. Cui, H. Cao and J. Ren (2022). "PDRG1 promotes the proliferation and migration of GBM cells by the MEK/ERK/CD44 pathway." Cancer Sci **113**(2): 500-516.

Tamimi, A. F. and M. Juweid (2017). Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. Glioblastoma. S. De Vleeschouwer. Brisbane (AU).

Vaid, S. and M. H. H. Schmidt (2023). "Migration-Associated Transportome and Therapeutic Potential in Glioblastoma Multiforme (GBM)." Cancers (Basel) **15**(13).

Vengoji, R., M. A. Macha, R. K. Nimmakayala, S. Rachagani, J. A. Siddiqui, K. Mallya, S. Gorantla, M. Jain, M. P. Ponnusamy, S. K. Batra and N. Shonka (2019). "Afatinib and Temozolomide combination inhibits tumorigenesis by targeting EGFRvIII-cMet signaling in glioblastoma cells." J Exp Clin Cancer Res **38**(1): 266.

Wainwright, D. A., A. L. Chang, M. Dey, I. V. Balyasnikova, C. K. Kim, A. Tobias, Y. Cheng, J. W. Kim, J. Qiao, L. Zhang, Y. Han and M. S. Lesniak (2014). "Durable therapeutic efficacy utilizing combinatorial blockade against IDO, CTLA-4, and PD-L1 in mice with brain tumors." Clin Cancer Res **20**(20): 5290-5301.

Wang, D., C. Wang, L. Wang and Y. Chen (2019). "A comprehensive review in improving delivery of small-molecule chemotherapeutic agents overcoming the blood-brain/brain tumor barriers for glioblastoma treatment." Drug Deliv **26**(1): 551-565.

Wen, P. Y. and S. Kesari (2008). "Malignant gliomas in adults." N Engl J Med **359**(5): 492-507.

Wesolowski, J. R., P. Rajdev and S. K. Mukherji (2010). "Temozolomide (Temodar)." AJNR Am J Neuroradiol **31**(8): 1383-1384.

Withayanuwat, S., M. Pesee, C. Supaadirek, N. Supakalin, K. Thamronganantasakul and S. Krusun (2018). "Survival Analysis of Glioblastoma Multiforme." Asian Pac J Cancer Prev **19**(9): 2613-2617.

Wu, C., M. E. Muroski, J. Miska, C. Lee-Chang, Y. Shen, A. Rashidi, P. Zhang, T. Xiao, Y. Han, A. Lopez-Rosas, Y. Cheng and M. S. Lesniak (2019). "Repolarization of myeloid derived suppressor cells via magnetic nanoparticles to promote radiotherapy for glioma treatment." Nanomedicine **16**: 126-137.

Wu, S., X. Li, F. Gao, J. F. de Groot, D. Koul and W. K. A. Yung (2021). "PARP-mediated PARylation of MGMT is critical to promote repair of temozolomide-induced O6-methylguanine DNA damage in glioblastoma." Neuro Oncol **23**(6): 920-931.

Xiao, X., W. Cao, X. Jiang, W. Zhang, Y. Zhang, B. Liu, J. Cheng, H. Huang, J. Huo and X. Zhang (2013). "Glaucocalyxin A, a negative Akt regulator, specifically induces apoptosis in human brain glioblastoma U87MG cells." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **45**(11): 946-952.

Yang, Y., H. Zhu and Q. Li (2021). "Partial response of donafenib as the third-line therapy in metastatic colon cancer: A case report." Medicine (Baltimore) **100**(37): e27204.

Yin, X., J. Zhang, X. Li, D. Liu, C. Feng, R. Liang, K. Zhuang, C. Cai, X. Xue, F. Jing, X. Wang, J. Wang, X. Liu and H. Ma (2014). "DADS suppresses human esophageal xenograft tumors through RAF/MEK/ERK and mitochondria-dependent pathways." Int J Mol Sci **15**(7): 12422-12441.

Yoshimoto, K., M. Mizoguchi, N. Hata, H. Murata, R. Hatae, T. Amano, A. Nakamizo and T. Sasaki (2012). "Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma." Front Oncol **2**: 186.

Zhang, Y. J., Z. G. Xu, S. Q. Li, L. J. He, Y. Tang, Z. Z. Chen and D. L. Yang (2018). "Benzimidazoisquinoline derivatives inhibit glioblastoma cell proliferation through down-regulating Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT pathways." Cancer Cell Int **18**: 90.

Zhong, L., C. Hou, L. Zhang, J. Zhao, F. Li and W. Li (2019). "Synthesis of deuterium-enriched sorafenib derivatives and evaluation of their biological activities." Mol Divers **23**(2): 341-350.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Emine	Uyruğu	T.C.
Soyadı	YAZICI	e-posta	
Doğum tarihi		Tel no	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Özel Antalya Doruk Anadolu Lisesi	2016
Lisans	Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Bölümü	2020
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı	2024

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Stajyer	Kadın Doğum Polikliniği, Afyon Kocatepe Üniversite Hastanesi	2016
Stajyer	EKG, Afyon Kocatepe Üniversite Hastanesi	2016
Stajyer	Diyaliz, Afyon Kocatepe Üniversite Hastanesi	2017
Stajyer	Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesi, Afyon Kocatepe Üniversite Hastanesi	2017
Stajyer	Göz Hastalıkları Polikliniği, Afyon Kocatepe Üniversite Hastanesi	2018
Stajyer	Ameliyathane, Afyon Kocatepe Üniversite Hastanesi	2019
Stajyer	Beyin Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi, Afyon Kocatepe Üniversite Hastanesi	2019
Stajyer	Yeni Doğan Yoğun Bakım Ünitesi, Afyon Kocatepe Üniversite Hastanesi	2020

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL-Sağlık	53,75

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Temozolomid (TMZ) Dirençli ve Normal Glioblastoma Multiforme (GBM) Hücre Hatlarında Donafenib ve Radyoterapi Uygulamasının Hücre Sağkalımı Açısından Değerlendirilmesi	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (TYL-2022-5990) TÜBİTAK-1002 (122Z788)	2022-2023
Fare Meme Kanseri Modelinde Rottlerinin Eef2 Kinaz Üzerine Etkisinin İmmün ve Metastatik Yanıtlar Açısından Değerlendirilmesi	TÜBİTAK-1001 (119S564)	2019-2022
Glioblastoma Multiform'da (GBM) Tümör Sağkalımı ve İlerlemesinde TAS-115'in c-MET/HGF ve VEGFR Aracılı Sinyal Yolakları Üzerine Çok Yönlü Etkisinin <i>In Vitro</i> ve <i>In Vivo</i> Olarak Değerlendirilmesi	TÜBİTAK-1001 (123Z289)	2023,
Üçlü Negatif Meme Kanseriinde Abemasiklib Yüklü Lipid-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Terapötik Etkisinin Araştırılması	TÜBİTAK-3501	2022,
Vortiksetinin, Enterik Sinir Sisteminde Rotenon Maruziyeti ile İndüklenen Patofizyolojik Değişiklikler Üzerine Etkilerinde Tlr2/S100b Sinyal Yolağının Rolü	TÜBİTAK-1002 (121R103)	2022-2023
Fare Metastatik Meme Kanseriinde IDO İnhibitörü ve Melatonin Uygulamasının <i>In Vitro</i> ve <i>In Vivo</i> Etkilerinin Tümörün İmmün ve Metastatik Yanıtları Açısından Değerlendirilmesi	TÜSEB-A (28251)	2023,

Burslar-Ödüller:

TÜBİTAK 1002 Proje Bursu, 2022

Yayınlar ve Bildiriler:

1. Kalay, M., **Yazici, E.**, Sisaneci, A., Koçak, O., Şimşek, E., Tanrioer, G. GBM Hücrelerinin Canlılığı ve Migrasyonunun Durdurulmasında; İndoksım od ile Birlikte Melatonin Uygulaması Etkin Midir? - 15th National and 1st International Congress of Histology and Embryology. THED 16-28 May 2022 Online (Sözlü Sunum)
2. Yildirim, S., Oylumlu, E., Dilmac, S., Sisaneci, A., **Yazici, E.**, Kalay, M., Guney Eskiler, G., Tanrioer, G. INDOXIMOD RESTRICTS TUMOR GROWTH BY TARGETING BREAST CANCER VIABILITY. 3rd International Multidisciplinary Cancer Research Congress. September 07-10, 2023, Istanbul, Turkey (Oral Presentation).